



Facultad de Ciencias
Sección de Biología



**Contribuciones al estudio estructural y
ultraestructural de glándulas de secreción
de esteroides del reptil *Gallotia galloti***

**Contributions to the structural and
ultrastructural study of steroid secreting
glands in the lizard *Gallotia galloti***

Adrián Rodríguez Alonso

Grado en Biología

Septiembre de 2014

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2013/2014	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

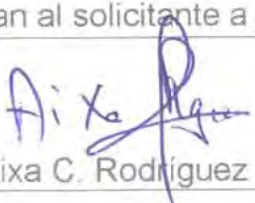

Nº DNI o pasaporte: 45863527D	Nombre y Apellidos: Adrián Rodríguez Alonso
Teléfono: 619196448	Dirección de correo electrónico: adri_gr_92hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Contribución al estudio estructural y ultraestructural de las glándulas de secreción de esteroides del reptil *Gallotia galloti*.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Aixa Celina Rodríguez Bello	
Profesora del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética – Área de Biología Celular.	
y D./Dña. Ana María Lancha Bernal	
Profesora del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética – Área de Biología Celular.	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
	
Fdo.: Aixa C. Rodríguez Bello	Fdo.: Ana Lancha

La Laguna, a 1 de Septiembre de 2014.

Firma del interesado/a

SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación favorable de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para el interesado/a

INDICE

	páginas
RESÚMEN/SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN	1-11
1.1. Descripción general de la glándula adrenal en vertebrados	1-4
1.2. Organización de los tejidos glandulares en la glándula adrenal de anfibios, aves, peces y mamíferos	4-6
1.3. Organización de los tejidos glandulares en la glándula adrenal de reptiles	7-9
1.4. Histofisiología de la glándula adrenal	9-10
1.5. Relación entre glándulas adrenales y gónadas	10-11
1.6. Objetivos	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12-15
2.1. Procesado del material para microscopía óptica	12-13
2.1.1. <i>Disección</i>	12
2.1.2. <i>Fijación</i>	12
2.1.3. <i>Inclusión</i>	12
2.1.4. <i>Corte y montaje</i>	13
2.1.5. <i>Tinción</i>	13
2.2. Procesado del material para microscopía electrónica	14-15
2.2.1. <i>Disección</i>	14
2.2.2. <i>Fijación e Inclusión</i>	14
2.2.3. <i>Corte y Montaje</i>	15
2.2.4. <i>Tinción de semifinos - contrastado de ultrafinos</i>	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16-26
3.1. Glándula adrenal	16-18
3.2. Testículo	18-22
3.3. Ovario	22-26
4. CONCLUSIONES	26-27
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27-30
CONCLUSIONS	31

RESUMEN

Los esteroides consisten en un grupo de hormonas de naturaleza lipídica, derivadas del colesterol, con funciones fisiológicas diversas entre las que destacan el metabolismo de carbohidratos, balance de iones y agua o la maduración sexual. Este trabajo presenta la organización histológica, a nivel estructural y ultraestructural, de las glándulas de secreción esteroidea en el reptil *Gallotia galloti* y la compara con la de otros grupos de vertebrados. Mediante la aplicación de técnicas histológicas clásicas se ha podido determinar que la porción secretora de la glándula adrenal de *G. galloti* está formada por tejido cromafín y tejido esteroideogénico y que estos se organizan histológicamente de manera similar a la descrita en los órdenes Rhynchocephalia y Squamata. El ovario de los especímenes procesados presentó dos tipos de folículos: previtelogénicos y vitelogénicos. Estos folículos se pueden distinguir por su tamaño, estado de maduración y organización histológica, presentando diferencias sustanciales con los folículos de mamíferos. La organización histológica de los túbulos seminíferos reveló que los ejemplares estudiados se encontraban en la fase de transición del ciclo sexual presentando las células de Leydig características similares a la de la mayoría de los grupos de vertebrados.

Palabras clave: esteroides, glándula adrenal, gónadas, *Gallotia galloti*

SUMMARY

Steroids are a large group of lipid hormones, derived from cholesterol, that are known to have various physiological function such as carbohydrate metabolism, ion balance or sexual maturation. The aim of this work is to show the histological organization of steroid secreting glands in the lizard *Gallotia galloti* at both structural and ultrastructural levels and compare them with those of other vertebrates groups. Using standard histological techniques we have determined that the adrenal gland from *Gallotia galloti* comprises chromaffin and steroidogenic tissue, and that they are histologically arranged in similar way to that described for the reptilian orders Rhynchocephalia and Squamata. The ovaries from the studied specimens showed two kind of follicles: previtellogenic and vitellogenic. These follicles can be distinguished by their size, maturation or histological organization and show substantial differences with mammalian follicles. The histological organization of seminiferous tubules showed that the studied individuals were in the transition step of the sexual cycle showing Leydig's cells similar characteristics to those described for most vertebrates groups.

Key words: steroids, adrenal gland, gonads, *Gallotia galloti*

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Descripción general de la glándula adrenal en vertebrados.

Etimológicamente el término adrenal procede del latín, *ad* = próximo y *renal* = riñón¹; de hecho, en todos los vertebrados la glándula adrenal presenta una posición más o menos próxima a los riñones (Bentley, 1976). Esta glándula endocrina, que se presenta como un par, está formada por dos tejidos ontogenética, funcional y estructuralmente diferenciados: el tejido esteroidogénico (la corteza) y el tejido cromafín (la médula) (Mitani et al., 1999; Simpson, 1937). Cabe decir que aunque la anatomía de la glándula, y su relación proximal con el riñón, es muy diferente entre las distintas clases de vertebrados, desde el punto de vista fisiológico, las distintas hormonas adrenales son equivalentes en todos los vertebrados (De Falco et al., 2004).

La **corteza adrenal** es de origen mesodérmico, deriva del epitelio celómico junto con las gónadas (Huang et al., 2012; Simpson, 1937), y presenta variaciones en su organización histológica dentro de los distintos grupos de vertebrados (Mitani, 2014). Independientemente de la clase de vertebrado considerada la corteza adrenal produce corticosteroides (corticoides) y esteroides sexuales; todos ellos, hormonas esteroideas derivadas del colesterol (**Figura 1**).

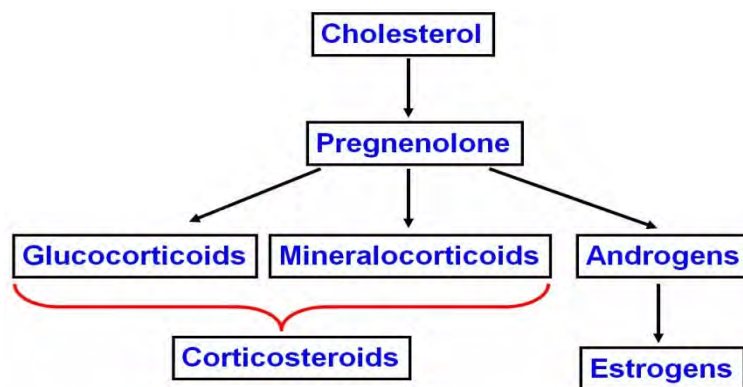


Figura 1. Esquema de la síntesis de hormonas esteroideas en la corteza adrenal. Tomado de <http://www.studyblue.com/notes/note/n/bc2-07-08-cholesterol-and-steroid-metabolism/deck/1052359>

Los corticosteroides están implicados en una gran variedad de mecanismos fisiológicos, incluyendo aquellos que regulan la inflamación, el sistema inmunitario, el metabolismo de hidratos de carbono, el catabolismo de proteínas, los niveles electrolíticos en plasma y los mecanismos que caracterizan la respuesta frente al estrés (De Falco et al., 2004). Es bien conocido el papel de los glucocorticoides, como el cortisol, en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas en respuesta a señales hipotalámicas e hipofisarias

¹<http://www.uv.es/~jaguilar/historias/etimol.html>

(Hanke, 1978). La hipersecreción de cortisol, característica de la enfermedad de Cushing, es debida a un exceso de la hormona hipofisaria adenocorticotropa (ACTH) que estimula la actividad de la glándula adrenal. Los mineralocorticoides, como la aldosterona, influyen en el control del balance hídrico y electrolítico al promover la retención de sodio y la excreción de potasio en el riñón cuya secreción se ve aumentada por el sistema renina-angiotensina en respuesta a la bajada de la presión sanguínea o el aumento de osmolaridad plasmática. La enfermedad de Addison deriva de la nula actividad de la corteza adrenal y se clasifica como un tipo de anemia cuyos síntomas afectan a la actividad cardiovascular, irritabilidad de los órganos digestivos e incluso provocan la pigmentación oscura de la piel (Mitani, 2014).

Los esteroides sexuales producidos por la corteza adrenal, los andrógenos, presentan una acción similar a la de los esteroides producidos en las gónadas masculinas². En machos, los niveles de testosterona producidas a partir de los andrógenos corticales tienen una importancia fisiológica insignificante en comparación con las cantidades de esta hormona producidas por los testículos. Sin embargo, en el caso de las hembras, la testosterona “cortical” es esencial en el mantenimiento del vello púbico y el axilar (Nussey y Whitehead, 2001) y representan la principal fuente de esteroides sexuales cuando disminuye la actividad gonadal. El hirsutismo es el crecimiento de vello excesivo en la mujer y está determinado por un exceso en los niveles de testosterona “ovárica” provocando en zonas andrógeno-dependientes (patillas, espalda, cuello) aumento de vello³; sin embargo, el pseudohermafroditismo femenino está causado por un aumento excesivo en los niveles de testosterona en la corteza adrenal al fallar la síntesis de cortisol, lo que provoca la masculinización de los genitales externos tratándose de individuos genotípicamente femeninos pero fenotípicamente con aspecto masculino⁴.

La **médula adrenal** está compuesta por agrupaciones de células denominadas cromafines –se tiñen de marrón oscuro con el ácido crómico– que se disponen alrededor de capilares sanguíneos. Su estrecha relación con la actividad del sistema simpático hace que funcionalmente se denomine al conjunto sistema simpaticomedular⁵; de hecho, la célula cromafín se origina a partir del ectodermo neural junto con las neuronas simpáticas (Coupland y Weakley, 1968; Huang et al., 2012; Huber, 2006; Simpson, 1937). La médula adrenal presenta una organización histológica muy diversa dentro de las diferentes clases de vertebrados pero en cualquier caso, las células cromafines secretan catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y

²<http://themedicalbiochemistrypage.org/es/steroid-hormones-sp.php>

³ <http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/hirsutismo>

⁴ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001669.html>

⁵ <http://www.webfisio.es/fisiologia/endocrino/textos/catecolaminas.html>

dopamina) (**Figura 2**). Estas aminohormonas –derivadas de la tirosina– tienen efectos fisiológicos diversos: en el sistema cardiovascular, entre otros efectos, varía la vasoconstricción y vasodilatación y aumenta la frecuencia cardíaca; en el sistema nervioso la adrenalina funciona como neurotransmisor; promueven la contracción o relajación del músculo liso; actúan sobre distintos ejes endocrinos aumentando o disminuyendo las liberación de diversas hormonas, e intervienen en el metabolismo catabólico de muchos carbohidratos (Kober et al., 2010).

Se han descrito pequeños grupos de células cromafines extra-adrenales que se asocian a diferentes órganos y estructuras. En agnatos –peces sin mandíbula– como lampreas y mixines (Perry et al., 1993) se han descrito grupos de tejido cromafín en las paredes cardíacas y venas principales del organismo; así como, en los ovarios y en la superficie ventral del riñón de la mayoría de peces gnatostomados –peces con mandíbula– donde conforman los *corpúsculos de Stannius*, órgano que suple la ausencia de glándula paratiroides en peces (Sierra et al., 2011, Thakur y Shrivastava, 1975; Unsicker et al., 1977). En aves, anfibios y reptiles se han observado en haces de nervios y ganglios (Gallo y Civinini, 2003). El grupo más grande extra-adrenal de células cromafines en los mamíferos se encuentra asociado a la aorta conformando el denominado *órgano de Zuckerkandl* (Zuckerkandl, 1901), encontrándose otros grupos con un menor número de células cromafines extra-adrenales en la pared de la vejiga, de la próstata, y detrás del hígado (Crivellato et al., 2006).

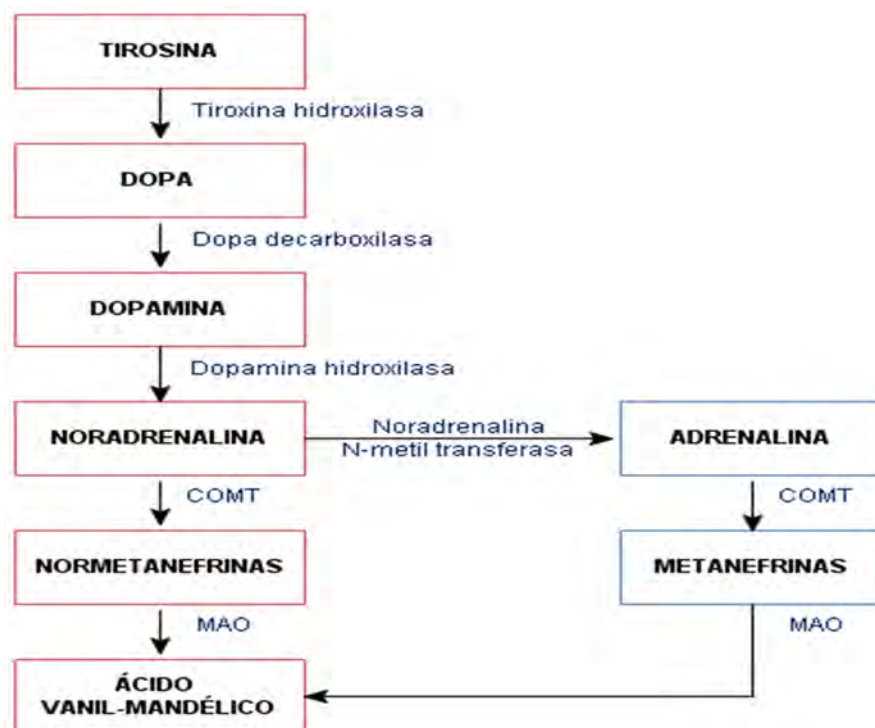


Figura 2. Síntesis y degradación de catecolaminas. Se representan los productos de la ruta y las enzimas que intervienen en la misma. Abreviaturas: COMT = catecol-O-metiltransferasa, MAO = monoamino oxidasa. Tomado de <http://intensivos.uninet.edu/29/2906.html>.

A nivel ultraestructural hay caracteres como la densidad electrónica, el tamaño de los gránulos, o su forma de secreción que permiten clasificar las células cromafines en diferentes tipos celulares (Coupland, 1971). Las células cromafines presentan características típicas de células neuroendocrinas con abundantes gránulos citoplasmáticos de diferente densidad electrónica acordes con el tipo de catecolamina almacenada en ellos. En todos los vertebrados existen 2 tipos celulares básicos 1) células secretoras de noradrenalina (N-cells) que contienen gránulos de alta densidad electrónica y 2) células secretoras de adrenalina (A-cells) que contienen gránulos menos densos. Se ha descrito un tercer tipo celular secretor de gránulos pequeños (SCG cells) en algunas aves (Unsicker, 1973), anfibios (Accordi y Gallo, 1982), reptiles (Unsicker, 1976) y mamíferos (Kobayashi y Coupland, 1977). Incluso, en el tejido cromafín de anfibios, se ha descrito un tipo celular exclusivo de algunas especies de ranas, las llamadas “células de verano” que presentan un citoplasma esférico con gránulos con alta densidad electrónica, con morfología esférica y elipsoidal, que contienen heparán sulfato lo que indica un relación estrecha con los mastocitos (Kawamura, 1985). La forma de secreción puede ser por exocitosis un proceso que implica la fusión de la membrana del gránulo con la membrana plasmática para liberar el contenido al medio extracelular (Burgoyne, 1991).

1.2. Organización de los tejidos glandulares en la glándula adrenal de anfibios, aves, peces y mamíferos.

En anfibios, el tejido cromafín y el tejido esteroideogénico suelen asociarse constituyendo islotes sobre la superficie ventral del riñón (Bentley, 1976). Se describen distintos patrones estructurales en los órdenes Caudata (salamandras) y Anura (ranas y sapos) (**Figura 3**) (Bentley, 1976; Hanke, 1978). En Anura (**Figura 3a**) el aspecto externo de la glándula adrenal se muestra como agrupaciones de elementos pequeños que forman una hilera cuya extensión recorre la superficie ventral del riñón y cuya irrigación proviene de las arterias y venas renales. Siendo la anteriormente descrita la más frecuente, existen muchas diferencias infraordinales entre las especies como la compactación del tejido adrenal, su posición en la superficie renal, la irrigación y la organización e inervación del tejido cromafín (Grassi Milano y Accordi, 1983). En Caudata (**Figura 3; b, c y d**) la glándula adrenal presenta una estructura organizada en islotes anastomosados, compuestos por varios estratos de células esteroideogénicas y grupos periféricos de células cromafines de pequeño tamaño, ambos separados por capas de tejido conectivo. El tejido cromafín se encuentra en contacto directo con los vasos renales recibiendo mayor irrigación sanguínea. Al igual que en Anura, se han descrito variaciones dentro del Orden en lo que se refiere a la distribución del tejido adrenal, el tamaño y número de células y su

distancia con respecto al borde medio del riñón (Accordi et al., 1984). En Siren los islotes de tejido cromafín y el tejido esteroideogénico se disponen entre los riñones (**Figura 3b**), mientras que en *Necturus* y *Amphiuma* (**Figura 3 c y d**, respectivamente) se disponen sobre la superficie ventral de los riñones (Bentley, 1976).

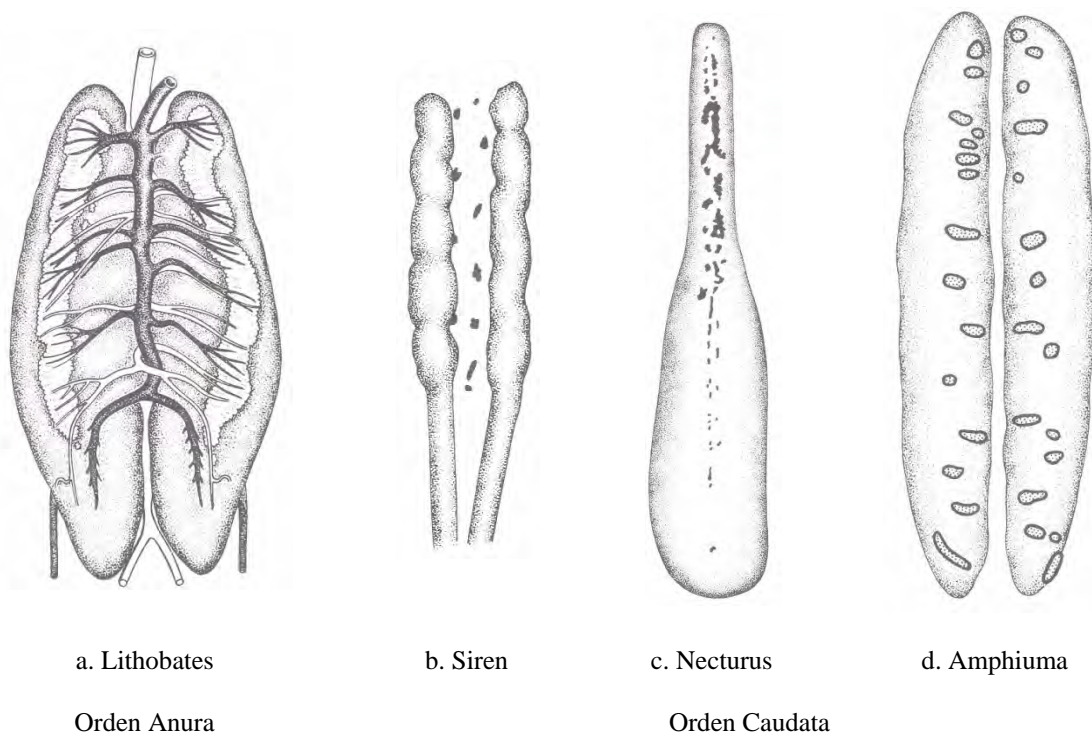


Figura 3. Organización de los tejidos adrenales en anfibios. a) el tejido adrenal se dispone formando dos tiras (blanco) a lo largo de la superficie ventral externa de cada riñón (sombreado), mostrándose la irrigación de la glándula a partir de ramificaciones de la arteria renal y la vena renal (claro y oscuro, respectivamente); b) disposición a modo de islotes alineados entre los dos riñones del tejido adrenal en Siren; c) el tejido adrenal (negro) se dispone a modo de islotes alineados sobre la superficie ventral del riñón y d) el tejido adrenal en *Amphiuma* (regiones sombreadas) se dispone a modo de islotes sobre la superficie ventral de los riñones. Tomado de Bentley (1976).

En aves la glándula adrenal está organizada histológicamente en 3 regiones: la capa periférica, central y subcapsular (Hodges, 1974). Por su parte, la corteza está compuesta por muchos cordones de amplio tamaño y formados por células columnares cuyo núcleo es pequeño, periférico y esférico. La médula presenta células con morfología poligonal, con un núcleo centralizado, alargado y esférico. En lo que se refiere a la distribución de los tejidos adrenales (**Figura 4**), en aves se observa la distribución entremezclada de los mismos (Bentley, 1976).

Los peces presentan una organización histológica bastante variable. En ciclóstomos (lámpreas y mixines) y en ciertos teleósteos los tejidos cromafín y esteroideogénico se encuentran en la mayoría de los casos separados y en contacto íntimo dentro del tejido renal, formando lo que se llama el homólogo adrenal (Abelli et al., 1996; Chester Jones y Mosley, 1980; Gallo y Civinini, 2003; Gallo y Civinini, 2005; Mastrolia et al., 1981); sin embargo, en la gran mayoría

de peces actuales el tejido cromafín presenta una distribución o bien entremezclada con el tejido esteroideogénico o bien formando grupos independientes.

En Chondrichthyes (**Figura 5**), si bien los tejidos adrenales se encuentran separados no están inmersos en los riñones ocupando una posición interrenal (Bentley, 1976; Rocha et al, 2001).

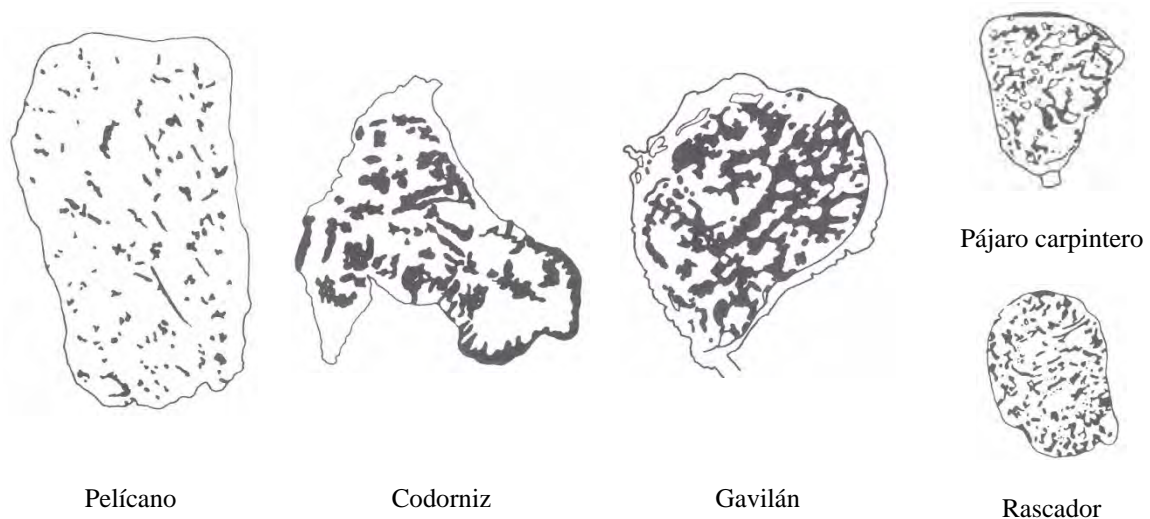


Figura 4. Distribución del tejido adrenal en aves. Representación de secciones de la glándula adrenal de varias especies de aves donde se muestra la distribución del tejido cromafín (negro) y el tejido esteroideogénico (blanco). Tomado de Bentley (1976).

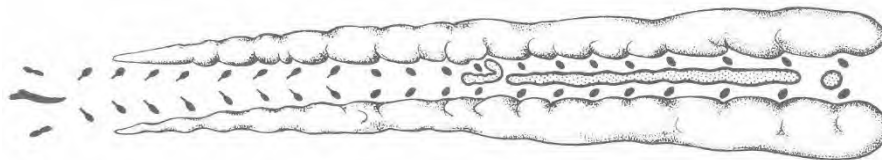


Figura 5. Localización interrenal de los tejidos adrenales en Condrictios. Tiburón perro (*Mustelus canis*) el tejido cromafín aparece como dos filas de puntos negros y el tejido esteroideogénico como una tira fragmentada con una trama de puntos. Tomado de Bentley (1976).

En mamíferos, encontramos el mayor grado de diferenciación tanto en la organización histológica como en la irrigación vascular de los tejidos adrenales. La corteza está dividida en tres zonas diferentes: glomerular, fascicular y reticular (Nikisawa y Strott, 1984). Por su parte, la médula presenta una disposición interna, estando altamente irrigada por plexos capilares que son ramificaciones de las arterias y venas centrales, que nutren principalmente al tejido cromafín de aspecto uniforme e integrado por las células adrenérgicas y noradrenérgicas, en su mayoría, y secretoras de gránulos pequeños, implicadas en la síntesis de catecolaminas. Dado que la estructura de la glándula adrenal de los mamíferos es más conocida y está mejor documentada que la de aves, peces y mamíferos, se ha optado por no presentar una figura que la ilustre.

1.3. Organización de los tejidos glandulares en la glándula adrenal de reptiles.

Se describen dos zonas claramente diferenciadas dentro de la glándula adrenal y con independencia del tipo celular que componga cada una de ellas se hace referencia al tejido “adrenal” como aquel que ocupa una posición periférica, mientras que el “interrenal” es la zona que ocupa una posición central (Balfour, 1876), utilizándose estos términos como sinónimos de corteza y médula, respectivamente. A nivel cuantitativo hay una gran variabilidad en cuanto a parámetros como tamaño, longitud y peso, dependiendo de la complejidad estructural del individuo.

Se han descrito varias relaciones morfo-anatómicas de la glándula adrenal con órganos adyacentes principalmente riñones y gónadas en los diferentes órdenes de reptiles (**Figura 6**).

Dentro del orden Testudines (tortugas) (**Figura 6a**) los islotes de células interrenales y adrenales penetran el parénquima renal, habiendo una conexión importante entre glándula adrenal y riñón. Se trata del orden de reptiles más cercano a los anfibios por sus estrechas relaciones con el mesonefro del cual deriva el riñón (Hartmann y Brownell, 1949).

En Rhynchocephalia (tuátaras) (**Figura 6b**) parte de la glándula adrenal se encuentra introducida en las gónadas habiendo una fuerte conexión entre ellos. Una capa de tejido conectivo cubre ambos órganos. Presenta un polo anterior que desemboca en las gónadas, mientras que el posterior lo hace topográficamente muy cerca del riñón (Osawa, 1897).

En Squamata (lagartos y serpientes) (**Figura 6c**) también hay una profunda conexión entre las gónadas y la glándula adrenal; sin embargo, sus relaciones con el mesonefro de donde deriva el riñón son las más cercanas dentro de los reptiles. Tienen una variedad morfológica muy grande, abarcando desde formas ovoides y circulares hasta alargadas y filiformes (Hartmann y Brownell, 1949).

En Crocodylia (cocodrilos) (**Figura 6d**) también hay una importante conexión entre la glándula adrenal, que es cilíndrica y rodeada por gran cantidad de tejido conectivo, y la gónada, incluso más que en Squamata, situándose lateralmente sobre el conducto gonadal y dorsalmente sobre las propias gónadas (Petit, 1896).

Se han descrito cuatro tipos de organización histológica y distribución de los dos tipos celulares principales que componen la glándula adrenal de reptiles (**Figura 7**).

En tortugas (**Figura 7a**) el tejido interrenal consiste en cordones anastomosados cuya orientación es muy variable, mientras que su organización celular no presenta diferencias

regionales con células estrechas y de mayor tamaño en la periferia que las de la zona central. Por su parte el tejido adrenal se organiza irregularmente en grupos de células con morfologías ovoides y globulares dispuestos cerca del tejido conectivo de la cápsula y en la zona central del parénquima, pero nunca ubicados entre los cordones interrenales (Gabe et al, 1964).

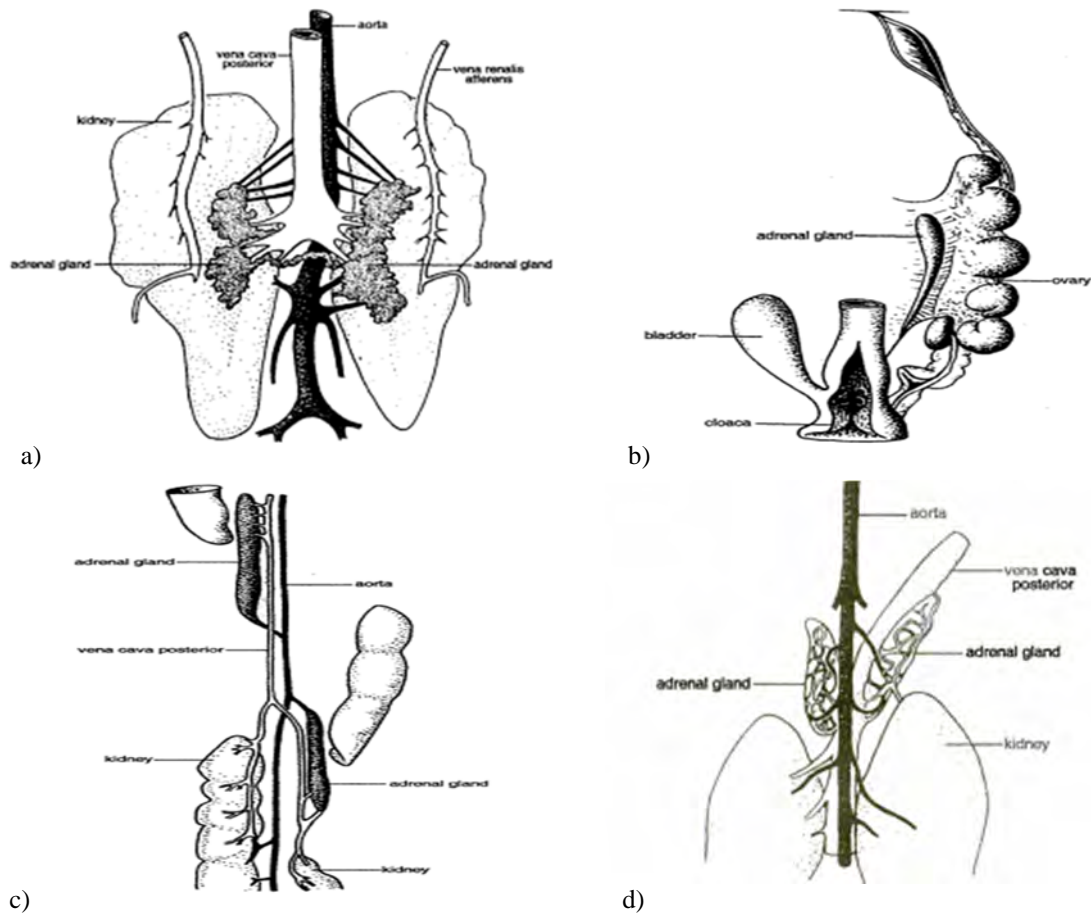


Figura 6. Representación anatómica del sistema adrenal en los principales órdenes de reptiles. (a) Testudines (b) Rhynchocephalia (c) Squamata y (d) Crocodylia. Esquemas tomados de: (a y c) Hartmann y Brownell (1949), (b) Osawa (1897) y (d) Petit (1896).

La distribución de ambos tipos celulares en Rhynchocephalia (**Figura 7b**) consiste en una capa dorsal compuesta exclusivamente por células noradrenérgicas asociadas al tejido interrenal, mientras que en la zona ventral, rodeada por el parénquima interrenal, pueden encontrarse zonas mezcladas o bien islotes de un tipo celular concreto (Gabe et al., 1964).

La distribución observada en Squamata (**Figura 7c**) es la encontrada en la mayoría de los lagartos, supone una distribución clara y diferenciada de los tejidos de la glándula adrenal. La zona periférica consiste mayormente en tejido medular noradrenérgico, que formando diferentes interdigitaciones contacta con las masas de tejido interrenal, mientras que la zona central está compuesto de células secretoras de corticoides de aspecto más claro, con algunos gránulos e inclusiones lipídicas. Hay tres patrones diferentes de organización del tejido

cromafín según las familias En Gekkonidae se observa una disposición radial con células cónicas cuyos núcleos se ubican hacia la periferia. En Anguidae se presentan células prismáticas, de pequeño tamaño y con disposición irregular a lo largo de la adrenal, mientras que en Iguánidos se encuentran dos hileras de células con núcleo central que recorren toda la glándula (Gabe et al., 1964).

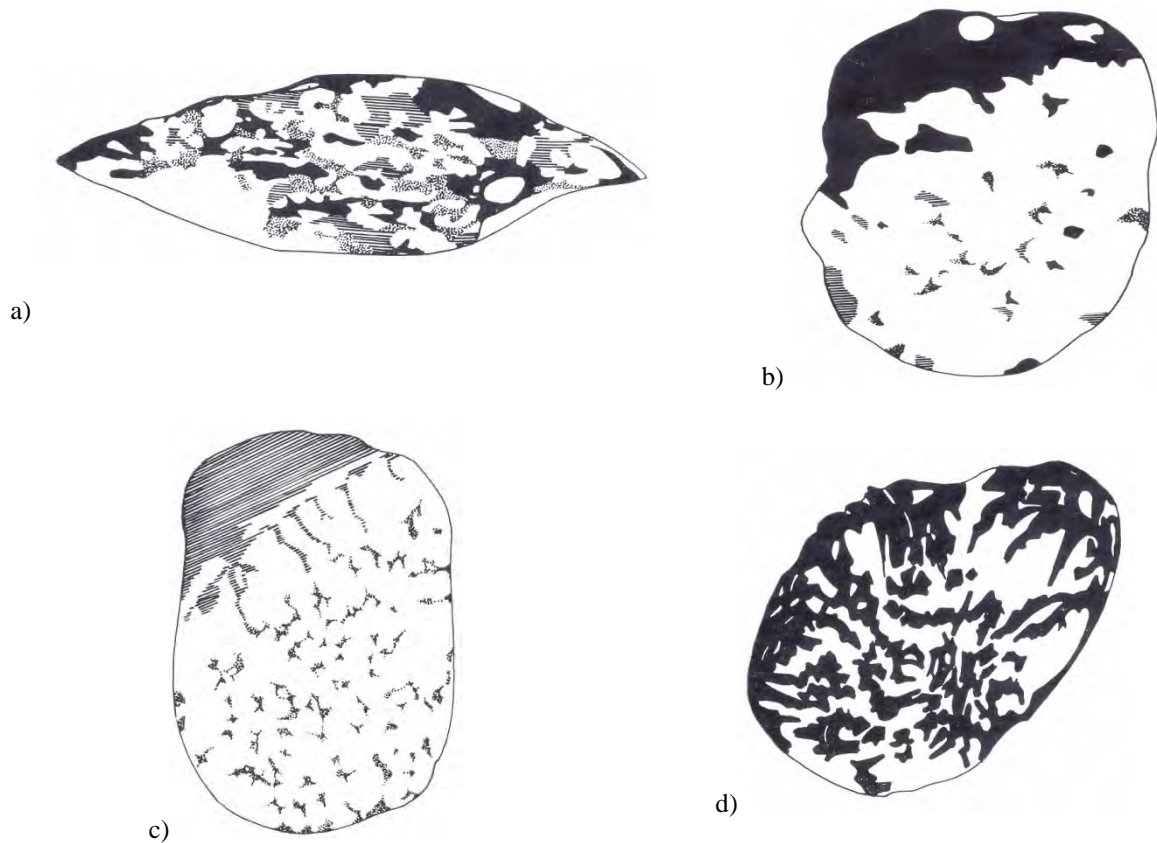


Figura 7. Organización y distribución de los tejidos endocrinos en la glándula adrenal de reptiles. (a) Testudines (b) Rhynchocephalia (c) Squamata y (d) Crocodylia. Tomado de Gabe et al., 1964.

En cocodrilos (**Figura 7d**) se observa la existencia de bandas de tejido adrenal que se alternan con el tejido interrenal, lo que indica una zonación del tejido (Gabe et al., 1964).

1.4. Histofisiología de la glándula adrenal.

Los tejidos endocrinos de la glándula adrenal presentan una diferenciación funcional en cuanto a la forma de secreción y naturaleza química de las hormonas secretadas. La corteza sintetiza diferentes esteroides (**Figura 1**), las células de la zona fascicular de mamíferos sintetizan glucocorticoides mientras que los mineralocorticoides son producidos por células de la zona glomerular (Giroud et al., 1956) y están regulados normalmente por el sistema renina-angiotensina (Davis, 1975). La zona reticular es el principal lugar de síntesis de andrógenos (Vines, 1938) encontrándose hormonas como la androstenediona en especies de gato, perro y

cobaya (Davison et al., 1983). La corteza adrenal forma parte de uno de los principales ejes neuroendocrinos que regulan el estrés, sistema inmune, almacén y liberación de grasa o la sexualidad (**Figura 8**).

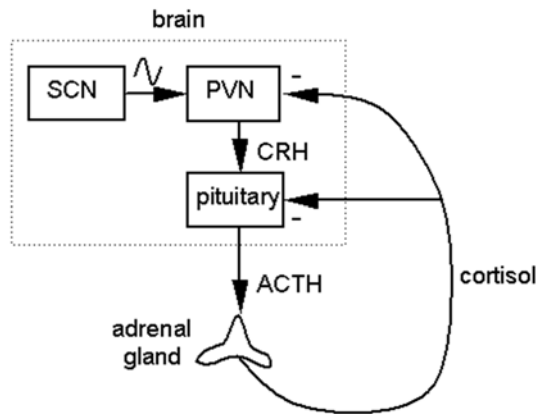


Figura 8. Esquema básico del eje hipotálamo - hipofisis – adrenal. El núcleo paraventricular (PVN) produce y libera la hormona liberadora de hormona corticotropa (CRH). El péptido CRH estimula la producción y liberación de la hormona corticotropa (ACTH) a nivel de la hipófisis (pituitary). La ACTH estimula la producción de cortisol a nivel de la corteza adrenal. El cortisol, a su vez, actúa sobre la hipófisis y el hipotálamo en un mecanismo de retrocontrol negativo. Tomado de: <http://www.mind-body-health.net/index.html?hpa.html&1>.

La médula se encarga de secretar catecolaminas (**Figura 2**) cuyos efectos en el organismo se relacionan con: el aumento de la glucogenólisis en músculo e hígado, el aumento de las concentraciones de glucosa y ácido láctico en el torrente sanguíneo, la potenciación de la vasodilatación y el ritmo cardiaco y respiratorio, la inhibición de la contracción del tejido uterino e intestinal (Simpson et al., 1937).

1.5. Relación entre glándulas adrenales y gónadas.

La principal fuente de esteroides sexuales en los distintos grupos de vertebrados se encuentra en el tejido gonadal, estando su regulación controlada por otro eje neuroendocrino: el eje, hipotálamo-hipofisario-gonadal (**Figura 9**).

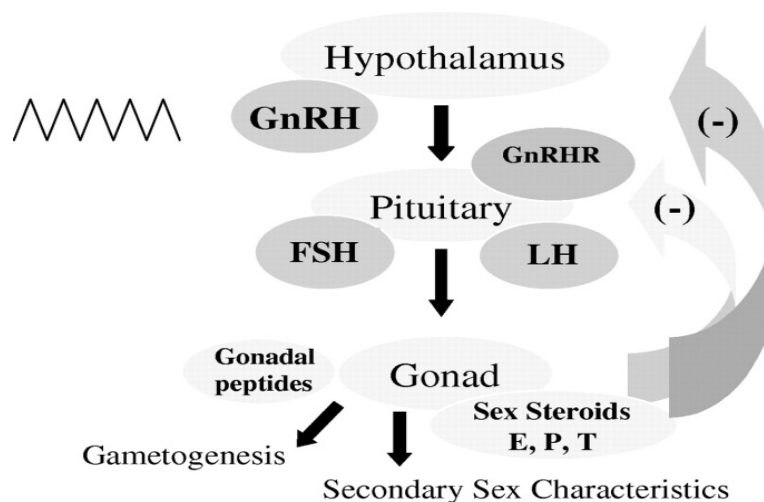


Figura 9. Representación del eje hipotálamo –hipofisario–gonadal. La ruta se describe en el texto. E = estrógenos, FSH = hormona folículo-estimulante. GnRH = factor liberador de gonadotropina, LH = hormona luteinizante, P = progesterona, Pituitary = hipófisis, T = testosterona. Tomado de: Harrison et al., 2004.

En el hipotálamo, las neuronas productoras del factor liberador de gonadotropina (GnRH), primer factor liberador hipotalámico descubierto, representan el componente final de una red neuronal que integra factores internos y ambientales, que regulan la secreción de hormonas reproductoras (Herbison, 1998). Las proyecciones principales de estas neuronas van a controlar la función de la hipófisis anterior llegando a la capa externa de la eminencia media (EM) induciendo la liberación de la hormona folículoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) al torrente sanguíneo para llegar finalmente a las gónadas (**Figura 9**).

El ovario y el testículo, glándulas femenina y masculina respectivamente, tienen una doble función: la producción de hormonas esteroideas y la liberación de un óvulo fecundable o de espermatozoides. Las células de Leydig del testículo son la fuente principal de la testosterona en este órgano que posteriormente viaja a los capilares para integrarse en la circulación sistémica (Callard et al., 1976; Dubois et al., 1988; Mahmoud et al., 1985;).

En el ovario, las gonadotropinas (LH y FSH) inducen la esteroidogénesis llevada a cabo por el epitelio folicular, la vitelogénesis y la inducción de la ovulación (Eyeson 1971; Hahn 1967; Marschall y Gist, 1973). En la mayoría de reptiles factores como el fotoperiodo, temperatura y la variación en las concentraciones de las gonadotropinas –FSH y LH– y andrógenos (testosterona) influyen directamente en los ciclos reproductivos (Callard et al., 1976; Licht, 1970; Licht y Crews, 1975; Licht y Tsui, 1975; Lipner et al., 1974).

En tortugas y cocodrilos la mayor parte del proceso reproductor los lleva a cabo la LH (Lipner et al., 1974, Rao et al., 1974; Schwartz, 1974); sin embargo, en la mayoría de los lagartos y serpientes la FSH es la principal reguladora de la maduración gonadal (Licht, 1970).

1.6. Objetivos.

El principal objetivo de este estudio es ahondar en el conocimiento estructural y ultraestructural de los órganos de secreción de esteroides -gónadas y glándula adrenal- del lacértido *Gallotia galloti* de manera que podamos realizar un análisis comparado con lo descrito en otros vertebrados. Utilizando técnicas de microscopía óptica y electrónica pretendemos:

1. Realizar una descripción histológica de la glándula adrenal, el ovario y el testículo del reptil *Gallotia galloti*.
2. Identificar los distintos tipos celulares y su disposición dentro de estos órganos.
3. Establecer una correlación con los tipos celulares secretores de esteroides en órganos equivalentes de otros vertebrados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado 4 ejemplares adultos de *Gallotia galloti*, 2 machos y 2 hembras sexualmente maduros capturados durante el período de marzo - mayo coincidiendo con la época de la cópula. Se tomaron diferentes datos iniciales como peso, sexo y longitud (cabeza – cola y cabeza – cloaca).

2.1. Procesado del material para Microscopía Óptica.

Los pasos seguidos para el procesado y tratamiento del material han sido los siguientes:

2.1.1. Disección.

Anestesiados los animales, con éter etílico, se extrajeron las adrenales y las gónadas y se procedió a sumergir el material diseccionado en el líquido fijador para fijarlos por inmersión. Junto a los órganos utilizados en este estudio se extrajeron y procesaron otros órganos para su almacenamiento.

2.1.2. Fijación.

Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía en su estado vivo⁶. Las muestras se fijaron con el líquido de Bouin (**Tabla 1**), un fijador compuesto de uso común en el procesado de materiales biológicos que se pretenden observar al microscopio óptico.

Reactivo	Volumen
Solución saturada de ácido pícrico	75 ml
Solución acuosa de formol al 40%	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Tabla 1. Composición del fijador de Bouin. http://www.ihcworld.com/_protocols/histology/fixatives.htm.

2.1.3. Inclusión.

La inclusión en parafina es el método más común de endurecimiento del tejido y consiste en infiltrar la muestra con parafina líquida que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifica, sin afectar a las características del tejido⁷. El protocolo utilizado para la inclusión en parafina se recoge en la **Tabla 2**.

La inclusión finalizó con la elaboración de los bloques de parafina utilizándose como moldes las *pinzas de Leuckart*.

⁶ <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijacion.php>

⁷ <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-parafina.php>

2.1.4. Corte y Montaje.

Para el corte de los bloques de parafina se utilizó un micrótopo de rotación *Thermo*. Se obtuvieron tiras de longitud variable de cortes de 7 μm de grosor. Para el montaje, sobre portaobjetos, se utilizó una placa calefactora *Nahita*, modelo N° 522 (a 40°C) y un medio albuminado como solución de montaje. Una vez montados los cortes, los portaobjetos se dejaron secar en una estufa durante 24 - 48 horas.

Reactivo	Tiempo	Temperatura	Función
Alcohol 70%	30 min.	ambiente	Lavado - inicio deshidratación.
Alcohol 96%	2 x 30 min.	ambiente	Deshidratación.
Alcohol 100%	3 x 60 min.	ambiente	Deshidratación.
Toluol I	10 min.	ambiente	Aclaramiento/diafanización.
Toluol II	20 min.	ambiente	Aclaramiento/diafanización.
Parafina I	120 min	65°C	Imbibición.
Parafina III	Toda la noche	65°C	Imbibición.

Tabla 2. Protocolo de inclusión en parafina Protocolo estándar del laboratorio de Biología Celular de la ULL.

2.1.5. Tinción.

Para la coloración de los cortes se realizó el protocolo de tinción de Hematoxilina-Eritrosina (HE) recogido en la **Tabla 3**. Tras la aplicación de este protocolo las muestras se observaron en un fotomicroscopio *Leica DM4000B*. Las fotografías se tomaron con una cámara digital *Leica DFC 300FX*.

Reactivo	Tiempo	Función
Xileno	3 x 5 min.	Desparafinar.
Alcohol 100%	5 min.	Hidratación.
Alcohol 96 %	5 min.	Hidratación.
Alcohol 70 %	5 min.	Hidratación.
Agua Destilada	5 min.	Hidratación.
Hematoxilina de Harris	2 min.	Tinción.
Agua corriente	2 min.	Lavado, virado al azul.
Agua destilada	2 min.	Lavado.
Eritrosina acuosa 1%	2 min.	Tinción.
Agua destilada	2 min.	Lavado.
Etanol 96 %	2 min.	Deshidratación.
Etanol absoluto	2 x 5 min.	Deshidratación.
Xileno	2 x 5 min.	Aclaramiento.
Eukitt		Montaje del cubreobjetos.

Tabla 3. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eritrosina (HE). Protocolo estándar del laboratorio de Biología Celular de la ULL.

2.2. Procesado del material para Microscopía Electrónica.

2.2.1. Disección.

Se utilizaron 2 ejemplares de hembras adultas y se procedió según se describe en el apartado 2.1.1. Los órganos no se incluyeron enteros. Con la ayuda de un bisturí se obtuvieron fragmentos pequeños (2 mm x 2 mm) que se introdujeron en el fijador previamente preparado y mantenido en frío.

2.2.2. Fijación e Inclusión.

Las muestras se fijaron, por inmersión, con glutaraldehído al 5% en tampón fosfato (PB) 0,2 M, pH 7,3 (Tabla 4) durante 2 – 3 horas a 4°C. Tras el lavado en PB 0,2 M, pH 7,3 las piezas se fijaron en tetróxido de osmio al 1% en PB 0,2 M, pH 7,3.

Reactivo	Volumen
Glutaraldehído al 25%	20 ml
Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,3	30 ml
Agua destilada	50 ml

Tabla 4. Composición del fijador simple, tamponado, utilizado para microscopía electrónica – glutaraldehído al 5%. http://www.ihcworld.com/_protocols/histology/fixatives.htm

El protocolo de fijación e inclusión se recoge en la **Tabla 5**.

Reactivo	Tiempo	T ^a	Función
Glutaraldehído al 5%	2 – 3 horas	4°C	Fijación.
PB 0,2 M, pH 7,3	3 x 20 min.	4°C	Lavado.
Tetróxido de osmio 2% en PB 0,2 M, pH 7,3	2 horas.	4°C	Posfijación/contraste
Agua destilada	10 min.	4°C	Lavado.
Alcohol 30%	15 min.	4°C	Deshidratación.
Alcohol 50%	15 min.	4°C	Deshidratación.
Alcohol 70%	15 min.	4°C	Deshidratación.
Acetato de uranilo 2% en alcohol 70%	de 2 h. a toda la noche	4°C	Deshidratación/contraste.
Alcohol de 90%	15 minutos	4°C	Deshidratación.
Alcohol de 100°	2 x 15 minutos	4°C	Deshidratación.
Óxido de propileno	2 x 15 minutos	4°C	Aclarado.
Mezcla óxido de propileno – resina (1:1)	1 hora	4°C	Imbibición.
Resina	Toda la noche	4°C	Imbibición.
Polimerización	48 horas	60°C	Polimerización

Tabla 5. Protocolo de fijación e inclusión de tejido procesado para microscopía electrónica. Protocolo estándar del laboratorio de Biología Celular de la ULL.

Como medio de inclusión se utilizó la resina Spurr (Spurr, 1969). La forma de preparación se recoge en la **Tabla 6**.

Componente	Cantidad
ERL	10 g
DER	7 g
NSA	26 g
DMAE	0,4 g
Conservar a 4° C	3-4 días

Tabla 6. Preparación de la resina Spurr (Spurr, 1969).

2.2.3. Corte y Montaje.

Para retallar el bloque de resina se utilizó un piramidotomo *Reichert modelo 709901* hasta conferirle una morfología piramidal. Para la obtención de cortes se utilizó un ultramicrotomo *Reichert ultracut S 654901*.

A partir del material incluido en resina se obtuvieron dos tipos de cortes: 1) semifinos de 2 µm que montados sobre portaobjetos se observan al microscopio óptico y 2) ultrafinos de 70 nm que montados sobre rejillas de cobre de 250 mesh se observan al microscopio electrónico.

2.2.4. Tinción de semifinos - contrastado de ultrafinos.

Los cortes semifinos se tiñeron con una solución de azul de toluidina (AT) –azul de toluidina al 1% en una solución acuosa con bórax al 1%– durante 15 segundos sobre una placa calefactora a 80° C.

En los cortes de 70 nm se sigue un protocolo de contraste que se recoge en la **Tabla 7** tras el cual se secan las rejillas sobre papel de filtro y guardan en un portarrejillas.

Colorante	Tiempo
Acetato de uranilo	15 minutos
Agua Destilada	Varios lavados de 1 minuto cada uno.
Citrato de plomo	20-30 minutos
Agua Destilada	Varios lavados de 1 minuto cada uno.

Tabla 7: Protocolo de contrastado de rejillas. Protocolo estándar del laboratorio de Biología Celular de la ULL.

Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL-JEM 1010* ubicado en el Servicio General de Microscopía Electrónica de la ULL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Glándula adrenal.

En todos los ejemplares estudiados de *Gallotia galloti* la glándula adrenal se encuentra próxima a las gónadas y a los gonoductos y se encuentra flanqueada por dos vasos sanguíneos de gran calibre (**Figura 11a**). Esta observación coincide con lo descrito en el orden Squamata (Varano y Laforgia, 1991) y difiere de lo detallado para Testudines (tortugas), donde la glándula muestra una posición próxima al mesonefro (Hartmann y Brownell, 1949), lo que vendría a demostrar una relación filogenética muy cercana con los anfibios. En ejemplares machos, la glándula, se localizó por encima de los conductos del epidídimo y en hembras se observó su asociación al ovario por medio de haces de tejido conjuntivo denso. En ambos casos la glándula adrenal se encuentra rodeada por tejido conectivo denso, constituyendo una cápsula, en el que se observan capilares (**Figuras 11a y 12c**).

Al microscopio óptico se distinguieron dos tipos de tejidos claramente diferenciados por la coloración que adquirieron al reaccionar con los colorantes utilizados: el esteroideogénico, con afinidad por colorantes ácidos como la Eritrosina (eosinófilo) y el cromafín, con apetencia por colorantes básicos como la Hematoxilina (basófilo) (**Figura 11b**). Las células de naturaleza esteroideogénica presentan morfología prismática, su citoplasma es alargado, escasamente granular (**Figura 11b**) y presenta vesículas lipídicas de morfología esférica y de contenido claro que se distribuyen desigualmente por el citoplasma (**Figuras 11b y 12b**). Los núcleos de estas células son esféricos y muestran una posición excéntrica. Al microscopio electrónico (no se presenta imagen) la célula esteroideogénica presenta vesículas lipídicas de pequeño tamaño distribuidas por todo el citoplasma junto con un retículo endoplasmático muy desarrollado y la presencia de algunos gránulos de glucógeno tal y como se describe en urodelos (Accordi et al., 1984).

Las células del tejido cromafín presentan citoplasma irregular y gran cantidad de gránulos densos que pueden representar lugares de almacenamiento de catecolaminas (**Figura 11b y 12c**). Ultraestructuralmente (**Figura 12d**) las células cromafines presentan abundantes gránulos electrodensos de tamaño y morfología variable, desde esférica hasta ovalada, repartidos desigualmente por el citoplasma, así como algunas vesículas de aspecto blanquecino. La membrana plasmática está bien definida y las fibras de colágeno permiten distinguir el espacio extracelular. Los núcleos presentan aspecto aplastado, de morfología irregular y generalmente eucromatínicos.

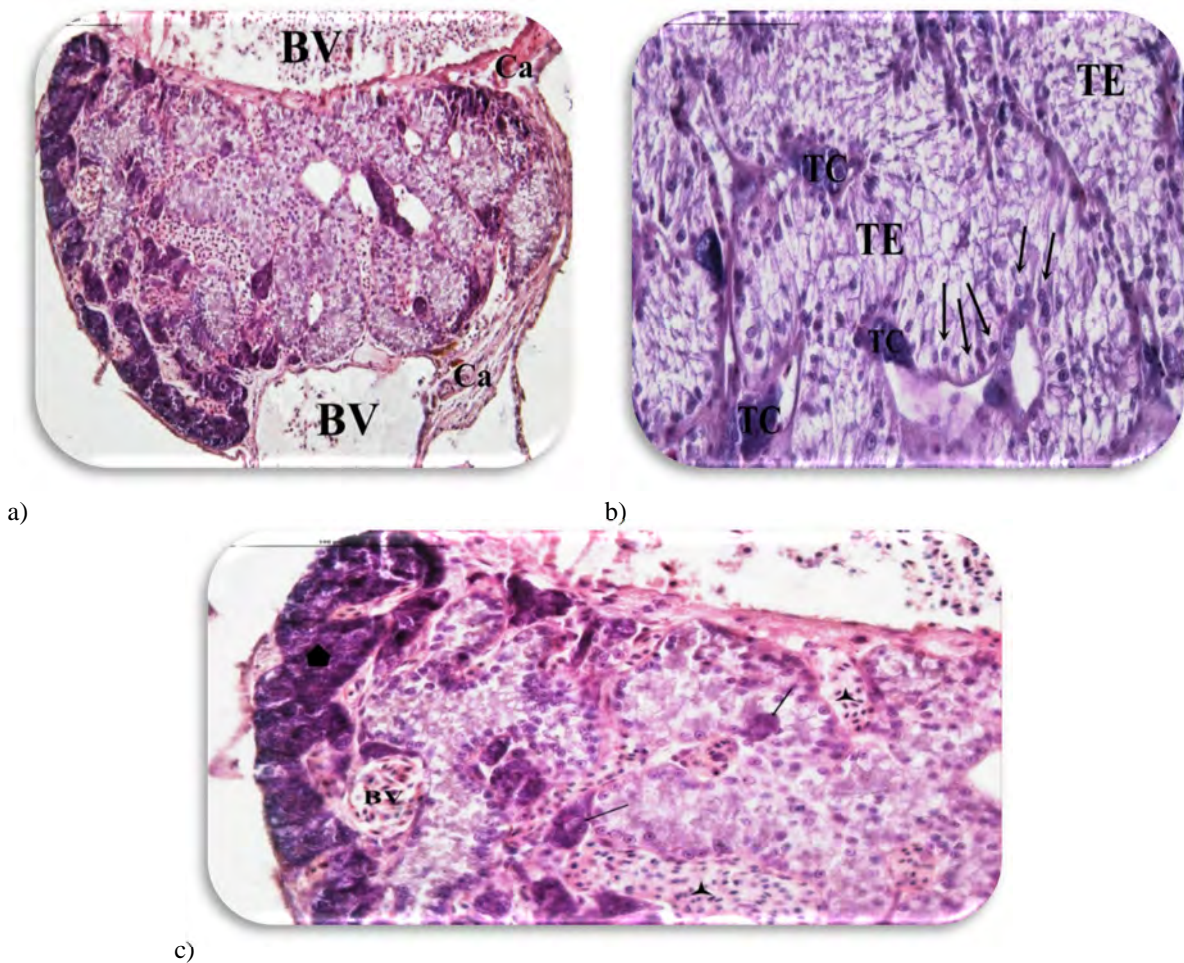


Figura 11. Cortes de parafina de la glándula adrenal teñidos con HE. (a) Aspecto general de la glándula adrenal que muestra a la izquierda, intensamente teñido y entre los vasos sanguíneos (VB) que flanquean a la glándula, la disposición del tejido cromafín. Cápsula externa (Ca) (20x). (b) Células del tejido esteroidogénico (TE) mostrando citoplasmas alargados y de contenido claro con núcleos esféricos en la región basal de la célula (→). Islotes de células del tejido cromafín (TC) dispersas en el TE (40x). (c) Distribución periférica del tejido cromafín (◆) y presencia de capilares (BV) con eritrocitos nucleados (▲) e islotes de TC (→) dispersos en el TE (40x). Barras de escala: a), b) y c) 100 µm.

Respecto a la distribución de ambos tejidos en el órgano (**Figura 11**) se observó que el tejido cromafín tiene una localización preferentemente periférica, formando un casquete dorsal que se extiende entre los dos vasos que flanquean a la glándula (**Figura 11a**) y recubre parte del tejido esteroidogénico que es el que ocupa la mayor parte de la glándula. Además, se observaron islotes de tejido cromafín dispersos en el tejido esteroidogénico (**Figura 11b y c**) y gran cantidad de capilares (**Figura 11c**). Esta distribución es similar a lo descrito en Rhynchocephalia (tuátaras) y Squamata (Gabe et al., 1964) no existiendo una diferenciación histológica lo suficientemente clara como para delimitar entre una verdadera corteza y una médula tal y como ocurre en vertebrados mamíferos, en los que la corteza se divide en 3 zonas - glomerular, fascicular y reticular- histofisiológicamente diferentes y la médula, con posición central y de aspecto homogéneo (Nishikawa y Strott, 1984).

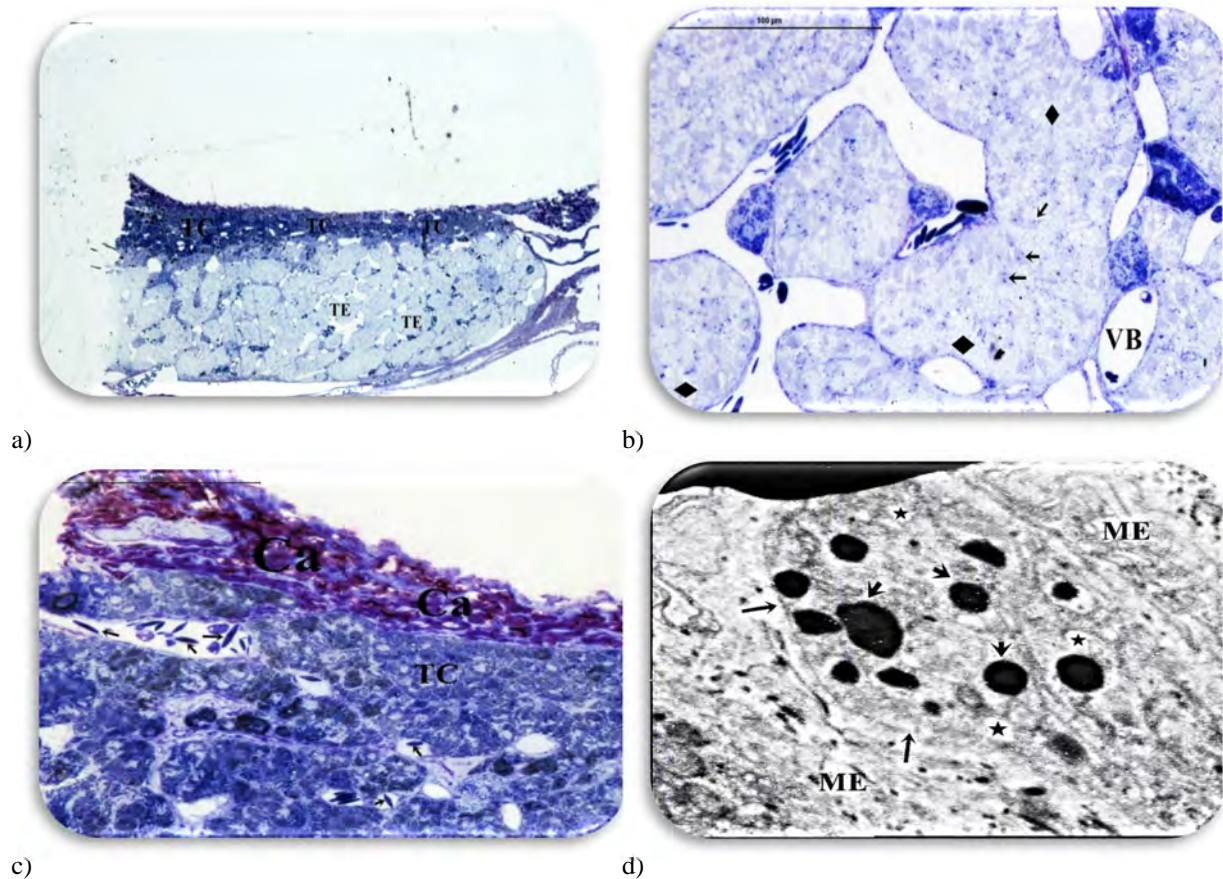


Figura 12. Secciones semifinas y ultrafino de la glándula adrenal. (a) Sección semifina que muestra la distribución del tejido cromafín (TC) y esteroidogénico (TE) (5x) (b) Detalle del tejido esteroidogénico en el que se muestran las vesículas lipídicas (◆) y algunos gránulos densos citoplasmáticos (→) de las células esteroidogénicas y la presencia de capilares (VB) (40x) (c) Capilares con eritrocitos (→) y alta granulación del tejido cromafín. Cápsula externa de tejido conjuntivo (Ca) (40x). (d) Microfotografía de una célula cromafín que muestra la membrana plasmática (→) rodeada de matriz extracelular (ME). Se observan gránulos electrodensos, de tamaño variable (→) así como pequeñas vesículas (★) (10.000x). Barras de escala: a), b) y c) 100µm.

3.2. Testículo.

Macroscópicamente los testículos se presentan como órganos pares, situados en el interior de la cavidad abdominal cerca de la pelvis, presentando forma oval y color amarillo. Adosados a ellos, se observan las vías espermáticas.

Recubriendo al testículo observamos la túnica albugínea, formada por varias capas de tejido conectivo denso en el que las fibras de colágeno muestran una orientación longitudinal y donde es posible observar fibroblastos de aspecto aplanado (**Figura 13a**).

Los túbulos seminíferos constituyen una extensa red dentro del testículo, presentan morfología más o menos ovalada y su diámetro es muy variable; cada túbulo aparece delimitado por una membrana basal, a la cual se asocian células miodes y fibroblastos (**Figura 13b**). El epitelio de los túbulos seminíferos (**Figura 13**) aparece como un epitelio estratificado formado por varias capas de células que representan distintas etapas del proceso de la espermatogénesis, proceso

meiótico que conduce a la formación de espermatozoides que tras ser almacenados en la luz del túbulo son liberados en un único evento de espermiación (Gribbins, 2011). La presencia de espermatozoides maduros en la luz de túbulo seminífero de esta especie ocurre durante los meses de abril-julio, coincidiendo con la época de actividad sexual (Mahamud, 1984), observándose en la tortuga *Trachemys scripta* entre octubre y diciembre (Gribbins, 2011).

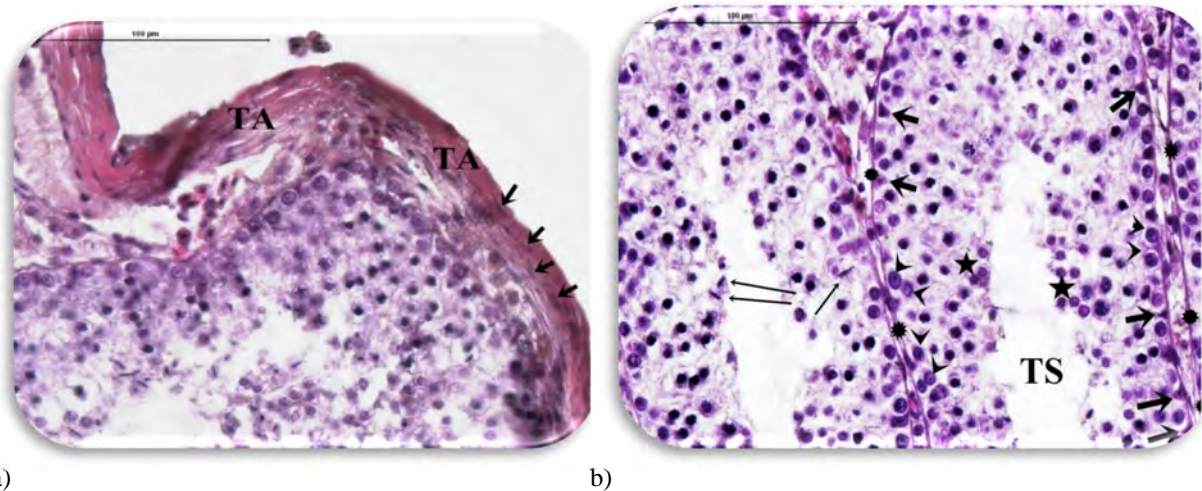


Figura 13. Cortes de parafina de testículo teñidos con HE. (a) Túnica albugínea (TA) con varios fibroblastos (→) de aspecto aplastado y alargado (40x). (b) Túbulos seminíferos (TS) mostrando el núcleo de las células de Sertoli (→), espermátidas en dos estadios de maduración: unas de aspecto esférico (★) y otras cilíndricas (→) y algunas espermatogonias (➤). Se aprecia la lámina basal del túbulo (✱) (40x). Barras de escala: a) y b) 100 µm.

Entre los distintos tipos de células que constituyen el epitelio del túbulo seminífero de *Galloti galloti* distinguimos: 1) células con morfología esférica, uninucleadas dispuestas en 1 ó 2 estratos en la periferia del tubo seminífero, próximas a la membrana basal, que según Hernández y Uribe (2012) corresponderían con espermatogonias (**Figuras 13b y 15a**); 2) los espermatocitos que presentan morfología esférica con un núcleo redondeado que está sometido a diferentes cambios morfológicos según avanza el proceso de meiosis I (Hernández y Uribe 2012); 3) las espermátidas que presentan morfología esférica, reducido tamaño, y una localización próxima a la luz del túbulo. Según Gribbins et al. (2009) las espermátidas presentan hasta 7 estadios diferentes de maduración; sin embargo, hemos observado solamente dos: a) primer estadio caracterizado por la presencia de un núcleo totalmente esférico y cromatina dispersa (**Figura 13b**) y b) quinto estadio con el núcleo estirado totalmente adquiriendo morfología cilíndrica una vez formado el sistema acrosómico, sin formarse el flagelo (**Figura 13b**); 4) las células de Sertoli (**Figuras 13b y 15a**), estas células no forman parte de la serie epitelial germinativa pero se ubican en el interior del túbulo seminífero adosadas a la membrana basal, presentan citoplasma irregular y de gran tamaño, núcleo esférico y nucléolo prominente. El número de células de Sertoli es mayor en épocas de inactividad sexual, en la fase de regresión

testicular, y están relacionadas con la sustentación del epitelio seminífero, fagocitosis de cuerpos residuales dejados por espermatozoides y gonias, síntesis de hormonas esteroideas (Mahamud, 1984) y la síntesis en pequeñas cantidades de testosterona (Bardin et al., 1988; Callard et al., 1976; Dubois et al., 1988). No se apreciaron espermatozoides en la luz del túbulo seminífero lo que indica, teniendo en cuenta la época de captura, que los ejemplares estudiados se encuentran en el periodo de transición (diciembre y abril); es decir, aquella fase del ciclo sexual situada entre las fases de actividad sexual (abril-julio) y de reposo (agosto-diciembre) (Mahamud, 1984).

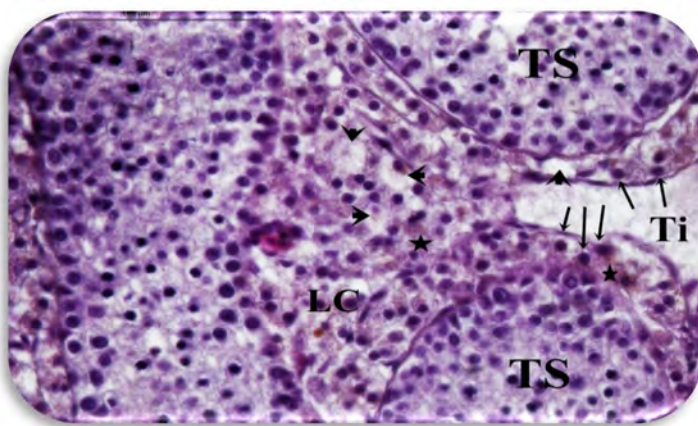


Figura 14. Sección de parafina de testículo teñido con HE. Tejido intersticial (Ti) ubicado entre 3 túbulos seminíferos (TS), delimitados por sus láminas basales, mostrando las células de Leydig (LC) agrupadas formando islotes con núcleos esféricos e hiper Cromáticos (→). En el citoplasma de estas células se aprecian gotas lipídicas de gran tamaño (▶) rodeando al núcleo y gránulos de secreción (★) (40x). Barra de escala: 100µm.

El tejido intersticial se localiza entre los túbulos seminíferos (**Figura 14**) y presenta las características del tejido conectivo laxo. Inmerso en éste conectivo se observan islotes de 4 – 5 células identificadas como células de Leydig cuya característica más llamativa es la presencia de vesículas lipídicas en su citoplasma (**Figura 15b**); su número está relacionado con el desarrollo del túbulo seminífero, siendo alto en la época de actividad sexual y reducido en periodos invernales (Mahamud, 1984) e indicando la presencia de lípidos actividad esteroidogénica con la síntesis de hormonas del tipo de los andrógenos (testosterona) responsable de los comportamientos reproductivos y el cortejo (Boretto et al., 2010). El núcleo presenta una posición excéntrica. En las regiones próximas a estas células es notable la presencia de capilares sanguíneos de pequeño tamaño (**Figura 15b**). A nivel ultraestructural (**Figura 15c**) el citoplasma de la célula de Leydig presenta diversos gránulos de diferente morfología y tamaño, así como gotas de lípidos de gran tamaño. El núcleo lateralizado, presenta gránulos dispersos de cromatina repartidos aleatoriamente y tiene morfología alargada e irregular.

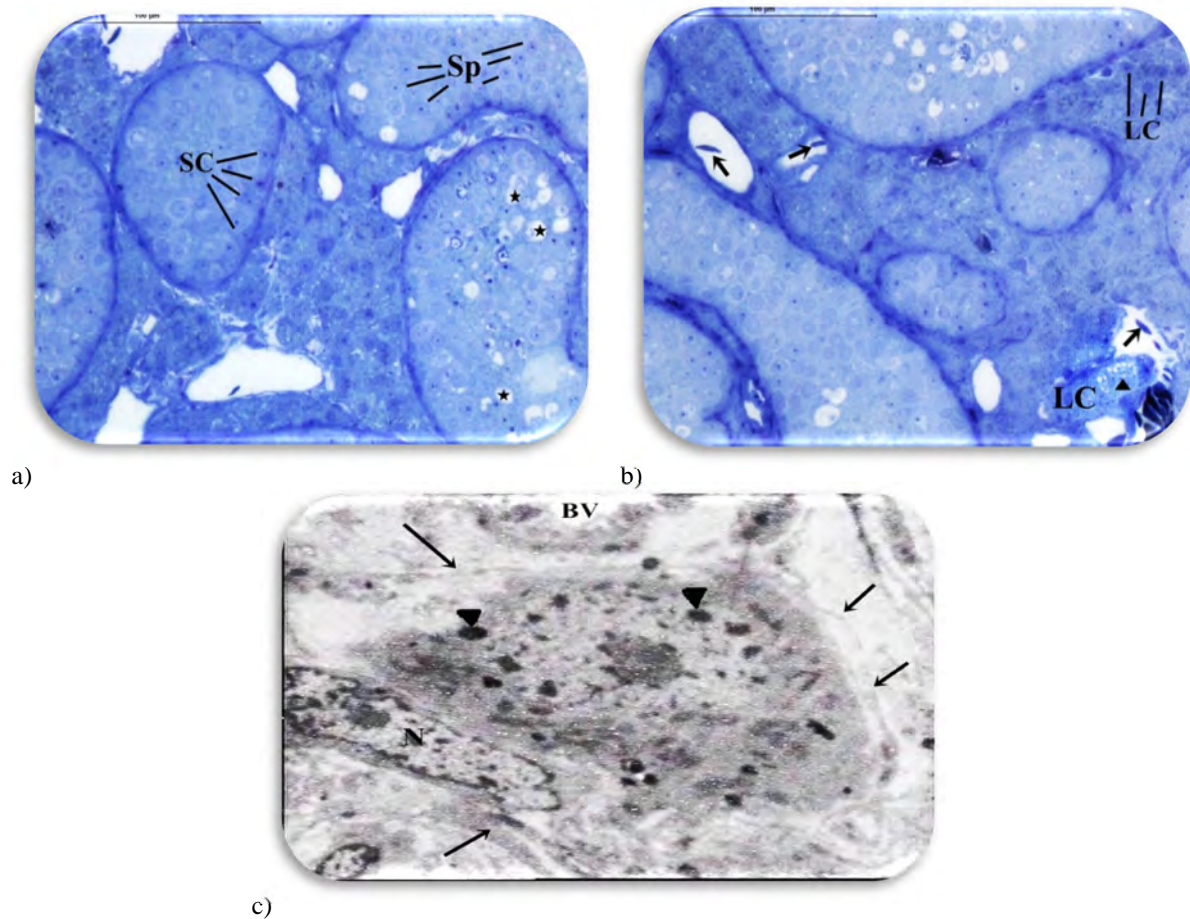


Figura 15. Secciones semifinas y ultrafinas de testículo. (a) Túbulos seminíferos en cuyo interior se aprecian las células de Sertoli (SC) con núcleos esféricos, próximos a la membrana basal, con citoplasma irregular y algunas vacuolas (★) que indican procesos de fagocitosis; espermatogonias (Sp) esféricas y uninucleoladas distribuidas en las medianías y próximas a la lámina basal (40x). (b) Células de Leydig (LC) con citoplasma irregular y alargado con inclusiones lipídicas (▲) próximas a capilares con eritrocitos (→) (40x). (c) El citoplasma de la célula de Leydig presenta diversos gránulos de diferente morfología y tamaño (▼), así como gotas de lípidos de gran tamaño (★). El núcleo lateralizado, presenta gránulos dispersos de cromatina repartidos aleatoriamente y tiene morfología alargada e irregular. En el espacio intersticial abundan las fibras de colágeno (→) y capilares (VB) encargados de recoger la secreción hormonal (3000x). Barras de escala: a) y b) 100µm.

El testículo presenta dos tipos celulares con actividad esteroidogénica: las células de Leydig y las células de Sertoli. Estas células están presentes en todos los grupos de vertebrados y comparten una serie de características ultraestructurales: 1) alto desarrollo del REL, 2) variación en el contenido de gotas de lípidos en el citoplasma y 3) mitocondrias con cristales tubulo-vesiculares (Dubois et al., 1988; Ferreira y Dolder, 2003; Ibarguengoytía et al., 1999; Lofts y Tsui, 1977; Mahmoud et al., 1985; Mahmoud y Licht, 1997). La principal fuente de testosterona en los machos procede de las células de Leydig siendo recogida directamente por los capilares del espacio intersticial para viajar a la circulación sistémica y de ahí, viajar a los órganos diana originando comportamientos como son el apareamiento y el cortejo (Callard et al., 1976; Dubois et al., 1988; Mahmoud et al., 1985). Por el contrario, las células de Sertoli sintetizan testosterona en cantidades mínimas que nunca llegan al torrente general quedando

retenida en el túbulo seminífero y siendo responsable del mantenimiento y la sincronización de la espermatogénesis.

3.3. Ovario.

Macroscópicamente los ovarios se presentan como órganos pares, situados en el interior de la cavidad abdominal cerca de la pelvis, presentando forma oval y aspecto racimoso y color amarillo. Próxima a su superficie dorsal se encuentra la glándula adrenal.

El ovario de los ejemplares capturados presenta dos tipos de folículos: previtelogénicos y vitelogénicos, distinguibles gracias a su tamaño, grosor de las diferentes capas que componen su histología, cantidad de vitelo y transformación del ooplasma (Vieira et al., 2010). Los folículos previtelogénicos presentan una estructura exclusiva de la vitelogénesis formada por la agregación de diferentes moléculas como ARN, gotas de lípidos y algunos orgánulos citoplásmicos el denominado cuerpo vitelino de Balbiani (De Smedt et al., 2000; Guraya, 1979; Hubbard, 1893; Jaglarz et al., 2003); cuya función es bien conocida en especies lecitotróficas (con amplia reserva de vitelo en el oocito), que agrupa a la mayoría de los reptiles, como encargado de inducir la transformación del ooplasma previa a la vitelogénesis (Guraya, 1989); sin embargo, en especies placentotróficas (escasa reserva de vitelo en el oocito) su función es desconocida y su desarrollo mínimo (De Smedt et al., 2000).

Dentro de los folículos previtelogénicos observamos dos tipos: 1) *Folículos primarios* (folículos I) (**Figura 16**) con una teca conjuntiva poco desarrollada y formada por una fina capa de tejido conectivo denso con algunos fibroblastos y capilares (**Figura 16a**), a diferencia del epitelio folicular pluriestratificado y agrupado de la capa granulosa. El epitelio folicular I está compuesto por 2 tipos celulares diferentes (Estrada et al., 1990; Farag, 1983; Motta et al., 1996; Sanz-Ochotorena et al., 2001; Uribe et al., 1996): 1) células piriformes con núcleo esférico, uninucleoladas, de gran tamaño y con algunos gránulos de cromatina dispersos (**Figura 16 b**) y 2) células basales cuyos núcleos esféricos, de pequeño tamaño, presentan gran cantidad de gránulos y se observan localizados en la zona basal de la célula (**Figura 16b**). La zona pelúcida de los folículos I se ubica en una posición intermedia, separando el epitelio folicular del ooplasma, y presenta escaso grosor (**Figura 16**). Por su parte, el ovocito ocupa la mayor parte del folículo y se compone del ooplasma, que agrupa al cuerpo vitelino de Balbiani, y un núcleo esférico en posición excéntrica, con algunos gránulos de cromatina dispersa y aspecto reticular (**Figura 16**). 2) *Folículos secundarios* (folículos II) (**Figura 17**) con una organización histológica similar a la de los folículos I, mostrando un mayor desarrollo del epitelio folicular.

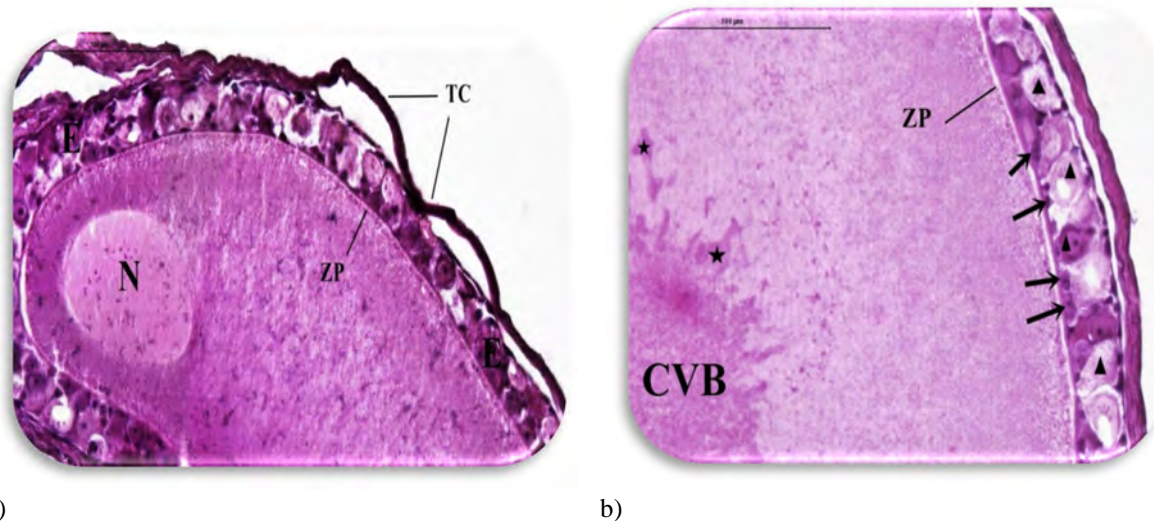


Figura 16. Cortes de parafina de un folículo I teñidos con HE. (a) La teca conjuntiva (TC) que rodea al epitelio folicular (E). N= núcleo del ovocito mostrando escasos gránulos (40x). (b) Detalle del epitelio folicular mostrando las células piriformes (▲) uninucleadas de citoplasma claro y las células basales con núcleos hiper cromáticos de aspecto aplastado (→) (40x). En el ooplasma observamos el cuerpo vitelino de Balbiani (CVB) con algunos cuerpos densos (★). ZP = zona pelúcida. Barras de escala: a) y b) 100 μ m.

Presentan una teca externa de gran grosor con varias capas de tejido conectivo irrigada por una mayor cantidad de capilares (**Figura 17a**). La teca interna es muy delgada y presenta una monocapa de células musculares lisas alargadas y aplastadas en contacto directo con algunos capilares sanguíneos.

Las células piriformes del folículo II (**Figura 17a**) son de gran tamaño con forma de matraz, su citoplasma es amplio y presenta contenido granular, su núcleo es esférico y tiene una localización excéntrica. Las células basales (**Figura 17a**) presentan un aspecto alargado e irregular y se localizan, preferentemente, en la zona basal del epitelio folicular. La zona pelúcida del folículo II (**Figura 17a**) ese presenta más gruesa que lo observado en el folículo I, localizándose entre el epitelio folicular y el ooplasma (**Figura 17a**). El ooplasma sufre un grado de transformación muy grande que permite diferenciar varios estados de maduración del folículo II con la presencia de plaquetas vitelinas de aspecto columnar (**Figura 17b**) distribuidas por todo el ooplasma encargadas de almacenar la vitelogenina captada del torrente sanguíneo e hidrolizada tras la acción lisosomal (Guraya, 1989; Lodish et al., 2003), y vacuolas originadas en la periferia que se dirigen progresivamente a la zona central quedando el cuerpo vitelino de Balbiani relegado a la zona central (**Figura 17c**).

Dentro de los folículos vitelogénicos se ha observado un solo tipo, el folículo terciario (folículo III) (**Figuras 18 y 19**). Los cambios más importantes se observan a nivel de ooplasma con la aparición de plaquetas vitelinas de aspecto columnar y color blanquecino (**Figura 18a**) y la presencia de gránulos esféricos muy pequeños generados en la zona periférica que tras procesos

de fusión aumentan de tamaño y se distribuyen progresivamente hasta la zona ecuatorial del ovocito (**Figura 18b**).

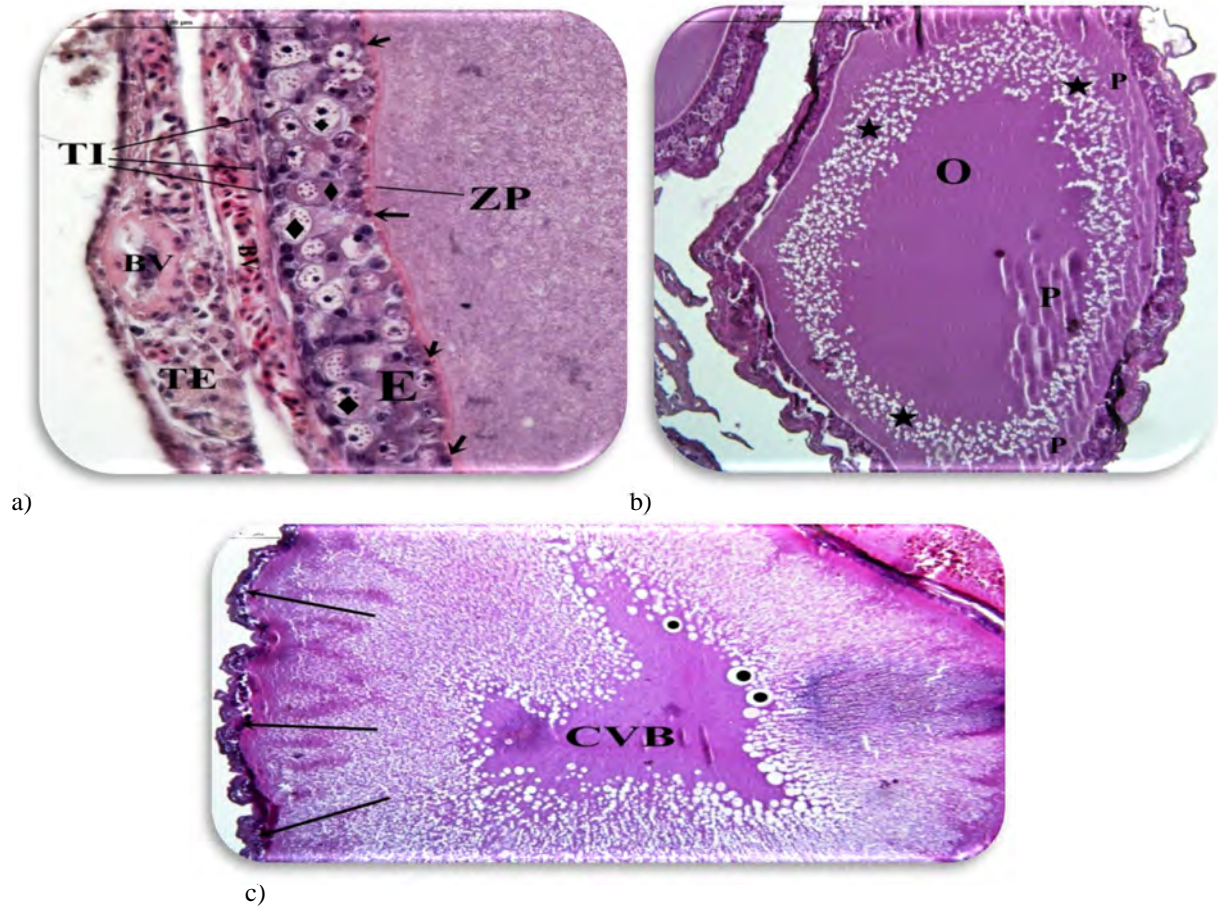
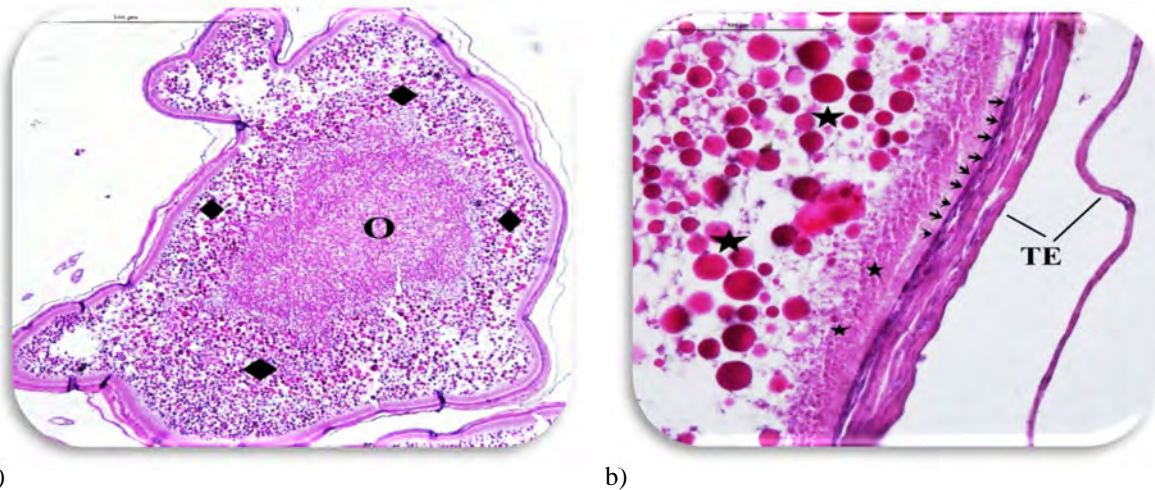


Figura 17. Cortes de parafina de un folículo II teñidos con HE. (a) La teca externa (TE) presenta un alto grado de desarrollo y en ella se observan algunos capilares (BV). La teca interna (TI) se encuentra muy reducida y formada por células de aspecto aplastado (→). El epitelio folicular (E) está compuesto por las células piriformes, cuyo citoplasma es irregular y su núcleo presenta gránulos de cromatina dispersa y es uninucleolado (◆), y las células basales (→) ubicadas encima de la zona pelúcida (ZP) (40x). (b) Maduración temprana del ovocito con signos de vacuolización (★) en el ooplasma (O) y plaquetas vitelinas de aspecto columnar (P) en la periferia y en la zona central del ooplasma (10x). (c) Maduración avanzada del ovocito con el cuerpo vitelino de Balviani (CVB) relegado a la zona central rodeado de vacuolas (●). Se aprecia una reducción importante en el desarrollo de la teca externa y el epitelio folicular (←) (10x). Barra de escala: a), b) y c) 100µm.

En los cortes semifinos se distinguen tres tipos de gránulos ooplasmáticos en el folículo III (**Figura 19b**) que sirven de almacén de la vitelogenina un lipoproteína esencial de síntesis hepática que constituye el principal componente del vitelo junto con otras sustancias proteicas:

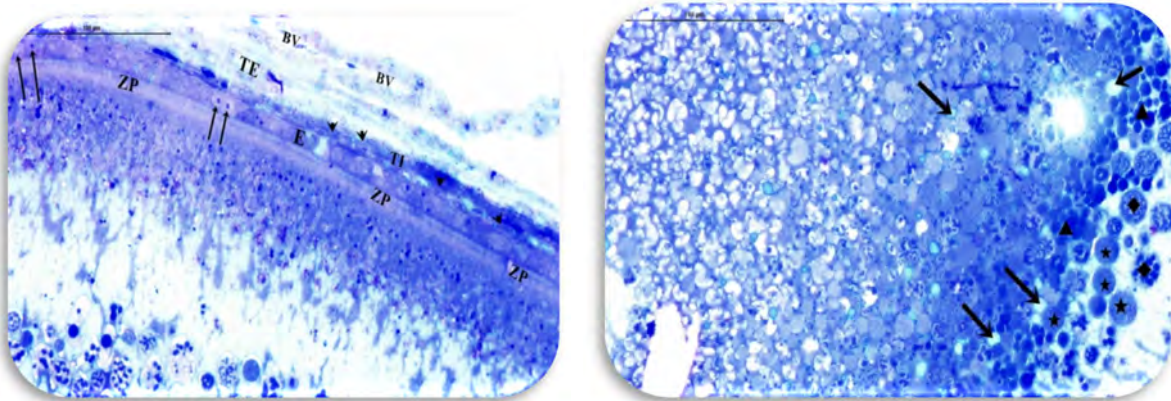
- 1) gránulos totalmente opacos con alto contenido en vitelogenina,
- 2) gránulos de densidad media con algunas gotas de vitelogenina que se van fusionando entre sí y
- 3) gránulos de baja densidad con escaso contenido en esta lipoproteína.



a)

b)

Figura 18. Secciones de parafina de un folículo III teñidas con HE. (a) Ovocito en estado avanzado de maduración, cuyo ooplasma (O) está invadido por gránulos esferoidales (◆) y prácticamente ha desaparecido (10x) (b) El epitelio folicular (E) se reduce a una capa de células basales (→), mientras que la teca externa no presenta irrigación vascular (TE). Mayor detalle de la morfología esférica y diferente tamaño de los gránulos (★) que se originan en la zona cortical y difunden hacia el centro del ooplasma (40x). Barras de escala: a) y b) 100µm



a)

b)

Figura 19. Cortes semifinos de ovario teñidos con azul de Toluidina mostrando el ooplasma y la región externa (epitelio folicular y tecas) de un folículo III. (a) Teca externa (TE) de tejido conectivo laxo, capilares (BV). La teca interna (TI) con fibras musculares lisas fusiformes orientadas longitudinalmente (▼). Epitelio folicular (E) de escaso desarrollo con células piriformes (→) de citoplasma escasamente granular y uninucleoladas. La zona pelúcida, (ZP) se encuentra muy desarrollada (40x). (b) Diferentes tipos de gránulos esferoidales que pueden ser densos (▲), claros (★) ó mixtos (◆) generados en la región cortical del ooplasma junto con algunas gotas de lípidos (→) (40x). Barras de escala: a) y b) 100µm.

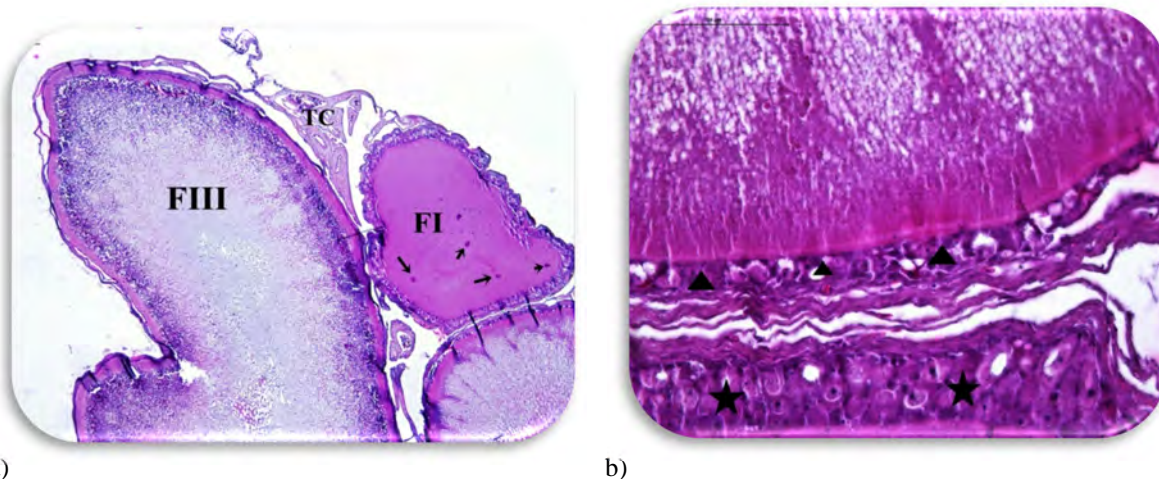


Figura 20. Secciones de parafina, teñidas con HE, donde se comparan distintos folículos ováricos. (a) Diferencias de tamaño, grosor y transformación a nivel de ooplasma entre un folículo I (FI) y un folículo III (FIII). La aparición de cuerpos densos (→) es evidente en el ooplasma del FI, a diferencia del ovocito del folículo III invadido por gránulos esferoidales. Las fibras de tejido conectivo (TC) sirven de comunicación entre ellos y se encuentran irrigadas por algunas capilares (5x). (b) Diferencia en el grado de desarrollo epitelial entre un folículo II (★) y uno III (▲) (40x). Barras de escala: a) y b) 100µm.

4. CONCLUSIONES.

El estudio histológico de los órganos secretores de esteroides en el lacértido *Gallotia galloti* nos ha permitido concluir que:

- 1) La glándula adrenal de *Gallotia galloti* se compone de dos tejidos diferentes: el tejido cromafín y el tejido esteroidogénico.
- 2) A diferencia de lo que ocurre en mamíferos el tejido cromafín y el tejido esteroidogénico no se organizan en una corteza y médula propiamente dicho. El tejido cromafín forma un casquete dorsal que se extiende entre los dos vasos principales que flanquean a la glándula y recubre parte del tejido esteroidogénico, que es el que ocupa la mayor parte de la glándula. Además, el tejido cromafín forma islotes dispersos en el tejido esteroidogénico. La distribución de los tejidos adrenales en la glándula de *Gallotia galloti* es similar a lo descrito para reptiles de los órdenes Rhynchocephalia y Squamata, si bien la extensión de este estudio no ha permitido determinar a cuál de ellos se asemeja más.
- 3) A nivel ultraestructural las células cromafines presentan características de células catecolaminérgicas con la presencia de abundantes gránulos electrodensos y algunas vesículas de contenido claro; siendo necesarios estudios posteriores para su caracterización como células adrenérgicas o noradrenérgicas. Por su parte, las células esteroidogénicas presenta vesículas lipídicas de pequeño tamaño distribuidas por todo el citoplasma junto con un retículo endoplasmático muy desarrollado.

- 4) En la época en la que se capturaron los ejemplares usados para este estudio, el ovario de *Gallotia galloti* está formado por dos tipos de folículos: 1) previtelogénicos caracterizados por una teca externa muy desarrollada, una capa granulosa pluriestratificada -compuesta por células basales y piriformes- y un ooplasma ocupado por plaquetas vitelinas de aspecto columnar y distribuidas en la zona central y 2) vitelogénicos cuya capa granulosa se reduce a un estrato de células basales hipercromáticas de aspecto irregular, estando la zona interna del ooplasma ocupada por gránulos esféricos de tamaño variable y gotas lipídicas. La naturaleza de los folículos y la aplicación de criterios morfológicos no permitió caracterizar células de secreción esteroidea en los ovarios utilizados para este estudio.
- 5) En *Gallotia galloti* los túbulos seminíferos que constituyen el testículo se encuentran separados entre sí por sus respectivas láminas basales dejando un espacio intersticial compuesto, principalmente, por tejido conjuntivo laxo, islotes de células de Leydig y vasos sanguíneos. La organización histológica del testículo de *Gallotia galloti* no presenta grandes variaciones respecto a lo descrito para mamíferos. El número de tipos celulares diferentes que constituye la pared de los túbulos seminíferos indica que los especímenes analizados se encuentran en la etapa de transición del ciclo sexual.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1) **Abelli, L., Gallo, V., Civinini, A. y Mastrolia, L., 1996.** Immunohistochemical and ultrastructural evidence of adrenal chromaffin cell subtypes in sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *General and Comparative Endocrinology*. 102:113–122.
- 2) **Accordi, F. y Gallo, V., 1982.** Adrenaline, noradrenaline and small granule containing cells in the adrenal gland of *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura) *Journal of Anatomy*. 135:5-12.
- 3) **Accordi, F., Grassi Milano, E. y Gallo, V., 1984.** Adrenal gland of *Euproctus* (Urodela, Salamandridae): comparison of three species and phylogenetic inferences. *Journal of Anatomy*. 139: 209-214.
- 4) **Balfour, F., 1876.** On the development of elasmobranch fishes. *Journal of Anatomy Physiology*. 10: 377-411.
- 5) **Bardin, C., Cheng, C., Musto, N. y Gunsalus, G., 1988.** The Sertoli cell. *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil, E., Neill, J. Páginas 933-974. Raven Press, New York.
- 6) **Bentley, P., 1976.** Comparative morphology of the endocrine tissue. En: *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge University Press. Capítulo 2, páginas 29-39. Cambridge. Great Britain.
- 7) **Boretto, J. Ibargiuengoytia, N. Jahn, G. Acosta, J. Vincenti, A. y Fornés, M., 2010.** Asynchronic steroid activity of Leydig and Sertoli cells related to spermatogenic and testosterone cycle in *Phymaturus antofagastensis*. *General and Comparative Endocrinology*. 166:556–564
- 8) **Burgoyne, R., 1991.** Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1071:174–202.
- 9) **Callard, I., Callard, G., Lance, V. y Eccles, S., 1976.** Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotropins in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. *General and Comparative Endocrinology*, 30, 347–356.
- 10) **Coupland, R., 1971.** Subcellular organization and function in endocrine tissues. *Society for Endocrinology*, 19, 611-635.
- 11) **Coupland, R. y Weakley B., 1968.** Developing chromaffin tissue in the rabbit: an electron microscopic study. *Journal of Anatomy*, 102:425–455.
- 12) **Chester Jones, I. y Mosley, W., 1980.** The interrenal gland in Pisces. In: Chester Jones I, Henderson IW, editors. *General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex*, vol. 3. New York: Academic Press. 396–472.
- 13) **Crivellato, E., Civinini, A. y Gallo, V., 2006.** Express Piecemeal Degranulation in Response to Osmotic Stress: A Hint for a Conservative Evolutionary Process. *The Anatomical Record*. 288:1077–1086

- 14) **Davis, J., 1975.** Regulation of aldosterone secretion. Handbook of Physiology. R.O. Greep y E.B. Astwood, páginas 77-106. Washington D.C. USA.
- 15) **Davison, B., Large, D., Anderson, D. y Robertson W., 1983.** Basal steroid production by the zona reticularis of the guinea-pig adrenal cortex. *Journal of steroid Biochemistry*, 18: 285-290.
- 16) **De Falco, M., Sciarrillo, R., Virgilio, F., Fedele, V., Valiante, S., Laforgia, V. y Varano, L., 2004.** Annual variations of adrenal gland hormones in the lizard *Podarcis sicula*. *Journal Comparative Physiology A.*, 190: 675-681.
- 17) **De Smedt, V. Söllözi, D. y Kloc, M., 2000.** The Balbiani body: Asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*, 26:208–212.
- 18) **Dubois, W., Pudney, J. y Callard, I., 1988.** The annual testicular cycle in the turtle, *Chrysemys picta*: a histochemical and electron microscopic study. *General of Comparative Endocrinology*, 71: 191–204.
- 19) **Estrada-Flores, E. Villagrán-Santa Cruz, M. Méndez, F. y Casas-Andreu G., 1990.** Gonadal changes throughout the reproductive cycle of the viviparous lizard *Sceloporus mucronatus* (Sauria: Iguanidae). *Herpetologica*, 46:43–50.
- 20) **Eyeson, K., 1971.** The role of pituitary gland in testicular function in the lizard *Agama agama*. *General and Comparative Endocrinology*, 16: 342-355.
- 21) **Farag A., 1983.** Histology of the ovary of the viviparous Wiegmanns skink *Mabuya brevicollis* during its gestation period. *Annual Zoology*. 20:147–165.
- 22) **Ferreira, A. y Dolder, H., 2003.** Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochemica*, 105:339–352.
- 23) **Gabe, M., Martoja, M. y Saint-Girons, H., 1964.** Etat actuel des connaissances sur la glande surrénale des Reptiles. *Anée Biologie*, 3: 303-376.
- 24) **Gallo, V. y Civinini, A., 2003.** Survey of the adrenal homolog in teleosts. *International Review of Cytology*, 230:89–187.
- 25) **Gallo, V. y Civinini, A., 2005.** The development of adrenal homolog of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Anatomy and Embryology*, 209:233–242.
- 26) **Giroud, C., Stachenko, J. y Venning, E., 1956.** Secretion of aldosterone by the zona glomerulosa of rat adrenal glands incubated in vitro. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine* 92: 154-158.
- 27) **Grassi Milano, E. y Accordi, F., 1983.** Comparative morphology of the adrenal gland of anuran Amphibia. *Journal of Anatomy*, 136: 165-174.
- 28) **Gribbins, K., 2011.** Reptilian Spermatogenesis. A Histological and Ultrastructural Perspective. *Spermatogenesis*, 1:250-269.
- 29) **Gribbins, K., Rheubert, J., Poldemann, E., Collier, M., Wilson, B. y Wolf, K., 2009.** Continuous spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the Jamaican Gray Anole, *Anolis lineatopus*. *Theriogenology*, 72:484–492.
- 30) **Guraya S., 1979.** Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. *International Review of Cytology*, 59:249–321.
- 31) **Guraya S., 1989.** Ovarian Follicles in Reptiles and Birds. Berlin: Springer.
- 32) **Hahn, E., 1967.** Estradiol-induced vitellogenesis and concomitant fat mobilization in the lizard *Uta stansburiana*. *Comparative Biochemical Physiology*. 23: 83-93.
- 33) **Hanke, W., 1978.** The adrenal cortex of Amphibia. En: Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex. Jones y Henderson (eds.) vol.2: 419-195. Academic Press. New York.
- 34) **Harrison, G., Wierman, M.E., Nett, T. y Globe, L., 2004.** Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocrine-Related Cancer*, 11 725-748.
- 35) **Hartmann, F. y Brownell, K., 1949.** The adrenal gland. Kimpton, London.
- 36) **Herbison, A.E., 1998.** Multimodal Influence of Estrogen upon Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrine Reviews*, 19:302-330.
- 37) **Hernández, A. y Uribe, M., 2012.** Seasonal Spermatogenic Cycle and Morphology of Germ Cells in the Viviparous Lizard *Mabuya brachypoda* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*. 273:1199–1213.
- 38) **Hodges, R., 1974.** The Histology of the Fowl. Academic Press, New York, NY.
- 39) **Huang, C., Liu, C. y Yao, H., 2012.** Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 361:165-171
- 40) **Hubbard, J., 1893.** The yolk nucleus in *Cymatogaster aggregatus*. Proceedings of the American Philosophical Society American Philosophical Society 33:74–83.
- 41) **Huber, K., 2006.** The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Developmental Biology* 298:335–343.
- 42) **Ibargüengoytía, N. Pastor, L y Pallares, J., 1999.** A light microscopy and ultrastructural study of the testes of tortoise *Testudo graeca* (Testudinidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 31: 221–230.
- 43) **Jaglarz, M.K.; Nowak, Z y Bilinski, S.M., 2003.** The Balbiani body and generation of early asymmetry in the oocyte of tiger beetle. *Differentiation*. 71:142.151.

- 44) **Kawamura, K., 1985.** Identification of acid mucopolysaccharides in summer cells in adrenal glands of the frog *Rana catesbeiana*. *Zoological Science*, 2:739-747.
- 45) **Kobayashi, S. y Coupland, R., 1977.** Two populations of microvesicles in the SGC (Small granule chromaffin) cells of the mouse adrenal medulla. *Archivum Histologicum Japonicum*, 40, 251-259.
- 46) **Kober, A., Aoyama, M. y Sugita, S., 2010.** Immunohistochemical localization of catecholamine biosynthetic enzymes in the adrenal gland of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Poultry Science*, 89:1709-1715
- 47) **Licht, P., 1970.** Effects of mammalian gonadotropins (ovine FSH y LH) in female lizards. *General and Comparative Endocrinology*. 22:448-453.
- 48) **Licht, P. y Crews, D.P., 1975.** Stimulation of ovarian and oviducal growth and ovulation in female lizards by reptilian (Turtle) Gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 25: 467-471.
- 49) **Licht, P. y Tsui, H., 1975.** Evidence for the intrinsic activity of ovine FSH on spermatogenesis, ovarian growth, steroidogenesis and ovulation in lizards. *Biology of Reproduction*, 12(3):346-50.
- 50) **Lipner, H., Hirsch, M., Mougald, R., Mac-Donald, J., Ying, S. y Greep, O., 1974.** Ovulating- inducing activity of FSH in the rat. *Endocrinology*. 94: 1351-1363.
- 51) **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaria, P., Baltimore, D. y Darnell, J., 2003.** Molecular Cell Biology. Scientific American Books Eds. Páginas: 300-304. Nueva York, USA.
- 52) **Lofts, B. y Tsui, H., 1977.** Histological and histochemical changes in the gonads and epididymides of the male Soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*. *Journal of Zoology*. 181: 57-68.
- 53) **Mahamud R., 1984.** El ciclo sexual de *Gallotia galloti eisentrauti*; Variaciones histológicas en el aparato reproductor y órganos accesorios. Memoria de Tesina de Licenciatura para optar al título de licenciado en la Universidad de La Laguna, España.
- 54) **Mahmoud, I., Cyrus, R., Bennett, T., Woller, M. y Montag, D., 1985.** Ultrastructural changes in testes of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, in relation to plasma testosterone, D5-3b-hydroxysteroid dehydrogenase, and cholesterol. *General of Comparative Endocrinology*, 57:454-464.
- 55) **Mahmoud, I. y Licht, P., 1997.** Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *General of Comparative Endocrinology* 107, 359-372.
- 56) **Marschall, C. y Hist, D., 1973.** Glycolytic and lipolytic effects on ovine FSH and estradiol-17 β in the lizard *Anolis carolinensis*. *Copeia*. 3: 465-472.
- 57) **Mastrolia, Gallo V. y La Marca A., 1981.** Adrenal homologue in *Scardinius erythrophthalmus* (Teleostei, Cyprinidae): light and electron microscopic observations. *Bollettino di Zoologia*, 48:127-138.
- 58) **Mitani, F. 2014.** Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proceedings of the Japan Academy Ser.* 90:163-183.
- 59) **Mitani, F., Mukai, K., Miyamoto, H., Suematsu, M. y Ishimura, N., 1999.** Development of Functional Zonation in the Rat Adrenal Cortex. *Endocrinology*. 140: 3342-3353.
- 60) **Motta, C. Filosa, S. y Andreuccetti, P., 1996.** Regression of the epithelium in the late previtellogenic follicles of *Podarcis sicula*: a case of apoptosis. *Journal of Experimental Zoology* 276:233-241
- 61) **Nishikawa, T. y Strott, C., 1984.** Steroid concentrations in the outer and inner zones of the adrenal cortex of the guinea pig. *Journal of steroid Biochemistry*. 20: 1123-1127.
- 62) **Nussey, S. y Whitehead, S., 2001.** Endocrinology. An integrated approach. St. George's Hospital Medical School, Oxford: BIOS Scientific Publishers. London, UK.
- 63) **Osawa, G., 1897.** Beiträge zur lehre von den Eingeweiden der *Hatteria punctata*, *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 49:481-691.
- 64) **Perry, S., Fritsche, R. y Thomas S., 1993.** Storage and release of thecatecholamines from the chromaffin tissue of the Atlantic hagfish *Myxine glutinosa*. *Journal of Experimental Biology*, 183:165-184.
- 65) **Petit, A., 1896.** Recherches sur les capsules surrénales. *Journal of Anatomy Physiology*, 32: 301-362.
- 66) **Rao, A., Mougald, R., Raj, H., Lipner, H. y Greep, R., 1974.** The role of FSH and LH in the initiation of ovulation in rats and hamsters: a study using the rabbit antisera to ovine FSH and LH. *Journal of Reproduction and Fertility*. 37: 323-330.
- 67) **Rocha, R., Leme-Dos Santos, H., Vicentini, C. y Da Cruz, C., 2001.** Structural and Ultrastructural Characteristics of Interrenal Gland and Chromaffin Cell of *Matrixã, Brycon cephalus* Gunther 1869 (Teleostei-Characidae). *Anatomia, Histologia, Embyologia*. 30:351-355.
- 68) **Sanz-Ochotorena, A., Moncada, F. y Uribe, M., 2001.** Definición de los ciclos gonádicos de tres especies de reptilia mediante el análisis de sus características histológicas. Nuevos Retos de la Docencia y la Investigación en Histología. Editores: Uribe M y García, M. Páginas: 1616-170. México, DF.
- 69) **Schwartz, B., 1974.** The role of FSH and LH of their antibodies on follicle growth and on ovulation. *Biology of Reproduction*, 10: 236-272.
- 70) **Sierra, E., Espinosa de los Monteros, A., Real, F., Herráez, P., Castro, P. y Fernández, A., 2011.** Histología y patología de los peces. Parte 1: Biología y necropsia de los peces. *Revista canaria de las ciencias veterinarias.*, 1:44-51.

- 71) **Simpson, S., 1937.** Physiology of the Adrenal Gland. *The British Medical Journal*. 30:229-232.
- 72) **Spurr A., 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research*. 26:31-43.
- 73) **Thakur, D. y Shrivastava, R., 1975.** Investigation of the presence of chromaffin tissue in the ovary of the percoid fish, *Nandus*. *Acta Histochemica*, 52:35-40.
- 74) **Unsicker, K., 1973.** Fine structure and innervation of the avian adrenal gland. I. Fine structure of adrenal chromaffin cells and ganglion cells. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 145, 389-416.
- 75) **Unsicker, K., 1976.** Chromaffin, small granule-containing and ganglion cells in the adrenal gland of reptiles. *Cell and Tissue Research*. 165: 477-508.
- 76) **Unsicker, K., Polonius, T., Lindmar, R., Löffelholz, K. y Wolf, U., 1977.** Catecholamine and 5-hydroxytryptamine in *corpuscles of Stannius* of the salmonid, *Salmo irideus L*: a study correlating electron microscopical, histochemical and chemical findings. *General of Comparative Endocrinology*, 31:121-132.
- 77) **Uribe M., Portales, G. y Guillette, L., 1996.** Ovarian folliculogenesis in the oviparous Mexican lizard *Ctenosaura pectinata*. *Journal of Morphology*. 230:99-112.
- 78) **Varano, L. y Laforgia, V., 1991.** Evolutionary trends in the adrenal gland of reptiles. Symposium on the evolution of terrestrial vertebrates. Editores: Ghiara et al. Páginas: 291-303. Modena, Italia.
- 79) **Vieira, S. Romero de Pérez, G. y Ramírez-Pinilla, M., 2010.** Ultrastructure of the Ovarian Follicles in the Placentotrophic Andean Lizard of the Genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae) *Journal of Morphology*. 271:738-749
- 80) **Vines, H., 1938.** The adreno-genital syndrome: some histological observations. Adrenal Cortex and Intersexuality. Editores: L.R. Broster, C. Allen, H.W.C.Vines, J. Patterson, A.W. Greenwood, G.F. Marrian y G.C. Butler, páginas 137-190. London, England.
- 81) **Zuckerkindl, E., 1901.** Ueber nebenorgane des sympathicus im retroperitonealraum des menschen. *Verhandlungen der Deutschen Anatomischen Gesellschaft.*, 15:95-107.

Páginas web consultadas ordenadas según se citan en el texto:

- ¹<http://www.uv.es/~jaguilar/historias/etimol.html>.
- ²<http://themedicalbiochemistrypage.org/es/steroid-hormones-sp.php>.
- ³<http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/hirsutismo>.
- ⁴<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001669.htm>.
- ⁵<http://www.webfisio.es/fisiologia/endocrino/textos/catecolaminas.htm>.
- ⁶<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijacion.php>.
- ⁷<http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-parafina.php>

Páginas webs consultadas ordenadas según se cita en figuras y tablas:

- <http://www.studyblue.com/notes/note/n/bc2-07-08-cholesterol-and-steroid-metabolism/deck/1052359>.
<http://intensivos.uninet.edu/29/2906.htm>.
<http://www.mind-body-health.net/index.html?hpa.html&l>.
http://www.ihcworld.com/_protocols/histology/fixatives.htm.

Estas páginas se consultaron en varias ocasiones a lo largo del periodo de realización del trabajo. Las páginas webs de las figuras y tablas no poseen superíndice, las citadas en el texto sí.

CONCLUSIONS

The histological study of steroid secretory glands from the reptil *Gallotia galloti* allows us to conclude the following:

- 1) The adrenal gland from *Gallotia galloti* comprises two types of tissues: steroidogenic tissue and chromaffin tissue.
- 2) In contrast with mammals *Gallotia galloti* adrenal tissues are not arranged in cortex and medulla. In fact; chromaffin tissue has been found to extend between the two main blood vessels that flank the gland forming a dorsal cap that partially covers the steroidogenic tissue, being the last the tissue that fills the most part of the gland. In addition, chromaffin tissue can be found forming islets scattered in the steroidogenic tissue. The distribution found for adrenal tissues resembles that described for reptiles of the order Squamata and Rhynchocephalia although the extent of this study did not allow us to determine which of them is closer.
- 3) At ultrastructural level the chromaffin cells display catecholaminergic cell characteristics such as the presence of electrondense granules and vesicles with clear content; further studies are necessary to characterize these cells as adrenergic or noradrenergic cells. Regarding steroidogenic cells, they display a highly developed endoplasmic reticulum and small lipid droplets randomly distributed throughout the cytoplasm.
- 4) At the time the lizards were captured, *Gallotia galloti* ovaries were found to have two types of follicles: 1) previtellogenic follicles that are characterized by a highly developed outer theca, a stratified granulosa layer -which in turn is composed by pyriform and basal cells- and an ooplasm that contains columnar yolk platelets located in the central region and 2) vitellogenic follicles that display a granulosa layer reduced to a single stratum of hyperchromatic and irregular shaped basal cells and an ooplasm that shows different sized spheroidal granules and lipid droplets. Due to the nature of the follicles and the morphological criteria applied we were unable to characterize steroidogenic cells in the ovaries used for this research.
- 5) In *Gallotia galloti* each testicular seminiferous tubule is surrounded by a basal lamina in such a way that between tubules we can find an interstitial space composed by loose connective tissue, Leydig cells and blood vessels. The histological organization of the testicle from *Gallotia galloti* shown in this study does not differ significantly from that described for mammals. The number of different cell types found to make up the wall of seminiferous tubules indicates that studied specimens are in the transition phase of the sexual cycle.