

31. Salud Animal

Efectos de la castración sobre las células intersticiales de hipófisis y médula adrenal

Gallol, Luis Ezequiel; Busolini, Fabricio Iván; Rosales, Gabriela Judith;

Orientador: Filippa, Verónica Palmira;

gallolezequiel@gmail.com; fabriciobusolini@gmail.com; gabirosales87@gmail.com;

vpfilipp@gmail.com;

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

Resumen

La adenohipófisis y la médula adrenal son componentes del sistema neuroendocrino de control del organismo que intervienen en numerosos procesos de regulación. Ambas glándulas presentan en el parénquima, células intersticiales con características gliales. La función de estas células no es del todo conocida, sin embargo, se ha sugerido que constituyen una red de comunicación intraglandular. En nuestro laboratorio utilizamos como modelo experimental para estudios de adaptación y reproducción a un roedor autóctono de amplia distribución en Sudamérica; el *Lagostomus maximus*. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la ausencia de andrógenos gonadales, mediante castración quirúrgica, sobre las células intersticiales de adenohipófisis y médula adrenal. Se realizó un estudio inmunohistoquímico y morfométrico de la expresión de proteína S-100, marcador específico de células gliales, y se analizaron estadísticamente los porcentajes de área inmunomarcada (%AI). En ambas glándulas, la proteína S-100 fue localizada en núcleo y citoplasma celular. En adenohipófisis, se observó también inmunomarcación extracelular coloidal. En los animales castrados, se observó una disminución significativa en el %AI total ($0,74 \pm 0.13$), %AI celular (0.53 ± 0.05) y %AI coloidal (0.21 ± 0.08), respecto del grupo control (%AI total $1,36 \pm 0.11$; %AI celular 0.89 ± 0.07 y %AI coloidal 0.47 ± 0.04). En médula adrenal el %AI exhibió un incremento significativo (6.05 ± 0.35) respecto al grupo control (3.95 ± 0.40). En conclusión, los cambios inmunomorfométricos de las células intersticiales en ambas glándulas demuestran sensibilidad a la carencia de andrógenos y sugieren participación de las mismas en procesos regulatorios de la actividad glandular.

Palabras Claves: Adenohipófisis, Médula Adrenal, Castración, Células Intersticiales, Proteína S-100.

Introducción

El sistema neuroendocrino de control está constituido por el conjunto de glándulas endocrinas en relación con estructuras pertenecientes al sistema nervioso que mediante la secreción de hormonas y neurotransmisores respectivamente, permiten una estrecha regulación de los procesos metabólicos del organismo (Toni, 2004). Dicha regulación afecta aspectos tales como la movilización de las reservas energéticas, crecimiento, comportamiento y reproducción; siendo esencial para la supervivencia de las especies (Moreno y Lanni, 2015; Müller, Locatelli y Cocchi, 1999; Toni, 2004). Las glándulas hipófisis y adrenal, presentan la característica de estar constituidas por tejidos de diferente origen embriológico. La hipófisis está formada por la adenohipófisis de origen ectodérmico y la neurohipófisis derivada del ectodermo neural (Herring, 1908). La glándula adrenal se organiza en una corteza de origen mesodérmico que rodea a una médula originada a partir de las células migratorias de la cresta neural (Parker, Mohamed y Afework, 1993; Yamamoto, Yanai y Arishima; 2004). Tanto en el parénquima adenohipofisario como en el adrenomedular se encuentran células intersticiales de aspecto glial, las cuales están en estrecha relación con las células secretoras de hormonas. En

adenohipófisis, estas células se conocen como células foliculoestrelladas (CFS) y constituyen la principal población de células no granuladas del parénquima glandular. Algunas de ellas generan estructuras foliculares con un lumen que contiene material coloidal (Soji y Herbert, 1989; Shirasawa y Yamanouchi, 1999). En médula adrenal, las células intersticiales se conocen como células sustentaculares (CS) debido a que en un primer momento se las consideró como células que sólo tenían una función de sostén (Iwagana y Fujita, 1984). Si bien las funciones de las CFS y las CS no están completamente esclarecidas, varios estudios sugieren que podrían constituir una extensa red de comunicación rápida intraglandular (Colomer, Martin, Desarménien y Guérineau, 2011).

En base a estudios que demuestran la expresión de receptores de andrógenos (RA) en CFS (O'Hara y col., 2015) y la existencia de variaciones en el patrón de uniones tipo GAP sincronizadas con fluctuaciones en los niveles séricos de esteroides sexuales (Soji y col., 1989, 1991), podría considerarse a estas células como elementos importantes en la regulación del comportamiento reproductivo y la fertilidad. Por otro lado, no se conocen estudios sobre la influencia de los andrógenos sobre las CS de médula adrenal.

Nuestro modelo experimental, el *Lagostomus maximus maximu* (vizcacha), es un roedor autóctono sudamericano que habita desde el sur de Paraguay y Bolivia hasta el centro de Argentina. Presenta hábitos nocturnos, vive en madrigueras y exhibe un ciclo reproductivo anual sensible al fotoperíodo. Reportes previos sobre CFS en vizcacha, han reportado la expresión de marcadores de células gliales (S-100, proteína glio-fibrilar acídica y vimentina), lo cual sugiere un origen neuroectodérmico para dichas células (**Acosta y Mohamed, 2009; Acosta, Filippa y Mohamed, 2010**). También se ha demostrado que la administración de melatonina y las variaciones del fotoperíodo son capaces de producir cambios en parámetros morfológicos de dichas células (**Acosta y Mohamed, 2011**). Por otro lado, **Rodriguez, Filippa, Mohamed, Dominguez y Scardapane (2007)** describieron la morfología y distribución tisular de CS. Si bien no se conocen aún estudios sobre el efecto de la melatonina y el fotoperíodo sobre las CS de la médula adrenal, estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren que estas células también son sensibles a estos factores (datos no publicados).

Objetivos

El objetivo del trabajo fue estudiar las variaciones inmunomorfológicas de las

CFS de adenohipófisis y las CS de médula adrenal provocadas por castración quirúrgica, mediante el análisis de la expresión de la proteína S-100, un marcador de células gliales expresado por ambas células.

Materiales y Métodos

Animales y condiciones experimentales

Las vizcachas fueron capturadas en su hábitat natural en las cercanías de la ciudad de San Luis, Argentina, utilizando trampas colocadas en sus madrigueras.

Se utilizaron ocho vizcachas machos adultos (5-7 Kg), capturadas durante el verano y principios del otoño. Los animales se dividieron en dos grupos: un grupo castrados quirúrgicamente (n = 4) y un grupo control constituido por vizcachas a las cuales se les practicó una simulación de castración (n = 4). Se mantuvieron individualmente en boxes durante 6 semanas, bajo un ciclo luz (L)-oscuridad (O) de 14L:10O, con acceso libre a alimentos y agua, a una temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de 6 semanas, todos los animales fueron anestesiados intramuscularmente con una combinación de ketamina (Ketamina 50, Holliday-Scott SA®) y xilazina (Vetanarcol®, König SA) en dosis de 12 y 0,4 mg/kg, respectivamente. Los animales se sacrificaron mediante inyección intracardiaca de Euthanyle (0,25 ml/kg de

peso corporal, pentobarbital sódico, difenilhidantoína sódica, Brouwer S.A.). La condición reproductiva de las vizcachas del grupo control se evaluó cuidadosamente mediante histología testicular.

Después del sacrificio se extrajeron rápidamente las glándulas hipofisarias y adrenales, se fijaron en solución de Bouin y se procesaron para microscopía óptica.

Los diseños experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética local de la Universidad Nacional de San Luis y el Área de Control de Biodiversidad del Ministerio de Ambiente de San Luis (Argentina, Resolución No. 47.PBD.2015).

Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos (4-5 μm de espesor) se procesaron usando el sistema de amplificación biotina-estreptavidina (BioGenex), cromógeno diaminobencidina (DAB) a 20°C.

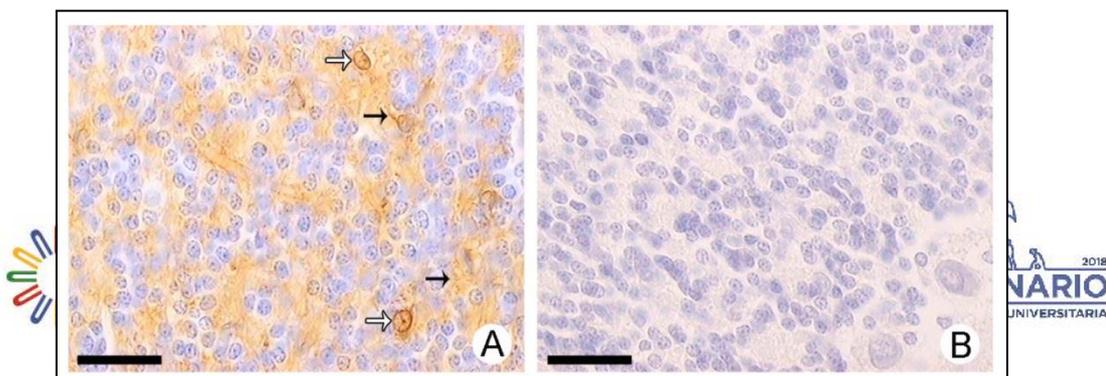
Los cortes se hidrataron hasta agua destilada y se realizó la recuperación antigénica en un horno microondas de 900 W durante 6 min (2 x 3 min) en una solución de citrato de sodio (0,01M, pH 6,0). La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió con H_2O_2 al 3% en

agua durante 20 min. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-proteína S-100 (AR058-5R. Ready-to-Use. BioGenex) 12 h a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar con PBS durante 10 min, se realizó la visualización inmunohistoquímica usando el Kit Super Sensible Ready-to-Use (BioGenex, San Ramon, CA, EE.UU.). Los cortes se incubaron durante 30 min con anti-IgG biotinilada diluida, lavaron en PBS y se incubaron durante 30 min con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Los sitios de reacción se visualizaron utilizando una solución de 100 μl del cromógeno de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en 2,5 ml de PBS y 50 μl de solución de sustrato de H_2O_2 . Los cortes se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron en etanol y se montaron en Entellan®.

Como control positivo del anticuerpo, se utilizaron cortes de cerebelo de rata tal como lo indica el proveedor. Como control negativo de la técnica, se reemplazó el anticuerpo primario por suero control negativo de conejo (BioGenex, San Ramon, CA, USA) y omitiendo el primer anticuerpo (Figura1).

Figura 1: Inmunohistoquímica en cerebelo de rata. Control positivo (A) y negativo (B).

A) Inmunomarcación para la proteína S-100 en los procesos citoplasmáticos (flechas



negras) y núcleos (flechas blancas) de las células gliales. **B)** Control negativo, nótese la ausencia de estructuras o células positivas. Escala de barras: A y B 25 μ m.

Análisis Morfométrico

Las imágenes fueron capturadas por una cámara Sony SSC-DC50A conectada a un microscopio Olympus BX-40 y a una computadora con el software Image Pro Plus 5.0. Antes de realizar las mediciones, se definió un área de referencia (AR) y se realizó la calibración de la distancia con un portaobjeto graduado.

Para el estudio morfométrico se utilizaron cuatro glándulas hipofisarias y adrenales por cada grupo de estudio. Se realizaron cuatro cortes seriados regularmente espaciados, y se analizaron todos los campos microscópicos con objetivo de 40X. En glándula hipófisis se realizó la medición del porcentaje de área celular S-100-inmunopositiva (%AI S-100 cel): calculado con la fórmula $\%AI = \Sigma A_{cel} / \Sigma AR \times 100$, donde ΣA_{cel} fue la suma del área de células S-100 inmunopositivas, y del porcentaje del área coloidal S-100-positiva (%AI S-100 col) usando la fórmula $\%AI = \Sigma A_{col} / \Sigma AR \times 100$, donde ΣA_{col} fue la suma del área de coloides foliculares S-100 positivos; en ambos casos, ΣAR constituye la suma del área de referencia. El %AI total fue calculada como la sumatoria del %AI celular y coloidal. En médula adrenal el porcentaje

del área inmunopositiva total de S-100 (%AI S-100) fue calculado usando la siguiente fórmula: $\%AI = \Sigma A / \Sigma AR \times 100$, donde ΣA fue la suma del área total S-100-inmunopositiva y ΣAR la sumatoria del área de referencia.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM). La comparación entre los grupos (control vs. castrados) se realizó mediante el test de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Resultados y Discusión

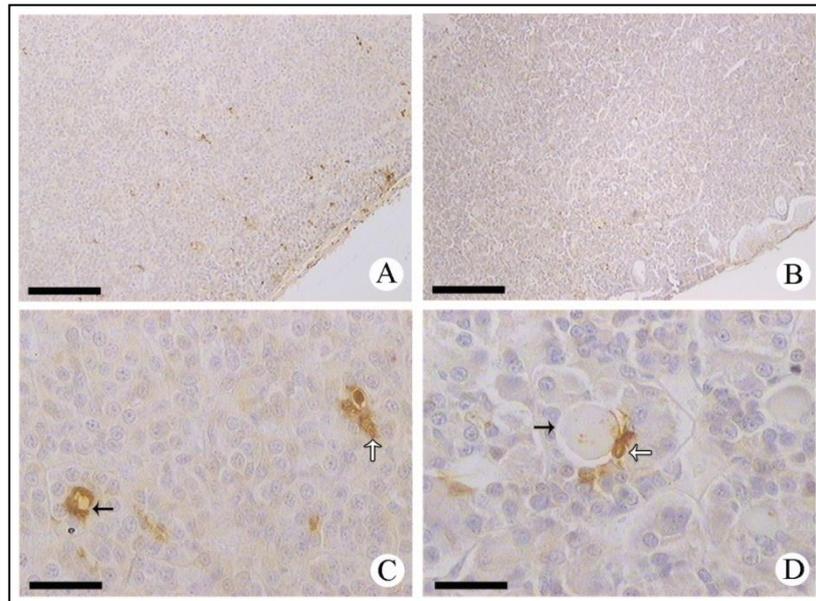
Adenohipófisis

El estudio inmunohistoquímico de los animales controles muestra que la proteína S-100 se expresa en las CFS (marcación celular) y en el coloide folicular (marcación extracelular). Las CFS, que originan folículos o aisladas, presentan inmunomarcación a nivel nuclear, citoplasmático o ambos. La inmunomarcación celular permite observar procesos citoplasmáticos, los cuales rodean a las células secretoras adyacentes o contactan con vasos sanguíneos. El coloide folicular exhibe un patrón heterogéneo de inmunomarcación. Algunos coloides están intensamente marcados, y otros con marcación

moderada, escasa o ausente.

La adenohipófisis de los animales castrados presenta un parénquima bien desarrollado, con características histológicas similares a las descritas en el grupo control. Se observan estructuras foliculares conteniendo material de

(Figura 2). La inmunomarcación para la proteína S-100 es significativamente menor a la observada en animales controles, tanto a nivel de marcación celular como coloidal (Tabla).



aspecto coloidal en su interior, escaso desarrollo de tejido conectivo y vascular

Figura 2: Adenohipófisis de vizcachas controles (A y C) y castradas (B y D). **A)** Imagen a bajo aumento de pars distalis (PD) donde se exhibe inmunomarcación para las CFS y coloides foliculares. **B)** La imagen muestra escasa inmunomarcación en el parénquima de PD. **C)** Inmunomarcación para S-100 en CFS (flecha blanca) y en el coloide folicular (flecha negra) de PD. **D)** Se observa menor cantidad de inmunomarcación celular (flecha blanca) y coloidal (flecha negra). Escala de barras: A y B 250 μ m; C y D 25 μ m.

Médula Adrenal

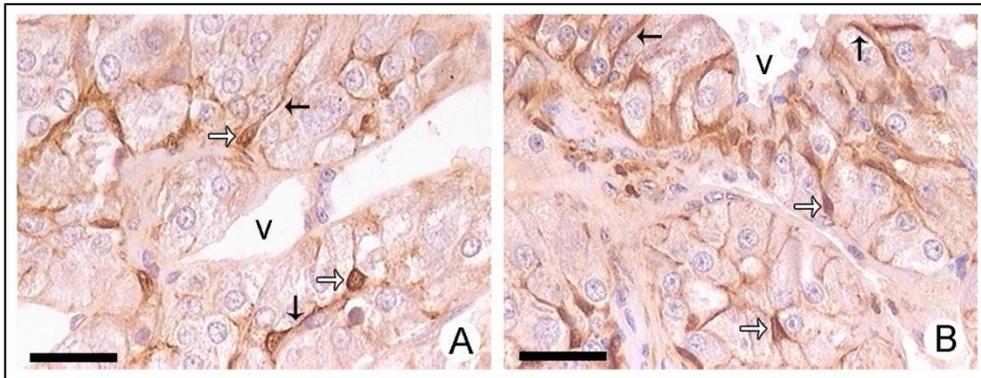
En médula adrenal la inmunomarcación de la proteína S-100 permitió observar a las CS como células de núcleo ovalado o triangular y escaso citoplasma con procesos de longitud variable. Tanto

en los animales controles como en los

castrados, las CS se observaron en estrecha relación con las estructuras glomerulares constituidas por las células secretoras de catecolaminas, las células cromafines. En animales controles, los

procesos citoplasmáticos de las CS se observaron rodeando la periferia de dichas estructuras glomerulares, pero también entre las células cromafines llegando a rodear en muchos casos a cada célula individualmente. En los animales castrados, la marcación inmunohistoquímica reveló CS con

en los animales del grupo control; especialmente en las cercanías de los grandes vasos sanguíneos medulares (Figura 3). El análisis del %AI demostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales castrados y los animales del grupo control (Tabla).



procesos citoplasmáticos más gruesos, largos y abundantes que los observados

Figura 3: Médula adrenal de vizcachas. A) Control: se pueden observar núcleos ovalados o triangulares (flechas blancas) y largas prolongaciones citoplasmáticas (flechas negras) en contacto con células cromafines. **B) Castrada:** se observa mayor inmunomarcación en CS, las cuales exhiben numerosas y gruesas prolongaciones citoplasmáticas (flechas negras), en cercanía a vasos sanguíneos (V). Escala de barras: A y B 25 μ m.

Variaciones de los parámetros morfométricos

	PARÁMETROS	CONTROL	CASTRACIÓN
ADENOHIPÓFISIS	% AI CELULAR (CFS)	0.89 \pm 0.07a	0.53 \pm 0.05
	%AI COLOIDAL	0.47 \pm 0.04a	0.21 \pm 0.08
	%AI TOTAL	1.36 \pm 0,11a	0,74 \pm 0,13

MÉDULA ADRENAL	%AI CELULAR (CS)	3,95 ± 0,40^a	6,05 ± 0,35
-----------------------	-------------------------	--------------------------------	--------------------

Tabla %AI CELULAR: porcentaje de área S100 positiva de células intersticiales en cada glándula, **a** $p < 0,05$: Control vs Castración.

%AI COLOIDAL: porcentaje de área S100 positiva coloidal **a** $p < 0,05$: Control vs Castración.

%AI TOTAL: porcentaje de área S100 positiva total **a** $p < 0,05$: Control vs Castración.

Las CFS adenohipofisarias han sido estudiadas en diferentes especies de mamíferos y no mamíferos. Si bien la función precisa de estas células aún no es del todo conocida, se ha reportado que además de cumplir funciones de sostén también poseen actividad fagocítica, capacidad de regular la secreción hormonal e incluso actuar como células madre en procesos de renovación celular (**Allaerts y Vankelecom, 2005; Devnath e Inoue, 2008; Luziga, Kipanyula, Mbassa y Koichi, 2009;**).

Estudios en diferentes especies han sugerido que existe una estrecha relación funcional entre las CFS, el coloide folicular y las células secretoras de hormonas (**Ogawa y col., 1996; Mohamed y col., 2000; Luziga, Yamamoto, Horii y Mamba, 2005**). Las CFS establecen una red de comunicación entre ellas y con las células productoras de hormonas a través de uniones GAP (**Shirasawa y col., 2004**). Mediante la secreción de proteína S-100 al espacio extracelular, las CFS modifican la

actividad de las células somatotropas (GH), lactotropas (PRL) y gonadotropas (LH) relacionadas a la regulación de los procesos reproductivos (**Allaerts y Vankelecom, 2005; Deneff, 2008**).

Además, ha sido reportado que las CFS expresan receptores de andrógeno (RA) y que se producen variaciones en el número de uniones gap directamente relacionadas con los niveles séricos de andrógenos (**Soji y col., 1997; O'Hara y col., 2015**).

Respecto a la médula adrenal, si bien se ha observado un efecto regulatorio de los esteroides sobre la capacidad de mielinización de las células de Schwann en sistema nervioso periférico, no existen estudios sobre el efecto que puedan ejercer sobre las CS. Sin embargo, **Yokoi y col., (1998)** demostraron la expresión inmuno- histoquímica de la enzima esteroide-5- α -reductasa en las CS; lo cual sugiere que existe alguna acción de los esteroides sobre de estas células.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la acentuada disminución androgénica, producida por la castración quirúrgica,

afecta significativa- mente la actividad de las células tirotropas, somatotropas, lactotropas y gonadotropas (**Filippa y Mohamed, 2008; Filippa and Mohamed, 2006; Filippa, Godoy, Pérez y Mohamed, 2014**). Además, se observó una disminución significativa en el patrón de proliferación celular en glándula hipofisaria (**Rosales, Busolini, Mohamed y Filippa, 2016**). En el presente trabajo, los cambios morfológicos observados en las CFS, indican que dichas células son sensibles a las variaciones androgénicas y se modifican en relación con una menor actividad de las células secretoras. Esto sugiere una activa participación de las CFS en la regulación de la histofisiología glandular.

Estudios previos en nuestro laboratorio sobre médula adrenal, han demostrado que existe una variación estacional en la actividad de la glándula (**Rodríguez y col., 2013**), observándose un aumento de la actividad durante los meses de invierno cuando el *Lagostomus* exhibe sus valores de testosterona más bajos, mínima actividad reproductiva y se encuentra bajo la influencia de los estresores ambientales invernales. Los resultados del presente estudio demuestran que la disminución de andrógenos produce cambios morfológicos en las CS. Dichos cambios se ven reflejados en las variaciones morfológicas observadas a través de la expresión de proteína S-100.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que las CFS son sensibles a la acentuada disminución de andrógenos, indicando que presentan actividad hormono-dependiente, probablemente acompañando los cambios de las células secretoras de adenohipófisis, los cuales fueron previamente reportados en nuestro laboratorio. Esta sensibilidad de la CFS a las variaciones de los niveles de andrógenos, sumada a la estrecha relación que mantienen con las células gonadotropas, lactotropas y tirotropas, sugieren que las CFS podrían tener un rol importante sobre el comportamiento reproductivo y los mecanismos de fertilidad animal. En contraste a lo observado en adenohipófisis, la expresión de proteína S-100 aumenta significativamente en la CS de médula adrenal de los animales castrados. Esto demuestra que dichas células también son sensibles a las variaciones de los niveles de andrógenos. Probablemente las variaciones observadas tienen relación con la actividad secretora de la médula adrenal y la regulación de la secreción de catecolaminas.

Por último, no podemos dejar de señalar el rol de la proteína S-100 en la regulación intraglandular. Es conocida la capacidad de la proteína S-100 de ser secretada y

actuar sobre receptores específicos de membrana (Donato y col., 2013), lo cual nos permite pensar que esta proteína, expresada por las células intersticiales de ambas glándulas, es importante en la regulación paracrina intraglandular.

Bibliografía

Acosta, M. y Mohamed, F. (2009). Pituitary pars intermedia of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. *Cells Tissue Organs*, 190(4),219-229.

Acosta, M. y Mohamed, F. (2009). Pituitary pars intermedia of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a morphometric study of seasonal and age-related changes in immunohistochemistry. *Cells Tissue Organs*, 190(4),219-229.

Acosta, M. y Mohamed, F. (2011). Effect of the photoperiod and administration of melatonin on folliculostellate cells of the pituitary pars distalis of adult male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Acta Histochemica*, 113(6), 640-646.

Acosta, M. y Mohamed, F. (2011). Effect of the photoperiod and administration of melatonin on folliculostellate cells of the pituitary pars distalis of adult male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Acta Histochemica*, 113(6), 640-646.

Allaerts, W., y Vankelecom, H. (2005).

History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *European Journal of Endocrinology*, 153, 1-12.

Colomer, C., Martin, A., Desarménien, M., y Guérineau, N. (2011). Gap junction-mediated intercellular communication in the adrenal medulla: an additional ingredient of stimulus-secretion coupling regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818(8),1937-51.

Denef, C. (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(1), 1-70.

Devnath, S., e Inoue, K. (2008). An insight to pituitary folliculostellate cells. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 687-91.

Donato, R., Cannon, B., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D., y Geczy, C. (2013). Functions of S100 Proteins. *Current Molecular Medicine*, 13(1), 24–57.

Filippa, V., y Mohamed, F. (2006). Immunohistochemical study of somatotrophs in pituitary pars distalis of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) in relation to the gonadal activity. *Cells Tissues Organs*, 184, 188-197.

Filippa, V., y Mohamed, F. (2008). Immunohistochemical and morphometric study of pituitary pars distalis thyrotrophs of male viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): seasonal variations and effect of melatonin and castration. *Anatomical Record*, 291, 400–409.

- Filippa, V., Godoy, D., Perez, E., y Mohamed, F. (2014). Effects of castration on androgen receptors and gonadotropins in the pituitary of adult male viscachas. *Reproduction, Fertility and Development*, 26, 991-1000.
- Herring, J. (1908). The histological appearances of the mammalian pituitary body. *Experimental Physiology*, 1: 121.
- Iwanaga, T., y Fujita, T. (1984). Sustentacular cells in the fetal human adrenal medulla are immunoreactive with antibodies to brain S-100 protein. *Cell and Tissue Research*. 236(3), 733-735.
- Luziga, C., Yamamoto, Y., Horii, Y., y Mamba, K. (2005). Molecular cloning, expression profile and functional implications of clusterin in the pituitary gland of helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Cell Biology International*, 29, 675–686.
- Luziga, C., Yamamoto, Y., Horii, Y., y Mamba, K. (2006). Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*). *Acta Histochemica*, 108, 69-80.
- Luziga, C., Kipanyula, M., Mbassa, G., y Koichi, M. (2009). Colloid in the anterior pituitary of helmet guinea fowl (*Numida meleagris galeata*): morphometric analysis and pattern of occurrence in relation to apoptosis. *Veterinary Research Communications*, 33, 681-91.
- Mohamed, F., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzman, J., y Piezzi, R. (2000). Colloid in the pituitary pars distalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): Ultrastructural and occurrence in relation to season, sex and growth. *Anatomical Record*, 258, 252-261.
- Moreno, M., y Lanni, A. (2015). Editorial: Hormonal and Neuroendocrine Regulation of Energy Balance. *Frontiers in Physiology*, 6, 403.
- Müller, E., Locatelli, V., y Cocchi, D. (1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews*, 79(2), 511-607.
- Muñoz, E., Fogal, T., Domínguez, S., Scardapane, L., Guzmán, J., Cavicchia, J., y Piezzi R. (1998). Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomical Record*, 252, 8-16.
- Ogawa, S., Ishibashi, Y., Sakamoto, Y., Kitamura, K., Kubo, M., Sakai, T., y Inoue, K. (1997). The glycoproteins that occur in the colloids of senescent porcine pituitary glands are clusterin and glycosylated albumin fragments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234, 712–718.
- O'Hara, L., Curley, M., Ferreira, M., Cruickshank, L., Milne, L., y Smith L. (2015). Pituitary androgen receptor signalling regulates prolactin but not gonadotropins in the male mouse. *PLoS*

- One, 10(3):e0121657. doi: 10.1371/journal.pone.0121657
- Parker, T., Kesse, Mohamed, A., y Afework, M. (1993). The innervation of the mammalian adrenal gland. *Journal of Anatomy*, 183(2), 265-276.
- Rodriguez, H., Filippa, V., Mohamed, F., Dominguez S., y Scardapane, L. (2007). Interaction between chromaffin and sustentacular cells in adrenal medulla of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomía Histología Embriología*, 36(3):182-185.
- Rodriguez, H., Filippa, V., Penissi, A., Fogal, T., Domínguez, S., Piezzi, R., y Scardapane L. (2013). Seasonal changes in the activity of the adrenal medulla of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomical Record*, 296(7), 1089-1095.
- Rosales G., Busolini, F., Mohamed, F., y Filippa, V. (2016). Effects of melatonin and gonadal androgens on cell proliferation in the pituitary of viscachas (*Lagostomus maximus maximus*). *Cell Proliferation*, 49, 644-653.
- Shirasawa, N., y Yamanouchi, H. (1999). Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro. *Journal of Anatomy*, 194, 567-577.
- Shirasawa, N., Mabuchi, Y., Sakuma, E., Horiuchi, O., Yashiro, T., Kikuchi, M., Hashimoto, Y., Tsuruo, Y., Herbert, D., y Soji, T. (2004). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculostellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Anatomical Record*, 278(A), 462-473.
- Sato, G., Shirasawa, N., Sakuma, E., Sato, Y., Asai, Y., Wada, I., Horiuchi, O., Sakamoto, A., Herbert, C., y Soji, T. (2005). Intercellular communications within the rat anterior pituitary XI: an immunohistochemical study of distributions of S-100 positive cells in the anterior pituitary of the rat. *Tissue Cell*, 37, 269-80.
- Soji, T., y Herbert, D. (1989). Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anatomical Record*, 224(4), 523-33.
- Soji, T., Nishizono, H., Takashi, Y., y Damon, H. (1991). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. III. Postnatal development and periodic changes of cell-to-cell communications in female rats. *Anatomical Record*, 231(3), 351-357.
- Soji, T., Shirasawa, N., Kuroni, C., Yashiro, T. y Herbert C. (1994) Immunohistochemical study of the post-natal development of the folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland. *Tissue and Cell*, 26, 1-8.
- Soji, T., Mabuchi, Y., Kurono, C., y Herbert, C. (1997). Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the

rat anterior pituitary gland. *Microscopic Research and Technique*, 39(2), 138-49.

Toni, R. (2004). The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *Journal of Endocrinology Investigation*, 27(6), 35-47.

Yamamoto, M., Yanai, R., y Arishima, K. (2004). Study of migration of neural crest cells to adrenal medulla by three-dimensional reconstruction. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 66(6), 635-641.

Yokoi, H., Tsuru, Y., y Ishimura, K. (1998). Steroid 5 α -reductase Type 1 Immunolocalized in the Rat Peripheral Nervous System and Paraganglia. *The Histochemical Journal*, 30(10), 731–739.

Agradecimientos

Agradecemos a la Sra. Angelina Bernardi, y al Sr. Juan Arroyuelo por su participación técnica.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaria de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de San Luis; Proyecto 2-3118. CONICET.