

ESTUDIO HISTOQUÍMICO DEL OVARIO DE LA RATA EN RELACIÓN CON EL CICLO ESTRAL, LA GESTACIÓN Y LA LACTACIÓN *

por

W. BUÑO y L. HERIMIAN **

- I. Introducción.
- II. Material y técnicas.
- III. Observaciones.
 - 1) Estudio histoquímico del ovario durante el ciclo estral.
 - a) Epitelio germinativo.
 - b) Folículos primordiales.
 - c) Folículos en crecimiento.
 - d) Folículos de Graaf.
 - e) Cuerpo lúteo.
 - f) Tejido intersticial.
 - 2) El ovario gravídico.
 - a) Los folículos.
 - b) Cuerpo lúteo.
 - 3) El ovario durante la lactación.
- IV. Discusión.
- V. Resumen y conclusiones.
- VI. Bibliografía.

I. INTRODUCCIÓN

El ciclo sexual de la rata es uno de los mejor conocidos. Long y Evans (1922), en una memoria fundamental, asentaron las bases de lo que hoy sabemos sobre fisiología sexual de esta especie. En el mismo trabajo, aplicando el tetraóxido de osmio a la demostración de los lípidos en el cuerpo lú-

teo y la glándula intersticial, iniciaron también el estudio histoquímico del ovario. Sin embargo, y a pesar de ser una de las especies más utilizadas para los estudios de endocrinología sexual, muchos puntos fundamentales de su histofisiología son todavía ignorados o insuficientemente aclarados. Baste recordar que es necesario llegar al año 1951 (Pederson) para encontrar un trabajo en que se analice cuidadosamente la histogénesis del cuerpo lúteo, y aún esto con técnicas muy generales.

Para nuestro propósito debemos analizar los cambios morfológicos e histoquímicos que se cumplen en el folículo durante su maduración y su ruptura; luego los que transcurren en el cuerpo lúteo, tanto en su etapa progresiva como en su fase regresiva. Estudiaremos también el comportamiento del tejido o glándula intersticial, en los diferentes momentos del ciclo, durante la preñez y la lactación.

El estudio histoquímico del ovario en la rata comienza con la aplicación del tetraóxido de osmio a la tinción de los lípidos comprobándose que poco después de la ovulación se acumula sustancia osmiófila en las células luteínicas (Long y Evans, 1922). La técnica empleada ha perdido el carácter histoquímico que se le asignaba en la época en que fué publicado ese trabajo; además el he-

* Recibido para publicar el 28-VI-55.

** Del Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay.

cho anotado por los autores es un pequeño dato en un estudio mucho más amplio, que abarca todo el ciclo sexual de la rata, por lo que no entraron en mayores detalles.

Dempsey y Basset (1943) han estudiado los materiales lipídicos del ovario de rata analizando la birrefringencia, la autofluorescencia, la distribución del colesterol, y aplicando la técnica de la fenilhidrazina de Benet (1940), para la demostración de los grupos carbonilos. En los folículos primordiales no observaron birrefringencia lipídica, que los autores distinguen con precisión de la producida por el colágeno. En el estadio de formación del antro aparecen células con cristales birrefringentes, situadas en la teca interna. En el folículo maduro la situación es la misma pero la cantidad de lípidos de la teca interna es menor. La birrefringencia se reduce en seguida de la ruptura folicular, y durante la formación del cuerpo lúteo, hasta alcanzar un mínimo a los 36 horas después de la ovulación, mínimo que se mantiene hasta las 48 horas. A partir de este momento aumenta el material lipídico birrefringente hasta que, 5 días después de la ovulación, casi todo el tejido luteínico está lleno de cristales que persisten durante el resto de la vida del cuerpo lúteo. Es indudable que los autores han diferenciado con toda precisión la birrefringencia de los lípidos (acetonasolubles) y la birrefringencia del colágeno. Sin embargo, no han discriminado en la birrefringencia lipídica aquella natural, producida por la estructura molecular del cuerpo, y que se presenta bajo forma de cruces de polarización, de la birrefringencia presente en cualquier clase de lípidos luego de fijación en formol. Esta última no presenta cruz de polarización, sino que da dos posiciones de extinción y desaparece por calentamiento (Lison 1953). Para diferenciarlas hemos considerado como birrefringencia lipídica solamente la que aparece en forma de cruz de polarización cuando se observa el preparado en platina calentada a 55°. Los estudios realizados con

microscopio de fluorescencia por Dempsey y Basset (1943) los llevó a la conclusión de que, en la teca interna del folículo maduro, aparece una fluorescencia amarilla que se observa también en el cuerpo lúteo. Desaparece cuando se tratan los cortes con disolventes de las grasas. La reacción de la fenilhidrazina fué positiva en la teca interna, la glándula intersticial y el cuerpo lúteo. Estudiaron también la localización del colesterol por la reacción de Romieu (color marrón con el ácido sulfúrico concentrado), hallando una distribución similar a la birrefringencia y a la reacción de la fenilhidrazina. Alrededor de 36 horas después de la ovulación las gotas son escasas y más claras, para aumentar nuevamente 12 horas más tarde. En una sección, los cuerpos lúteos viejos son los más intensamente coloreados. Los autores consideran las reacciones estudiadas como presumiblemente indicativas de "Cholesterol or related compounds, including many of the biologically active steroids". La demostración de sustancias acetonasolubles que reaccionan con la fenilhidrazina, sería una "evidencia presuntiva" de la presencia de compuestos idénticos o similares o "biologically active sterol hormones". El mismo razonamiento hacen para la reacción de Romieu. "Summing up, since each of these three reactions indicates, more or less directly, the presence of sterol substances and since the chemical and physical basis for the reactions are entirely different, it seems clear that the regions which give positive reactions must be those which contain the biologically active steroids or closely related substances".

El argumento de Dempsey y Basset (1943), que puede ser válido para el análisis de un lípido puro en el tubo de ensayo, no es aplicable, lamentablemente, a los lípidos de la célula viva formando mezclas complejas, donde la coexistencia de diversas reacciones pueden deberse a distintos lípidos. Esto sin entrar en la validez de la interpretación de cada una de las reacciones en

particular, que no son universalmente aceptadas.

Everett (1944-1945) ha analizado histoquímicamente los lípidos del cuerpo lúteo en la rata y comprobó que, durante el diestro que sigue a la ovulación, hay un aumento de la reacción para lípidos en general, de la reacción de Schultz y de la birrefringencia. En el proestro siguiente a la ovulación se reduce la intensidad de estas reacciones, para volver a aumentar en el estro siguiente. En la rata preñada el contenido en material sudanófilo es escaso hasta el 16º día de gravidez; la reacción de Schultz y la birrefringencia negativas hasta esa fecha. Everett (1945) hace hincapié en la reducción de los lípidos del cuerpo lúteo durante el proestro con la formación de células privadas de lípidos, a las que denomina "tipo embarazo", y que considera activamente secretantes. Al mismo tiempo observa la aparición de manchas necróticas con formación de gruesas gotas sudanófilas conteniendo abundante material birrefringente y Schultz positivo. Estas manchas serían idénticas a las manchas vacuoladas descritas por Boling y col. (1943) y por Basset (1943). En base a los hechos mencionados considera Everett que el cuerpo lúteo cíclico de rata es funcional, bien que sin repercusión endocrina. El colesterol sería el precursor de la progesterona y por efecto de la estimulación proestral se reduciría para producir la hormona dando lugar a la aparición del tipo celular que llama "de embarazo".

Los estudios histoquímicos más completos del ovario de rata han sido realizados por Deane (1952) y Deane y Barker (1952). El análisis que estos autores han hecho de la composición histoquímica del ovario ha recaído sobre los lípidos, los compuestos con radicales carbonilo, la fosfatasa alcalina, la esterasa, el ácido ascórbico, las proteínas basófilas, el glicógeno, los mucoides, etc., aplicando las técnicas reconocidas como más adecuadas para cada sustancia. Han com-

probado que en los folículos primordiales no hay lípidos, esterasas ni ácido ascórbico; hay en cambio una débil reacción positiva para la fosfatasa alcalina y una débil basofilia difusa que desaparece en los cortes tratados con ribonucleasa. En los folículos en crecimiento las células de la teca interna presentan pequeñas gotitas sudanófilas, Schultz-positivas, con cristales birrefringentes, que reaccionan débilmente con los reactivos para grupos carbonilos y que no emiten fluorescencia. La reacción de Hotchkiss (ácido peryódico-reactivo de Schiff; PAS). Es francamente positiva en la pelúcida, el licor folicular y la membrana basal del folículo. El licor folicular es fuertemente metacromático, reacción que desaparece previo tratamiento con hialuronidasa, hecho que había sido ya demostrado por Wislocki, Bunting y Dempsey (1947). La granulosa es la estructura que presenta mayor basofilia. La reacción para fosfatasa alcalina es positiva en los vasos de la teca interna y el citoplasma de las células tecales.

Durante el diestro la reacción para grupos carbonilos en las células tecales se hace más intensa y aparece una fluorescencia amarillo-verdosa que se mantiene y aún acentúa durante el proestro y el estro. En estas últimas fases los grandes folículos de Graaf, en inminencia de ruptura, presentan una reducción del número y tamaño de las gotas sudanófilas, de los cristales birrefringentes, y del material Schultz-positivo en las células tecales.

En los folículos atrésicos la distribución de la fosfatasa alcalina presenta particularidades notables; la granulosa, que es negativa en los folículos "normales", ofrece una reacción francamente positiva en los atrésicos. Al mismo tiempo aparecen gotitas lipídicas y reacción positiva de esterasas en las células de la granulosa. Es muy notable la aparición de granulaciones intensamente basófilas, no atacables por la ribonucleasa, y Feulgen positivas. Son restos de fragmen-

tación nuclear que fueron ya reconocidos como tales por Vincent y Dornfeld (1948).

En las primeras etapas de formación del cuerpo lúteo aparecen lípidos en pequeñas gotitas, más abundantes en las células de origen tecal que en las células de la granulosa, negativos a la reacción de grupos carbonilos y que presentan cristales birrefringentes y Schultz-positivos. Al mismo tiempo se observa que la fosfatasa se ha reducido en las células tecales y que la esterasa es débilmente positiva. Durante el diestro el aspecto es el mismo pero aumentando la intensidad de las reacciones. En el estro aparece en la región central zonas necróticas, Schultz-positivas que corresponden a las descritas por Everett (1945).

La presencia y distribución histoquímica de succino-dehidrogenasa ha sido estudiada por Padykula (1952) quien comprobó su presencia en el cuerpo lúteo cíclico (y aún más intenso de embarazo), así como en la glándula intersticial. Sería fuertemente positiva en ciertas células del cuerpo lúteo con aspecto degenerativo. Es también positiva en la teca interna de los folículos y, al contrario, negativa en la granulosa.

Como vemos el estudio histoquímico del ovario en la rata, durante las diversas etapas del ciclo ha sido realizado con bastante atención; sin embargo, no han sido aplicadas técnicas como la de Baker (1946, 1947) para fosfolípidos, a pesar de ser un proceder que ofrece amplias garantías por su valor citoquímico. Además no se han realizado hasta la fecha estudios histoquímicos del ovario de esta especie ni durante el embarazo ni durante la lactación, períodos en que presenta sus modificaciones más espectaculares.

II. MATERIAL Y TÉCNICAS

Hemos empleado ratas blancas cuyo ciclo estral se siguió diariamente mediante el estudio del frotis vaginal. Se eligieron animales que presentaran ciclos regulares de cuatro días de duración. Los animales se

sacrificaron en los momentos convenientes del ciclo, mediante un golpe en la cabeza. El tracto genital se fijó en formol-Baker o en acetona fría. El primer fijador se utilizó para todas las investigaciones con excepción de las enzimas (fosfatasa y esterasa) que se investigaron en material fijado en acetona fría.

Las técnicas empleadas fueron las siguientes:

a) Coloraciones generales.

1. Hematoxilina-eosina.
2. Coloración del retículo (Río Horta).
3. Coloraciones tricrómicas (Galligo, Gomori).

b) Lípidos.

1. Coloración general de los lípidos con negro Sudán B. (Lison, 1953).
2. Coloración de los glicéridos. Color rojo con sulfato de azul Nilo.
3. Coloración de los fosfolípidos (técnica de Baker, 1946-1947).
4. Demostración de los esteres del colesterol (técnica de Schultz).
5. Examen con luz polarizada de cortes montados en glicerina. El examen se hizo en platina caldeada a 55°.
6. Examen de la fluorescencia con luz ultravioleta.
7. Reacción de los grupos carbonilos (O₂-Schiff). Color rojo con el reactivo de Schiff en material fijado en formol-Baker, sin ningún tratamiento previo (Lison, 1953).
8. Reacción de la fenilhidrazina (Bennet, 1940).

c) Prótidos.

1. Ribonúcleoproteínas. Coloración con la pironina.

2. Desoxiribonúcleoproteínas. Reacción de Feulgen.
3. Mucoproteínas. Metacromasia con azul de toluidina. Técnica de Hotchkiss del ácido periódico-reactivo de Schiff. Ambas con y sin previa digestión con hialuronidasa.

d) *Enzimas.*

1. Fosfatasa alcalina con la técnica de Gomori (1952). (Substrato glícerofosfato.)
2. Esterasa con la técnica de Gomori (1952). Substrato Tween.)

III. OBSERVACIONES

1º) *ESTUDIO HISTOQUÍMICO DEL OVARIO DURANTE EL CICLO ESTRAL.* Podríamos empezar nuestra descripción indiferentemente en cualquier momento del ciclo, y estudiar los cambios que se producen hasta volver al mismo punto del ciclo siguiente. Razones prácticas nos llevan a tomar como punto de partida el metaestro, alrededor de 10 horas después de la ovulación: en general se puede determinar este punto con suficiente precisión.

En cualquier momento del ciclo se encuentran folículos primordiales, folículos en crecimiento, folículos atrésicos y cuerpos lúteos de varias generaciones. Durante el estro se encuentran también folículos de Graaf. En cualquier momento del ciclo encontramos también varios juegos de cuerpos lúteos. En primer lugar los producidos a raíz de la reciente ruptura folicular y que pertenecen propiamente al ciclo. Los llamamos CL. I; reciben este nombre hasta que en el próximo estro vuelve a producirse la ruptura folicular y vuelven a formarse nuevos cuerpos lúteos. En segundo lugar los cuerpos lúteos resultantes de la ruptura folicular del ciclo anterior, que han alcanzado el máximo desarrollo y que denominamos CL. II. Luego los CL. de dos generaciones

de edad, es decir de 8 días de evolución y que llamaremos CL. III. Se puede reconocer todavía otra generación de cuerpos lúteos, CL. IV. Pueden hallarse más CL. en regresión pero ya su estructura es indistinta y no discernible su edad. En conjunto en un ovario de rata se pueden reconocer hasta 20 ó 30 cuerpos lúteos dado que en cada ovulación se rompen aproximadamente 5 folículos.

Estudiaremos separadamente la composición histoquímica de cada una de las estructuras ováricas analizando los cambios que sufren durante las diferentes etapas del ciclo, la preñez y la lactación.

a) *El epitelio germinativo.*—El epitelio germinativo no presenta homogéneamente la misma estructura en toda la superficie ovárica y tampoco las mismas reacciones histoquímicas.

En ciertas zonas es más alto, cilíndrico, en tanto que en otras es aplanado. En algunas regiones presenta gotitas sudanófilas y O₂-Schiff positivas en su polo apical, que son negativas con el sulfato de azul Nilo, Schultz-negativos, y no dan birrefringencia ni fluorescencia. En cambio la reacción de Baker es positiva mostrando gránulos negros en la región apical y basal de numerosas células. Se observan algunas células del epitelio germinativo fuertemente cargadas de fosfolípidos. Estas células son, en general, más delgadas que sus vecinas y parecen ser elementos en regresión (fig. 1). El citoplasma de las células epiteliales presenta discreta afinidad para los colorantes básicos (pironina) índice de su contenido en ribonúcleoproteínas. Las reacciones para mucoides (PAS y metacromasia) fueron negativas. En cambio el conjuntivo subyacente al epitelio, que forma una delgada albugínea, es francamente positivo con el PAS y discretamente metacromático.

No hemos observado variaciones cíclicas en el epitelio germinativo habiendo comprobado, en cambio, diferencias bastante grandes entre unos individuos y otros,

b) *Folículos primordiales*.—El negro Sudán muestra la presencia de algunas finas granulaciones lipídicas en el ovocito. En cambio las células tecales, que forman una sola capa, son totalmente negativas.

La técnica de Baker revela la existencia de gotitas de fosfolípidos en el citoplasma del ovocito. Todas las otras reacciones han sido negativas en cualquiera de las estructuras de los folículos primordiales.

c) *Folículos en crecimiento*.—Hay ya una etapa evolutiva importante cuando en el folículo comienza la secreción del licor folicular y se produce el antro. En los folículos en crecimiento la reacción general para lípidos (negro Sudán) es positiva en el citoplasma de las células de la teca interna (fig. 2). La granulosa está, en general, libre de gotitas sudanófilas pero durante el metaestro la mayor parte de los folículos en crecimiento contienen finas gotitas de lípidos en el citoplasma de las células de la granulosa (fig. 3). Se trata en este caso de folículos que han alcanzado un cierto grado de desarrollo y que se hacen atrésicos inmediatamente después de la ovulación. La reacción para glicéridos (sulfato de azul Nilo) es negativa en las distintas estructuras de los folículos en crecimiento. En cambio en las células tecales la reacción O_2 -Schiff es positiva y se observan cruces de polarización (fig. 4). Con la técnica de Baker las células tecales presentan gotitas de fosfolípidos distribuidas homogéneamente en su citoplasma. En la granulosa las células presentan uno o varios gránulos, localizados en el citoplasma, al lado del núcleo y que se tiñen intensamente con la técnica de Baker (fig. 5). Con toda probabilidad se trata de los fosfolípidos del aparato de Golgi que aparecen en esa forma. La reacción de Schultz es positiva en la teca interna.

El citoplasma de las células de la granulosa es francamente basófilo. Es la estructura citoplásmica más basófila de todo el ovario, en cualquier momento del ciclo. Con el azul de toluidina el licor folicular aparece

enteramente metacromático: también es metacromática la membrana pelúcida aunque con menor intensidad. Ambas reacciones desaparecen digiriendo previamente los cortes con hialuronidasa. Con la técnica del PAS se tiñe la membrana pelúcida y el licor folicular, tinción que no es afectada por la digestión con hialuronidasa (fig. 6).

La fosfatasa alcalina aparece en la teca interna de los folículos en crecimiento. En esta capa la reacción es positiva a nivel del citoplasma de las células tecales, todavía más en los endotelios capilares. También es netamente positiva en las estructuras intercelulares, probablemente fibrilares (fig. 7). La reacción es negativa, muy o débilmente positiva en el citoplasma de las células granulosas. Es débilmente positiva a nivel del licor folicular.

En los folículos en crecimiento no es demostrable la presencia de esterasa.

Fuera de la presencia en metaestro de gotitas lipídicas en la granulosa, que no se observan en los otros períodos, no se advierten diferencias histoquímicas en los folículos en crecimiento en las diferentes fases del ciclo estral.

d) *Folículos de Graaf*.—Los folículos de Graaf maduros se encuentran en el estro. En estos folículos la teca interna ha adquirido un desarrollo notable, en tanto que la granulosa ha quedado reducida a unas pocas hileras celulares. La teca interna está notablemente irrigada y presenta formaciones en cuña que deprimen a la granulosa y hacen saliente en ella. Sin embargo, la granulosa todavía no ha comenzado a vascularizarse.

Las células de la teca interna presentan su citoplasma con abundantes gotitas sudanófilas. En las células tecales la técnica del sulfato de azul Nilo muestra una muy discreta coloración rojiza. En las mismas células se comprueba la existencia de abundantes fosfolípidos dispuestos en forma de finas granulaciones (fig. 8). La reacción O_2 -Schiff es positiva en las células de la teca interna así como también se encuentran en

ellas gotitas birrefringentes. La reacción de Schultz muestra la presencia de gotitas de colestéridos.

En la granulosa es notable la existencia de abundantes gotitas de lípidos localizadas en la región basal de las células de la capa más externa. Estos lípidos dan una intensa reacción de Baker (fig. 8). Se pueden observar espaciadas gotitas lipídicas también en la segunda y hasta en la tercera capa de las células de la granulosa. La técnica de Baker, además de la intensa reacción en las células más externas, muestra también reacción en todas las células de la granulosa. Esta reacción está formada por algunos gránulos que rodean el núcleo. Persisten las reacciones que hemos descrito en los folículos en crecimiento para mucoproteínas, aunque débiles. La reacción para fosfatasa alcalina es positiva en las células y en los endotelios capilares de la teca interna y la reacción para lipasa es negativa.

Hemos investigado fermentos proteolíticos en el licor folicular de folículos de Graaf, con resultado negativo.

e) *Cuerpo lúteo*.— Inmediatamente de roto el folículo comienza la invasión de capilares y células tecales y se cumple el proceso de transformación de las células granulosas y tecales, en células luteínicas.

Diez horas después de la ovulación el cuerpo lúteo está en vías de organización y recién están comenzando a penetrar los vasos. En esta etapa posee todavía pocos elementos sudanófilos localizados en la periferia y hay una relación bastante regular entre la zona de penetración de los capilares y la de luteinización celular (figs. 9 y 10).

El cuerpo lúteo de la rata se forma por participación de elementos originados en la teca y en la granulosa (Pederson, 1952). Es posible, todavía en esta etapa, diferenciar las células de origen tecal de las células de la granulosa. Las células granulosoluteínicas más pequeñas, de citoplasma más basófilo y núcleo más denso; las otras con gran núcleo vesiculoso muy claro, con escasa

cromatina granular y con 1 a 2 nucléolos. En las células tecaluteínicas se observan con frecuencia mitosis las que, al contrario, son raras, en esta etapa, en las células granulosoluteínicas.

El proceso de luteinización se cumple progresivamente apareciendo en el citoplasma primeramente 2 ó 3 gotitas sudanófilas que aumentan rápidamente en número. En general hay una tendencia en las gotas de grasa a disponerse en posición polar hasta que, al aumentar su número, llenan totalmente el citoplasma celular.

La técnica de Baker nos muestra que la cantidad de fosfolípidos presentes es mucho mayor que la que se pudiera sospechar dada la cantidad de lípidos revelables por el negro Sudán. Todas las células periféricas están cargadas de granulaciones que llenan totalmente el citoplasma. En general la distribución es similar a la que hemos descrito para los lípidos sudanófilos pero, aparte de que los gránulos presentes en las células periféricas son más abundantes, también las células centrales presentan muchas granulaciones, aunque menos intensamente coloreadas. Cada una de las células centrales presenta un núcleo rodeado por un collar de gránulos (fig. 11). La luz polarizada revela unas pocas gotitas birrefringentes (fig. 12). Es notable el hecho de que las células tecales de los folículos en crecimiento son más ricas en gotitas birrefringentes que las del cuerpo amarillo reciente. La reacción de Schultz es negativa. No hay fluorescencia apreciable. La fosfatasa alcalina no aparece en el cuerpo lúteo joven. En cambio se observa una neta reacción positiva de la esterasa (fig. 13). La reacción O₂-Schiff es negativa.

En el segundo día del diestro, es decir, 36 horas después de la ovulación, los cuerpos lúteos se han vascularizado y luteinizado completamente. Todas las células contienen gotitas sudanófilas, aunque varía grandemente la cantidad que hay en cada una de ellas. Algunas, con el citoplasma atiborrado

de granulaciones pequeñas, han alcanzado el máximo de luteinización. Otras células presentan solamente algunos gránulos dispuestos hacia un polo (fig. 14). Entre estos dos extremos están todos los intermediarios, que dominan en esta etapa. Hay glicéridos que se disponen en gotitas finas. El Baker muestra que prácticamente todas las células están llenas de granos pequeños, de contorno irregular, que llenan todo el citoplasma. Probablemente no hay coincidencia entre éstos y los gránulos sudanófilos. La luz polarizada da alguno que otro punto brillante (figura 15). La reacción de Schultz muestra escasos granos muy finos de color verdoso. La reacción de O₂-Schiff es intensamente positiva. No hay fluorescencia amarilla. La fosfatasa alcalina es negativa en las células luteínicas, y al contrario positiva en el endotelio de los vasos (fig. 16). La ésterasa es netamente positiva en las células luteínicas (fig. 17).

El cuerpo lúteo en proestro está, como por otra parte todo el ovario, fuertemente congestivo. Las células van adquiriendo cada vez más un aspecto espumoso, consecuencia de la mayor carga de lípidos. Las preparaciones con Sudán muestran que ha aumentado el contenido general en gotas sudanófilas, en especial hay una mayor homogeneidad en el contenido de las células. El sulfato de azul Nilo no muestra o muestra sólo muy escasos gránulos rojizos. El método de Baker muestra abundantes granulaciones en casi todas las células. La reacción de Schultz es negativa o débilmente positiva en la periferia. Hay muy escasos granitos birrefringentes.

En el estro, es decir, en el momento que se rompen los nuevos folículos, el cuerpo lúteo ha alcanzado su máximo volumen y también su mayor contenido en lípidos. Las células son ahora homogéneamente grandes y contienen abundantes gotitas sudanófilas que se distribuyen en gotas pequeñas y regulares en todo el citoplasma (figs. 18 y 19). Aparecen zonas en que es notable una des-

integración celular que está en contradicción con el hecho de que es en este momento que el cuerpo lúteo ha alcanzado su vascularización más completa y abundante. Se observan pocas gotitas de glicéridos; en cambio es abundante e intensa la reacción para fosfolípidos. La reacción O₂-Schiff es intensamente positiva en todas las células. Las gotitas birrefringentes son más abundantes y más homogéneamente distribuidas, de lo que han sido hasta la fecha. La reacción de Schultz es muy débilmente positiva en las células luteínicas. La fluorescencia amarillo verdosa existe, pero es débil. La técnica de Hotchkiss muestra el notable aumento del retículo que se ha desarrollado en torno a las células luteínicas y en los vasos.

A partir de esta etapa, es decir del estro siguiente a la ovulación, el contenido de materiales sudanófilos se reduce progresivamente. Las células van perdiendo sus granulaciones pequeñas y abundantes para adquirir una menor cantidad de gránulos mayores. No todos los elementos celulares realizan la evolución simultáneamente, sino que hay algunas células que se van empobreciendo en lípidos, al mismo tiempo que otras mantienen su primitiva riqueza. Durante el diestro, del ciclo segundo en un número creciente de células empiezan a reunirse el material sudanófilo en una sola gran gota, de tamaño mayor que el núcleo. Muchos elementos empiezan a mostrar una tinción grisácea difusa del citoplasma. La cantidad de glicéridos ha aumentado y las grandes gotas se tiñen de rojo por el sulfato de azul Nilo. El método de Baker muestra que todas las células presentan abundantes gránulos positivos. Las grandes gotas son negativas. Todavía se observa un cierto número de gotitas birrefringentes notablemente menores que en etapas anteriores. La reacción O₂-Schiff se ha reducido muy notablemente apareciendo reacción solamente en algunas células. La fluorescencia es débil. La fosfatasa alcalina sigue siendo negativa

en las células luteínicas en tanto que es positiva en los endotelios vasculares. La esterasa es positiva. Al terminar el nuevo estro, coexisten tres generaciones de cuerpos lúteos; la de los folículos recién rotos, los que tienen un ciclo de edad, cuyo análisis histoquímico ya hemos realizado, y los que tienen dos ciclos de edad (es decir unos 8 días de evolución). Estos últimos tienen mucha menor cantidad de grasa y más irregularmente distribuida; en algunas células aparece tan sólo un color gris difuso en el citoplasma, en tanto que otras exhiben una gran gota que ocupa casi todo el citoplasma. El sulfato de azul Nilo muestra una mayor abundancia de glicéridos. El método de Baker revela una notable reducción de los fosfolípidos y sobre todo una distribución desigual de los mismos, habiendo algunas células muy cargadas y otras casi vacías. La reacción de O_2 -Schiff es prácticamente negativa. No hay granos birrefringentes. La fluorescencia es nula. La reacción para lipasa está debilitada; en cuanto a la fosfatasa alcalina no hay variaciones.

El cuerpo lúteo ha completado en estos dos ciclos toda su vida. Queda todavía una agrupación celular cada vez más pobre en lípidos, más invadida por tejido conjuntivo y más pobre en irrigación, que puede arrastrar su duración hasta dos o excepcionalmente tres ciclos más. Pero ya ha perdido totalmente su estructura glandular endocrina y toda capacidad reaccional. No es más que un resto que progresivamente va desapareciendo sin dejar rastro.

f) *Tejido intersticial*.— Aunque aceptamos el punto de vista de que la glándula intersticial se forma a consecuencia de la evolución de los folículos atrésicos, consideramos conveniente describir por separado los folículos atrésicos que todavía exhiben una granulosa, de aquellos que ya han perdido su individualidad como folículos y que se han incorporado a la estructura difusa que constituye la glándula intersticial. Llamamos así al tejido abundante en esta espe-

cie, que se forma como última etapa de la atresia folicular, cuando ya no son más individualizables los folículos y el tejido se convierte en una formación difusa, epitelioides, ricamente vascularizada y con la estructura histoquímica que veremos.

La glándula intersticial presenta abundantes lípidos (fig. 20), en cantidad aún mayor que los cuerpos amarillos. Hay una diferencia muy neta en la disposición de los materiales sudanófilos entre las células de uno y otro tejido. Esta grasa está constituida en gran parte por glicéridos y es en estas células que los glicéridos son más abundantes. En cambio los fosfolípidos son escasos y en lugar de aparecer, como en la célula luteínica en forma de granulaciones, se disponen en forma más bien difusa. Se observan lípidos birrefringentes; es aquí que los materiales birrefringentes son más abundantes. La reacción de O_2 -Schiff es intensa en todo el citoplasma de estas células. La reacción de Schultz es intensamente positiva en toda la extensión del tejido intersticial. Es esta región, indudablemente, la que presenta más intensa reacción para colestéridos. También presenta una notable fluorescencia amarillo verdosa, que es la más intensa de todas las estructuras ováricas.

2º) *EL OVARIO GRAVIDICO*.— Si durante el estro se ha producido el acoplamiento y sobreviene el embarazo el ritmo regular de los ciclos estrales se interrumpe y cambios profundos se cumplen en el ovario. En primer término el cuerpo lúteo no regresa sino que permanece durante toda la duración de la preñez. En segundo término se comprueba una inhibición de la ovulación que dura hasta el parto. Inmediatamente después que se ha producido éste hay una nueva ovulación que da origen al cuerpo lúteo de lactación que, si hay nuevo acoplamiento, se convierte en cuerpo lúteo de una nueva preñez.

a) *Los folículos*.— Al cuarto día del acoplamiento el ovario está constituido por un número grande de folículos en crecimen-

to con más o menos claros signos de atresia. Entre éstos algunos de notable tamaño próximo al diámetro del folículo maduro, que incluso presentan las cuñas tecaes características de éste, pero que irán también a la atresia.

Se observan cuerpos amarillos de diferente edad, pues además de cuerpos lúteos gravídicos en plena evolución progresiva, se hallan los de los ciclos anteriores, en franca regresión.

Los folículos primordiales presentan algunas escasas y muy finas gotitas sudanófilas en el citoplasma del ovocito. También la corona única de células de la granulosa presenta muy finos granitos sudanófilos. No hay glicéridos.

Los folículos en crecimiento, todos ellos en vías de atresia, presentan variados grados de engrosamiento tecal. Las células tecaes contienen gotas lipídicas abundantes y de tamaño relativamente grande (figs. 21 y 22). La granulosa presenta aspecto variado según los folículos. En algunos no presenta signos regresivos y, al contrario, pueden observarse células en mitosis. Otros, en cambio, presentan fenómenos degenerativos como ser cariorrexis con abundantes granos cromatínicos (fig 23); en otros el proceso de atresia se manifiesta por la existencia de gotitas lipídicas en el citoplasma de las células granulosas.

La teca interna de los folículos en atresia presenta gotitas con reacción de los glicéridos. Estos son abundantes en las células tecaes transformadas en glándula intersticial. Con el método de Baker se comprueba la existencia de finas gotitas de fosfolípidos en las células de la teca interna. En la granulosa hay gotitas de fosfolípidos de variada abundancia. En algunos folículos la capa externa de células de la granulosa presenta abundantes gotitas de posición basal.

b) *Cuerpo lúteo*.— Al cuarto día de embarazo los cuerpos amarillos se hallan totalmente constituidos y vascularizados en su totalidad. Las células luteínicas se hallan

llenas de gotitas lipídicas muy regulares en tamaño y regularmente distribuidas en el citoplasma (figs. 24 y 25). Aunque hay apreciables variaciones en el contenido lipídico de las diversas células, el conjunto es, sin embargo, bastante homogéneo, estableciéndose así una diferencia en los cuerpos lúteos del ciclo. La reacción del sulfato de azul Nilo para glicéridos es negativa. La reacción PAS es positiva a nivel del citoplasma de los fibroblastos del cuerpo lúteo; no desaparece cuando se le digiere previamente con hialuronidasa.

El método de Baker muestra todas las células luteínicas llenas de muy finos granitos de fosfolípidos homogéneamente distribuidos en el citoplasma (figs. 26 y 27). La reacción de Schultz es negativa en los cuerpos lúteos de preñez en tanto que es positiva en los cuerpos lúteos viejos pertenecientes a ciclos anteriores.

Al cuarto día de la preñez la glándula intersticial es relativamente abundante y sus células están cargadas de gotitas lipídicas. En ellas es positiva la reacción de los glicéridos con el sulfato de azul Nilo. Positiva intensa también la reacción de Schultz.

A los catorce días de la preñez los cuerpos lúteos han alcanzado su máximo desarrollo. En el ovario no se observan otros cuerpos amarillos que los que corresponden a esa preñez ya que los de los ciclos anteriores han desaparecido completamente para esta época. Hay numerosos folículos en atresia y una bien desarrollada glándula intersticial.

Las células luteínicas son grandes. Su citoplasma está atiborrado de lípidos sudanófilos que se disponen en muy pequeñas gotitas que llenan completamente las células (fig. 28). La reacción del azul Nilo demuestra la existencia de glicéridos que por primera vez aparecen en las células luteínicas en esta época, los glicéridos no se hallan en todas las células pero hay un cierto número que presenta una reacción rojiza granular. La reacción de Schultz muestra escasos y

pocos gránulos en las células. Es también en este momento que por primera vez se observan colestéridos en las células luteínicas.

La técnica de Baker muestra una reacción granular intensa en las células luteínicas que adopta la forma de gránulos pequeños o de cortos bastoncitos. Con esta técnica se destacan muy netamente unas células, más abundantes en unos cuerpos lúteos que en otros, de forma irregular, pero en general con cortos prolongamientos, que se diferencian muy netamente de las células luteínicas, entre otras cosas, por sus bordes cóncavos, en contraste con el contorno saliente de las luteínicas, y que con la técnica de Baker se caracterizan de modo notable por la enorme carga en fosfolípidos que hay en su citoplasma. La totalidad del citoplasma aparece densa, intensa y homogéneamente negra. Es difícil, en algunos casos, distinguir el núcleo incoloro a causa de la intensa coloración citoplásmica. Estas células tienen una clara situación intersticial y constituyen, seguramente, fibroblastos. Consideramos a tales elementos equivalentes a las células que han sido designadas con el nombre de células K por White y col. (1951) (fig. 29).

El PAS nos muestra una neta reacción positiva a nivel del citoplasma de los fibroblastos.

3º) **EL OVARIO DURANTE LA LACTACIÓN.**— En el momento del parto el ovario presenta un nuevo empuje de maduración folicular culminando con la ruptura de una serie de folículos que ocurre de 24 a 36 horas después del parto. Se forman, a partir de estos folículos, cuerpos lúteos de lactación que presentan algunas características que les son propias. Si la hembra tiene contacto con el macho en el momento de la ruptura folicular, se constituye un nuevo embarazo que transcurre durante la lactación. Este embarazo es más prolongado que el normal pues la lactación induce un marcado retraso en la implantación.

En el momento del parto y en las pocas horas siguiente el ovario presenta dos juegos diferentes de folículos: en primer término los que pertenecen al embarazo transcurrido constituidos por folículos atrésicos y cuerpos lúteos en franca regresión; en segundo lugar un juego de folículos que evoluciona rápidamente a la ruptura folicular y con ello hacia la formación de nuevos cuerpos amarillos. En medio de una glándula intersticial medianamente desarrollada se encuentran unos pocos folículos en vías de atresia. Pero el cuadro principal del ovario en este período está representado por los cuerpos lúteos en regresión y los folículos de Graaf en inminente ruptura.

Los cuerpos lúteos gravídicos en regresión presentan sus células cargadas de lípidos que rellenan totalmente su citoplasma en forma de pequeñas gotitas regulares. La técnica del sulfato de azul Nilo muestra que una gran parte de los lípidos está constituida por glicéridos. Existen también fosfolípidos pero en menor cantidad y situados entre las gotitas lipídicas. Hay células con gran carga de fosfolípidos, probablemente fibroblastos, pero en menor cantidad que en etapas anteriores. La reacción O_2 -Schiff es positiva y también localizada en la superficie de las gotitas. La técnica de Schultz muestra una intensa reacción granular a nivel de las células luteínicas.

La fosfatasa es positiva en los endotelios capilares y negativa en las células luteínicas.

Los folículos maduros no presentan características que los diferencien de los que hemos descrito en un ciclo regular.

La glándula intersticial es pobre en lípidos, más pobre que en ningún otro momento de la actividad sexual. Presenta pocos glicéridos y una reacción neta, pero también reducida, con el reactivo de Schultz. No contiene fosfolípidos, en cambio la reacción O_2 -Schiff es intensamente positiva.

Cinco días después del parto, el cuerpo lúteo gravídico y el de lactación se distin-

guen fácilmente uno de otro por su estructura histológica y por su constitución química (fig. 30).

Los cuerpos lúteos gestativos acentúan su carga lipídica y aumentan en ellos los glicéridos. En cambio los cuerpos lúteos de lactación presentan una carga lipídica mucho menor (fig. 31) y especialmente una menor cantidad de glicéridos que están reducidos a unas pequeñas y escasas gotitas distribuidas en la periferia del órgano. Los fosfolípidos son más abundantes en los cuerpos lúteos gravídicos que en los de lactación; también las reacciones O_2 -Schiff y Schultz son netamente más intensas en los cuerpos amarillos viejos que en los recientes. En especial los cuerpos lúteos gravídicos presentan una intensa birrefringencia con luz polarizada, que es muy escasa, o mismo inexistente, en los cuerpos de lactación.

IV. DISCUSIÓN

La oportunidad de poseer técnicas químicas de mayor valor para el análisis de los lípidos que de cualquier otra sustancia, permite reconocer mejor las variaciones lipídicas que cualquier otro cambio. Es ya un dato clásico que las células luteínicas se caracterizan precisamente por su progresivo enriquecimiento en lípidos citoplásmicos.

En los folículos primordiales no hemos reconocido la presencia de lípidos sudanófilos con excepción de una coloración gris difusa en el citoplasma del ovocito. La birrefringencia, la reacción de Schultz, la reacción para grupos carbonilos, la reacción de Hotchkiss-Mc Mannus, así como las reacciones para fosfatasa alcalina y lipasa, han sido constantemente negativas en estos folículos. Confirmamos así los hallazgos de Dempsey y Basset (1943) y de Deane y Barker (1952) y Deane (1952). Esta última autora, agrega la reacción negativa para el ácido ascórbico y al contrario encontró una débil reacción positiva para la fosfatasa alcalina, casi imperceptible cuando se emplea

como sustrato el glicerofosfato. A la luz de estos hallazgos el folículo primordial no parece poseer una gran actividad metabólica, los hallazgos más importantes parecen estar en el ovocito donde se ha encontrado glucógeno (Deane, 1952) y donde nosotros hemos puesto de manifiesto la presencia de fosfolípidos bastante abundantes. Creemos que ambos hechos deben estar relacionados a la vitelogénesis que se está cumpliendo activamente en este período. En las células de la granulosa hemos comprobado la presencia de un gránulo fosfolipídico probablemente en relación con el aparato de Golgi.

En los folículos en crecimiento y en los folículos maduros en inminencia de ruptura, nuestros hallazgos son, en general, confirmatorios de los de Deane (1952). En cambio no hemos comprobado la reducción del contenido lipídico de la teca interna en los folículos de Graaf del proestro y el estro comenante. Al contrario, en estos períodos hemos comprobado la presencia de gotitas lipídicas pequeñas y relativamente abundantes localizadas en las capas más externas de la granulosa. Los lípidos de la teca interna parecen estar formados principalmente por fosfolípidos que se tiñen por la técnica de Baker y que son birrefringentes. Los mucopolisacáridos están representados en el licor folicular y en la membrana pelúcida. El primero es PAS positivo y fuertemente metacromático. Esta última reacción desaparece por digestión previa con hialuronidasa, lo que no afecta la reacción del PAS. Puede concluirse en consecuencia que en el licor folicular se encuentran, al menos, dos tipos de mucopolisacáridos; uno conteniendo ácido hialurónico en su molécula y otro que no es destruido por la hialuronidasa. En los folículos maduros ambas reacciones son más débiles, lo que puede explicarse por imbibición acuosa. Los mucopolisacáridos en ciertas condiciones absorben grandes cantidades de agua y esto podría quizá explicar el brusco crecimiento que sufre el folículo inmediatamente antes de su ruptura.

Los folículos en crecimiento muestran variaciones en su tamaño, su estructura y su composición histoquímica en las diversas fases del ciclo. El contenido lipídico de la teca interna aumenta a medida que va avanzando el diestro, y se hace más intenso en el proestro y el estro. En estos dos períodos aparecen también lípidos en la granulosa localizados en la zona basal de las células de la capa más externa.

Deane (1952) ha descrito la aparición, en diestro, de una reacción más intensa en la teca interna para los grupos carbonilos y la fluorescencia más vigorosa. Nosotros no hemos podido confirmar estos hallazgos. En cambio es evidente que tanto la metacromasia, como el PAS se hacen más débiles a medida que el folículo va avanzando en su maduración, lo que parece indicar una reducción relativa del contenido en mucoproteínas.

Los hallazgos antes mencionados indican que, a medida que el folículo va progresando en su maduración, aumenta el contenido en lípidos de la teca interna y que en proestro y estro también aparecen lípidos en la granulosa. El conjunto de reacciones empleado por nosotros muestra, asimismo, que el aumento se produce en una mezcla de lípidos de diferentes clases (fosfolípidos, colestéridos, etc.), sin que un tipo especial de lípido se haya elaborado con exclusividad o predominancia.

El cuerpo lúteo cíclico se caracteriza desde su comienzo por la presencia en las células de finas gotitas lipídicas. Al principio la carga lipídica es mayor en las células de origen tecal que en las células de la granulosa pero pronto estas últimas adquieren mayor carga lipídica y es imposible diferenciarlas por este procedimiento. Un hecho de interés es que ya desde las etapas precoces se revela la existencia de abundantes fosfolípidos y, al contrario, un escaso contenido en glicéridos. En esta etapa precoz no hemos podido poner de manifiesto la presencia de colestéridos y el número de

gotitas birrefringentes (cruces de polarización) es escaso notándose que su número es inferior al que presenta la teca interna antes de la ruptura folicular.

Estos hechos indican una neta transformación del contenido lipídico caracterizado por la presencia de mezclas complejas en las que han aumentado notablemente al evolucionar el ciclo, la cantidad de fosfolípidos, y han aparecido glicéridos que no existían anteriormente. Al contrario, se han reducido las gotitas birrefringentes y han desaparecido los colestéridos revelables por el método de Schultz. El otro elemento histoquímico importante observado en este período es la presencia en la célula luteínica de una neta reacción positiva para la esterasa.

La reacción para la fosfatasa alcalina en esta especie es positiva en la teca interna del folículo de Graaf y en el cuerpo amarillo; en éste la reacción se localiza exclusivamente en los endotelios vasculares. En esto el ovario de rata se comporta como el de cerdo, si tenemos en cuenta las observaciones de Corner (1944, 1948); pero, al contrario de lo que sucede en el cerdo, las células tecaluteínicas no continúan con la reacción fosfatásica, luego de formado el cuerpo lúteo. Nuestros hallazgos, en lo que a enzimas se refieren, confirman totalmente los que han sido descritos por Hebert y Verne (1953).

Estamos todavía lejos de poder sacar conclusiones de todos estos cambios que puedan servirnos para conocer el mecanismo de biosíntesis de las hormonas ováricas. Se creyó primeramente que los esteroides se elaboran a partir del colesterol o de alguna sustancia similar. Esta hipótesis apareció como una conclusión natural a la similitud de estructura molecular entre estas sustancias (Fieser, 1937), pero sin que se hubiese aportado ninguna evidencia experimental a favor de ese concepto.

Trabajos posteriores, realizados mediante perfusión de suprarrenal con acetato o

con colesterol, ambos "marcados" con carbono radioactivo, han mostrado que los esteroides radioactivos son mucho más abundantes luego de perfusión con acetato que con colesterol. Esto parece indicar que la biosíntesis de los esteroides se cumple a partir de un precursor que está formado por el acetato y no por el colesterol. La inyección de colesterol-4-C 14 en las venas de una yegua preñada no se siguió la eliminación de estrona radioactiva, como debió acontecer, si esta hormona se formase a partir del colesterol (Heard y O'Donnel 1954). En opinión de Hechter y Pincus (1954), el acetato sería la primer etapa hacia la formación del colesterol y éste daría origen a los corticoides. Es razonable pensar que este ciclo de biosíntesis que se va revelando en la suprarrenal, o uno muy similar, se cumpla también en el ovario. Los estudios químicos e histoquímicos realizados sobre el ovario de la coneja por Claesson y colaboradores (Claesson e Hillarp, 1947, a y b; Claesson, Diczfalusy, Hillarp y Hogberg, 1948) indican que en la coneja preñada el contenido en colesterol (químicamente apreciado por dosificación sobre el extracto clorofórmico), y en substancia birrefringente (demostrable en los cortes histológicos por la técnica de Schultz), disminuye en los días que siguen inmediatamente al coito; la inyección de hormonas gonadotróficas produce también una muy notable reducción del colesterol y substancias análogas. Los esteroides ováricos, en especial el colesterol, sería movilizado paralelamente a la producción de hormona activa (es decir estrógenos), movilización que, mediante inyecciones de gonadotrofina, se cumple en unas pocas horas. Estos hechos llevan a los autores a concluir que los esteroides están intrincadamente vinculados a la formación de estrógenos. La conclusión de esos autores es que los esteroides almacenados en la glándula intersticial son los precursores de las hormonas estrogénicas. En la rata habría dos momentos del ciclo con máximo contenido en "precursor", el proestro y el

metaestro. Tres horas y media después del coito habría una significativa reducción del contenido en precursor; esta reducida cantidad se mantiene hasta 15 horas postcoitum. Luego vuelve a aumentar para mantenerse a alto nivel durante toda la preñez; el "precursor" se moviliza cuando a la hembra preñada se le inyectan gonadotrofinas.

La interpretación de los autores antes mencionados no está a cubierto de críticas, en cuanto al valor que le asignan a la birrefringencia con la técnica que ellos emplean. La circunstancia de que ésta sólo aparece luego de una prolongada fijación en formol, parece indicar que se debe a cristalización de lípidos no precisados, más bien que a su contenido en colesterol. Creemos prematura, en base a los métodos actualmente a nuestro alcance, atribuir a una o dos reacciones histoquímicas tanto valor como para permitirnos afirmar la existencia de un "precursor" de los estrógenos, que no ha sido aún demostrado por los estudios químicos.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado con técnicas histoquímicas adecuadas el ovario de la rata blanca durante el ciclo estral, la gestación y la lactación. Se analizan los lípidos con una serie de reacciones características; sudanofilia, reacción de Baker; sulfato de azul Nilo, reacción de Schultz, birrefringencia, reacción 02-Schiff, fluorescencia, etc. Se estudiaron algunos prótidos; ácidos ribo y desoxiribonucleico, mucoproteínas, etc. Se analizó, por último, la localización de la fosfatasa alcalina y de la esterasa no específica.

La reacción histoquímica de los diferentes componentes cambia durante la evolución del folículo. En los folículos primordiales las diferentes reacciones son negativas. En el folículo en crecimiento la teca interna presenta lípidos (fosfolípidos y colestéridos) y reacción intensa de fosfatasa alcalina. La

granulosa es rica en ribonúcleoproteínas y en mucoproteínas. En el folículo maduro el contenido en lípidos se acentúa y estos aparecen también en las capas más externas de la granulosa.

En el cuerpo lúteo el contenido en lípidos aumenta hasta el ciclo siguiente y recién cuando ha alcanzado el máximo de carga en lípidos totales aparecen glicéridos. El contenido en colestéridos es escaso en el cuerpo lúteo activo y solamente aparecen cuando éste entra en neta regresión. La reacción para fosfatasa alcalina es negativa en las células luteínicas y positiva en los endotelios vasculares. La reacción para esterasa inespecífica (lipasa) es positiva en las células luteínicas.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Histochemical study of the rat ovary during the estrous cycle, pregnancy and lactation

This study has been performed on ovaries of albino rats using several cytochemical techniques at different selected moments of the estrous cycle, pregnancy and lactation. The lipids have been demonstrated by a group of histochemical methods that characterize them: sudanophilia, method of Baker, Nile Blue Sulphate, reaction of Schultz, birefringence, fluorescence, O_2 -Schiff. Proteins have been studied by the analysis of the basophilic substances, Feulgen reactions and PAS. Finally, lipase (non specific esterase) and alkaline phosphatase have been studied by the methods of Gomori.

Changes are observed in the distribution of different substances during the evolution of follicles and corpora lutea. In the primary follicles the different reactions were negative. In the vesicular follicles with an antrum the cells of the theca interna contain lipids (phospholipids and cholesterids) and a positive reaction of alkaline phosphatase. The granulosa is rich in RNA and in

mucopolisaccharides. In the ripe Graafian follicle the lipid content increases and fine lipid droplets appear in the cytoplasm of the cells of the outer layer of granulosa.

In the cyclic corpus luteum the lipid contents increases steadily until the next cycle; when its charge of lipids has reached its maximum then appear glicerides. Cholesterol contents is low in the active corpus luteum and only appears in conspicuous amount when the corpus luteum degenerates. Alkaline phosphatase is missing in the lutein cells but is positive in the endothelium of blood capillaries. The reaction for non-specific esterase (lipase) is positive in the cytoplasm of lutein cells.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, J. R.—The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. Microsc. Sc.*, 87: 441-470; 1946.
- BAKER, J. R.—Further remarks on the histochemical recognition of lipine. *Quart. J. Microsc. Sc.*, 88: 462-465; 1947.
- BASSETT, D. L.—The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat.*, 73: 251-280; 1943.
- BENNET, H. S.—The life history and secretion of the cells of the adrenal cortex of the cat. *Am. J. Anat.*, 67: 151-214; 1940.
- BOLING, J. L.; BLANDAU, R. J.; SODERWALL, A. L. & YOUNG, W. C.—Growth of the Graafian follicle and the time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.*, 79: 313-323; 1941.
- OLAESSON, L. & HILLARP, N. A.—The formation mechanism of oestrogenic hormones. I. The presence of an oestrogen-precursor in the rabbit ovary. *Acta Physiol. Scandinav.*, 13: 115-129; 1947.
- OLAESSON, L. & HILLARP, N. A.—The formation mechanism of the oestrogenic hormones. II. The presence of the oestrogen-precursor in the ovaries of rats and guinea-pigs. *Acta Physiol. Scandinav.*, 14: 102-119; 1947.
- OLAESSON, L.; DICZFALUSY, E.; HILLARP, N. A. & HÖGBERG, B.—The formation mechanism of oestrogenic hormones. III. Lipids of the pregnant rabbit and their changes at gonadotropic stimulation. *Acta Physiol. Scandinav.*, 16: 183-200; 1948.
- CORNER, G. W.—Alkaline phosphatase in the ovarian follicles and corpora lutea. *Science*, 100: 270-271; 1944.

- CORNER, G. W.—Alkaline phosphatase in the ovarian follicle and in the corpus luteum. *Contrib. Embryol.*, 32: 1-8; 1948.
- DEANE, H. W.—Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat.*, 91: 363-393; 1952.
- DEANE, H. W. & BARKER, W. L.—A cytochemical study of lipids in the ovaries of the rat and sow during estrous cycle. En: Engle, E. T. *Studies on testes and ovary, eggs and sperm*. Springfield. Ill. Ch. Tomas, p. 176-195; 1952.
- DEMPSEY, E. W. & BASSET, D. C.—Observations on the fluorescence, birefringence and histochemistry of the rat ovary during the reproductive cycle. *Endocrinology*, 33: 384-401; 1943.
- EVERETT, J. W.—The microscopically demonstrable lipids of the cyclic corpora lutea in the rat. *Am. J. Anat.*, 77: 293-317; 1945.
- EVERETT, J. W.—Hormonal factors responsible for deposition of cholesterol in the corpus luteum of the rat. *Endocrinology*, 41: 364-377; 1947.
- FIESER, L. F.—*The chemistry of natural products related to phenanthrene*. N. York, 1937.
- HEARD, R. D. H. & O'DONNELL, V. J.—Biogenesis of the estrogens: the failure of Cholesterol-4-C¹⁴ to give rise to estrone in the pregnant mare. *Endocrinology*, 54: 209-215; 1954.
- HEBERT, S. et VERNE, J.—L'équipement enzymatique de l'ovaire de la rate blanche étudié par les techniques cytochimiques. *Comp. rend. assoc. anat.*, 39: 343-344; 1953.
- HECHTER, O. & PINCUS, G.—Genesis of adrenocortical secretion. *Physiol. rev.*, 34: 459-496; 1954.
- LISON, L.—*Histochimie et cytochimie animales*. Paris, Gauthier-Villars, 1953.
- LONG, J. A. & EVANS, H. M.—The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, 6: 1-148; 1922.
- PADYKULA, H. A.—The localization of succinic dehydrogenase in tissue sections of the rat. *Am. J. Anat.*, 91: 107-146; 1952.
- PEDERSON, E. S.—Histogenesis of lutein tissue of the albino rat. *Am. J. Anat.*, 88: 397-416; 1951.
- VINCENT, W. S. & DORNFELD, E. J.—Localization and role of nucleic acids in the developing rat ovary. *Am. J. Anat.*, 83: 437-457; 1948.
- WHITE, R. F.; HERTIG, A. T.; ROCK, J. & ADAMS, E.—Histological and histochemical observations on the corpus luteum of human pregnancy, with special reference to corpora lutea associated with early normal and abnormal ova. *Contrib. Embryol.*, 34: 55-74; 1951.
- WISLOCKI, G. B.; BUNTING, H. & DEMPSEY, E. W.—Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. *Am. J. Anat.*, 81: 1-37; 1947.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Todas las microfotografías corresponden a ovarios de rata. El momento del ciclo fué reconocido mediante el examen del frotis vaginal y el estudio histológico del tractus genital.

ABREVIATURAS

- E. G.: Epitelio germinativo.
F. 2: Folículo en crecimiento.
F. A.: Folículo atresico.
G.: Granulosa.
T. I.: Teca interna.
G. I.: Glándula intersticial.
C. L.: Cuerpo lúteo.
L. F.: Licor folicular.
P.: Membrana pelúcida.

Fig. 1.—Epitelio germinativo. Rata en metaestro. La flecha indica una célula cuyo citoplasma aparece cargado de fosfolípidos y que se interpreta como un elemento en regresión. Técnica de Baker.

Fig. 2.—Folículo en crecimiento. Rata en diestro. En la granulosa se observan células en mitosis. Algunas células de la teca interna contienen gotitas lipídicas en el citoplasma. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 3.—Folículo en crecimiento. Rata en metaestro. Obsérvese las gotitas sudanófilas localizadas en el polo basal de la capa más externa de células de la granulosa. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 4.—Folículo en crecimiento. Rata en diestro. a) Microfotografía de orientación. b) Microfotografía con luz polarizada. Cruces de polarización a nivel de la teca interna. Montaje con glicerina.

Fig. 5.—Folículo en crecimiento. Rata en diestro. Las células de la granulosa presentan un grano único para cada célula en correspondencia con el aparato de Golgi. El citoplasma de las células tecaes está lleno de muy finos gránulos de fosfolípidos. Técnica de Baker.

Fig. 6.—Folículo en crecimiento. Rata en diestro. La membrana pelúcida y el licor folicular son netamente positivos con la técnica para coloración de mucopolisacáridos. También aparecen coloreados los manojos colágenos del estroma. Técnica de Hotchkiss (PAS).

Fig. 7.—Folículo en crecimiento. Rata en diestro. La teca interna presenta una intensa reacción de la fosfatasa alcalina. La granulosa y la glándula intersticial negativas. Técnica de Gomori.

Fig. 8.—Folículo de Graaf maduro. Rata en proestro. Las células de la granulosa presentan reacción granular de fosfolípidos localizada a nivel del aparato de Golgi. Las células de la capa más externa presentan granulaciones de localización basal. Las células tecaes tienen granulaciones regulares y abundantes que llenan totalmente el citoplasma. Técnica de Baker.

Fig. 9.—Cuerpo lúteo reciente. Rata en metaestro. Las células comienzan a cargarse de lípidos. Comienza también la invasión capilar. Coloración Negro Sudán B.

Fig. 10.—Cuerpo lúteo reciente. Rata en metaestro. Cada célula luteínica tiene algunas gotitas lipídicas irregulares. Coloración Negro Sudán B.

Fig. 11.—Cuerpo lúteo reciente. Rata en metaestro. Gotitas de fosfolípidos ocupando el citoplasma perinuclear en cada una de las células luteínicas. Técnica de Baker.

Fig. 12.—Cuerpo lúteo reciente. Rata en diestro. a) Micro de orientación. b) Con luz polarizada se observa la existencia de algunas gotitas birrefringentes en forma de cruces de polarización. Montaje con glicerina.

Fig. 13.—Cuerpo lúteo de 24 horas. Rata en diestro. El citoplasma de las células luteínicas es positivo a la reacción para la esterasa no específica. Técnica de Gomori.

Fig. 14.—Cuerpo lúteo de 36 horas de evolución. El contenido lipídico es variable en las diferentes células. La vascularización se ha completado. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 15.—Cuerpo lúteo de 36 horas de evolución. La luz polarizada muestra la existencia de escasas gotitas con cruces de polarización.

Fig. 16.—Cuerpo lúteo de 36 horas de evolución. Reacción negativa de la fosfatasa alcalina a nivel de las células luteínicas y positiva en los endotelios vasculares. Técnica de Gomori.

Fig. 17.—Cuerpo lúteo de 36 horas de evolución. Reacción positiva del citoplasma de las células luteínicas para la esterasa no específica. Técnica de Gomori.

Fig. 18.—Cuerpo lúteo en el estro siguiente a la ovulación. Cuatro días de evolución. Las células luteínicas están cargadas de finas gotas sudanófilas que llenan casi completamente el citoplasma. Se observan regiones de irregular distribución celular como la indicada por las flechas. Coloración Negro Sudán.

Fig. 19.—El mismo de la figura 18 a mayor aumento.

Fig. 20.—Vista panorámica de un ovario de rata en diestro. Hay folículos en crecimiento, folículos atresicos (uno de ellos conserva todavía un resto del ovocito) y abundante glándula intersticial. En esta última el contenido lipídico es muy abundante. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 21 y 22.—Folículo atresico al comienzo de la preñez. Aumento de la teca interna y mayor carga lipídica en sus células. Coloración Negro Sudán.

Fig. 23.—Folículo atresico al comienzo de la preñez. Gran cantidad de granos intensamente basófilos (Feulgen positivos) en las células de la granulosa, originados por fragmentación nuclear.

Figs. 24 y 25.—Cuerpos lúteos al 4º día de preñez. Las células tienen abundantes gotitas sudanófilas aunque su riqueza varía entre célula y célula. Coloración Negro Sudán.

Fig. 26.—Cuerpo lúteo al 4º día de preñez. Las células luteínicas llenas de gotitas de fosfolípidos dejan ver el núcleo en negativo. Algunos glóbulos rojos aparecen intensamente coloreados. Técnica de Baker.

Fig. 27.—Cuerpo lúteo al 4º día de preñez. Una imagen a gran aumento del mismo cuerpo lúteo de la figura anterior. Técnica de Baker.

Fig. 28.—Cuerpo lúteo de una rata al 14º día de preñez. El cuerpo lúteo se halla al máximo de desarrollo y sus células atiborradas de gotitas lipídicas. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 29.—Cuerpo lúteo de rata al 14º día de preñez. Las células presentan un moderado contenido en fosfolípidos. Grandes células de tipo fibroblástico con el citoplasma totalmente lleno de fosfolípidos. Técnica de Baker.

Fig. 30.—Ovario de rata cinco días del parto. Hay un cuerpo lúteo de embarazo en regresión (CL.1) y otro de lactación (CL.2) en plena actividad. Coloración con Negro Sudán.

Fig. 31.—Cuerpo lúteo de lactación. Contenido de las células en lípidos. Coloración Negro Sudán.







