

BIBLIOGRAFIA

- 1) AVERIKHIN, A. I. y VYATKIN, A. N. (1976). Mast cells in diseases of the genital organs of cows (endometritis). *Veterinariya. Moscow*, N.º 10, 58-61.
- 2) DOS SANTOS, J. A. (1982). Aparato genital femenino. En *Patología Especial de los Animales Domésticos*. Nueva Editorial Interamericana S.A., México, 138-193.
- 3) JONES, T. C. y HUNT, R. D. (1983). The genital system. En *Veterinary Pathology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1503-1543.
- 4) JUBB, K. V. F., KENNEDY, P. C. y PALMER, N. (1985). The female genital system. En *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, Orlando, 305-407.
- 5) KUMAR, N y SINGH, B. (1985). Some pathological conditions involving tubular genitalia in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian J. Anim. Sci.*, 55 (3), 159- 163.
- 6) MARCATO, P. S. (1990). Aparato genital femenino. En *Anatomía e Histología Patológica Especial de los Mamíferos Domésticos*. Interamericana McGraw Hill, Madrid, 255-274.
- 7) McENTEE, K. (1962). Pathology of the female reproductive system. En JOEST, E.: *Handbuch der speziellen-pathologischen Anatomie der Haustiere*. Paul Parey, Berlin, IV (23 y 24), 130-214.
- 8) MICKELSEN, W. D., PAISLEY, L. G. y ANDERSON, P. B. (1986). Survey of the prevalence and types of infertility in beef cows and heifers. *J. Am. vet. med. Ass.*, 189 (1), 51-54.
- 9) NAIR, K. P. y RAJA, C. K. S. V. (1976). Pathological conditions in the uterus of cows: miscellaneous lesions. *Indian J. Anim. Sci.*, 46 (5), 228-233.
- 10) SCHWARTZ, D. (1985). Relación entre dos caracteres cualitativos. En *Métodos estadísticos para médicos y biólogos*. Editorial Herder, S.A., Barcelona, 35-121.

EFFECTOS DEL DIETILESTILBESTROL Y ZERANOL SOBRE LA ESTRUCTURA DEL EPIDIDIMO EN LA ESPECIE OVINA

(EFFECTS OF DIETHYLSTILBESTROL AND ZERANOL ON THE MICROSCOPICAL FEATURES IN THE OVINE EPIDIDYMIS)

Por Martínez Rodríguez, J.M., *
Ferrerías Estrada, M.C., *
García Iglesias, M.J., *
Bravo Moral, A.M., *
Pérez Martínez, C., *
y Escudero Díez, A. *

Palabras clave: Epidídimo, cordero, zeranol, DES.

Key words: Epididymis, lamb, zeranol, DES.

SUMMARY

We carried out a study of the microscopic epididymal changes in 38 Churra breed lambs induced by the administration of DES and zeranol performed by different viae. For the histological study the epididymes were examined at three different segments: initial, middle and terminal. With zeranol we observed a decrease in the diameter of the epididymal duct also these ducts were lined by an immature epithelium without stereocilia specially in the implanted lambs. In the tubular epithelium of DES treated lambs we usually found principal cell vaculation as well as basal cell proliferation and leucocitary infiltrates which formed cumulus into the tubular lumen. These findings were more evident at the terminal segment of the epididymis. At this segment DES produced tubular dilation and large cystic forms lined by a flattened epithelium without stereocilia. Specially in the terminal segment of the epididymis with DES we found fibromuscular hyperplasia as well as nodular or diffuse mononuclear cell infiltrates, diffuse mononuclear infiltrates.

RESUMEN

Estudiamos las modificaciones microscópicas del epidídimo producidas tras la administración de DES y zeranol por distintas vías, en 38 corderos de raza Churra. Para el

* Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica.
Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

An. Fac. Vet. León. 1990, 36, 43-57

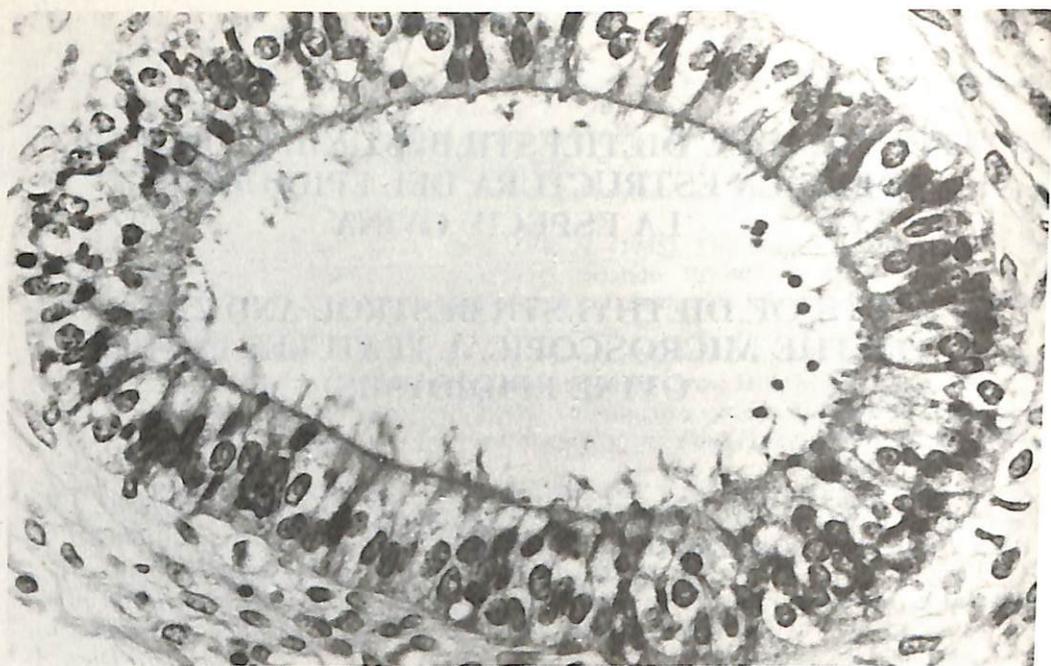


Figura 1.- Procesos degenerativos del epitelio. Grupo I (DES). Segmento medio. Ob. 45X.

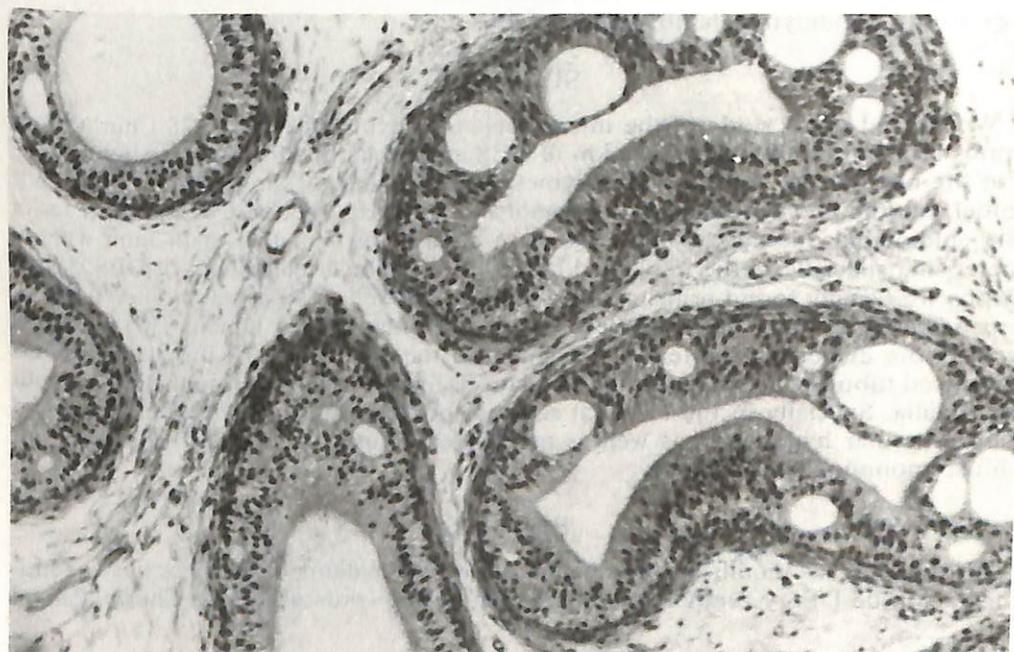


Figura 2.- Proliferación de aspecto pseudoglandular intraepitelial. Grupo I (zeranol). Segmento medio. Ob. 10X.

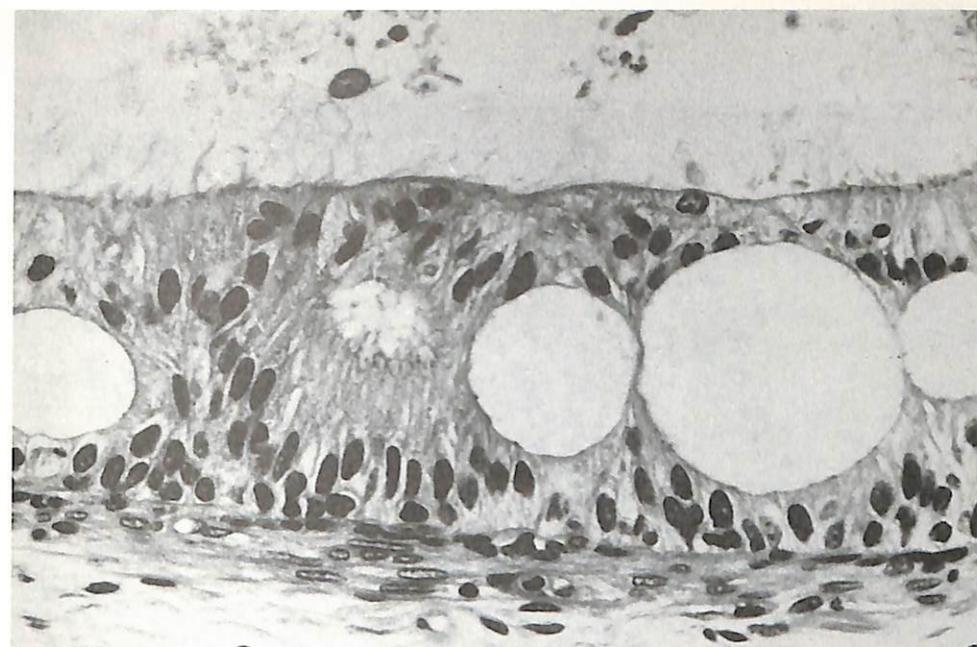


Figura 3.- Detalle de la anterior. Ob. 45X.

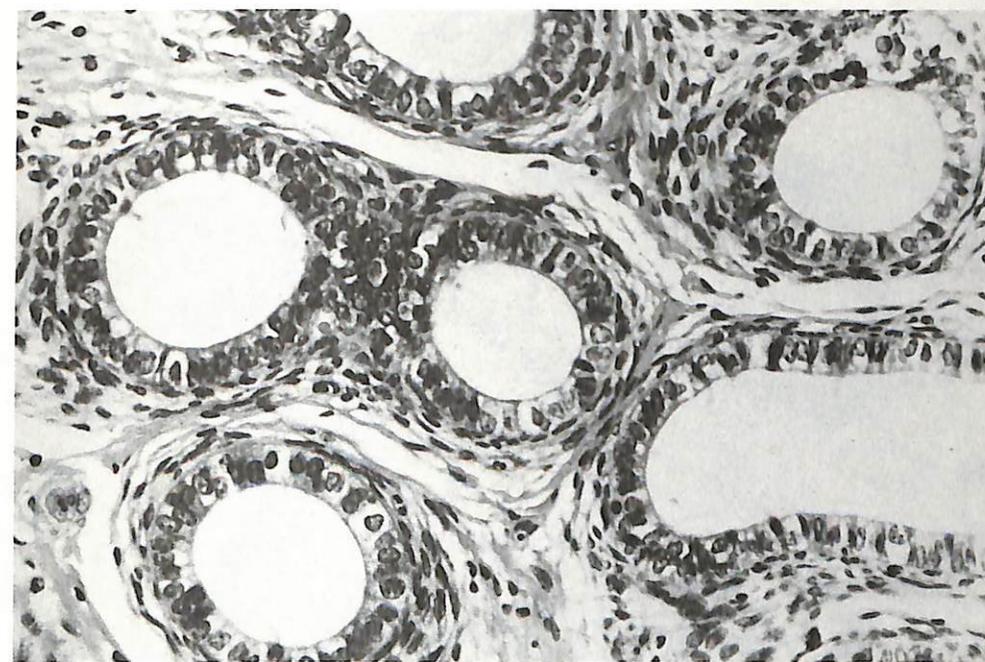


Figura 4.- Epitelio cilíndrico sin estereocilios. Grupo II (DES). Segmento distal. Ob. 25X.

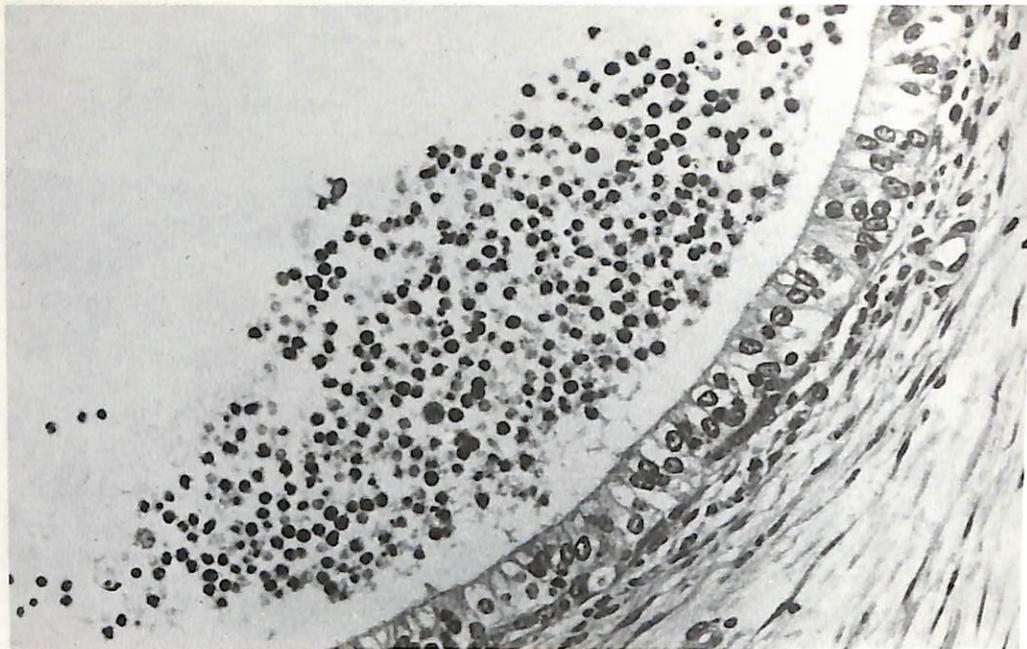


Figura 5.- Polimorfonucleares en la luz del conducto. Grupo II (DES). Segmento distal. Ob. 45X.

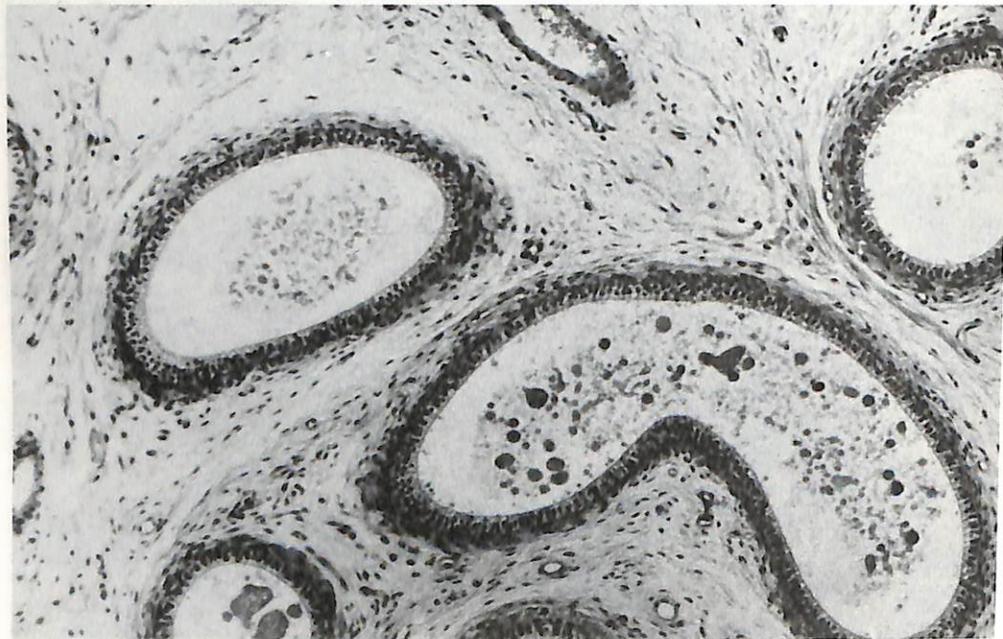


Figura 6.- Secreción en la luz del conducto. Grupo II (DES). Segmento distal. Ob. 10X.

estudio histológico los epidídimos fueron examinados en tres segmentos: proximal, medio y distal. Con el zeranol observamos un menor diámetro del conducto, tapizado por un epitelio inmaduro sin estereocilios, sobre todo en los implantados. En el epitelio de los corderos tratados con DES, comprobamos vacuolización de las células principales, proliferación de las basales, así como la presencia de infiltrados leucocitarios que se acumulaban en la luz. Estos hallazgos fueron más señalados en el segmento distal. A este nivel, el DES inducía dilatación tubular y macroquistes, revestidos por un epitelio aplanado sin estereocilios. En el estroma, existía hiperplasia fibromuscular, más marcada en el segmento distal así como infiltrados de células mononucleadas, focales o difusos.

INTRODUCCION

Los andrógenos son necesarios para mantener la estructura y la función del epidídimo¹⁷, sin embargo, se ha comprobado que también los estrógenos, concretamente el estradiol, a dosis fisiológicas, tiene un efecto estimulador directo sobre la actividad secretora de este órgano, en ratas^{9,18} y en conejos prepuberales²⁰.

Por el contrario, una administración prolongada de dietilestilbestrol (DES), parece inhibir la producción "in situ" de andrógenos 5α -reducidos, a partir de precursores testiculares (testosterona y androstendiona), en el epidídimo humano²¹.

Es indudable que existe interés en conocer cómo actúan estas sustancias estrogénicas a nivel del epidídimo no sólo desde el punto de vista fisiológico, sino también estructural, objetivo este último de trabajos realizados en distintas especies: ratón¹, rata¹⁵, conejo¹⁴, bovinos^{4,10}, ovinos²² y en el hombre^{21,23}.

Con nuestro trabajo, pretendemos comparar los efectos de dos tipos de estrógenos, el DES y el zeranol, sobre la morfología microscópica del epidídimo, cuando son administrados por diferentes vías a ovinos de raza Churra de 8 a 24 semanas de edad.

MATERIAL Y METODOS

Para nuestro trabajo hemos empleado 39 corderos de raza Churra, de 4 semanas de edad. Hemos utilizado el DES (C18H20O2; P.M. = 268'34) y el zeranol (C18H26O5; P.M. = 322'41), suministrados por la casa SIGMA.

Se establecieron 4 grupos: El grupo I de 12 animales, de los cuales 6 recibieron zeranol y 6 DES, en ambos casos por vía oral, a dosis de 5 mg. de producto puro, incluido en cápsulas de gelatina; el grupo II, constituido por 12 animales, de los cuales 6 recibieron zeranol y 6 DES, por vía intramuscular, administrando ambos productos a la misma dosis de 5 mg. en vehículo oleoso (4 ml. de oleato de etilo); el grupo III, de 6 animales, 3 tratados con zeranol y 3 con DES, mediante implante subcutáneo, aplicado en la base de la oreja. Los "pellets" contenían el producto puro (DES o zeranol, 12 mg.), lactosa (6 mg.), talco (0'6 mg.), carboximetilcelulosa (0'3 mg.) y estearato de magnesio (0'3 mg.). El grupo IV estuvo constituido por 8 animales que fueron utilizados como controles.

En las dos primeras vías, las dosis se suministraron a intervalos semanales y para el implante cada 42 días. El sacrificio se efectuó a las 4, 8, 10, 12, 16 y 20 dosis de 5 mg. y cuando habían recibido 1, 2 ó 3 implantes.

El sacrificio era seguido de una necropsia reglada. Los epidídimos, una vez separados del correspondiente testículo, fueron fijados en Bouin alcohólico. Tras su inclusión en

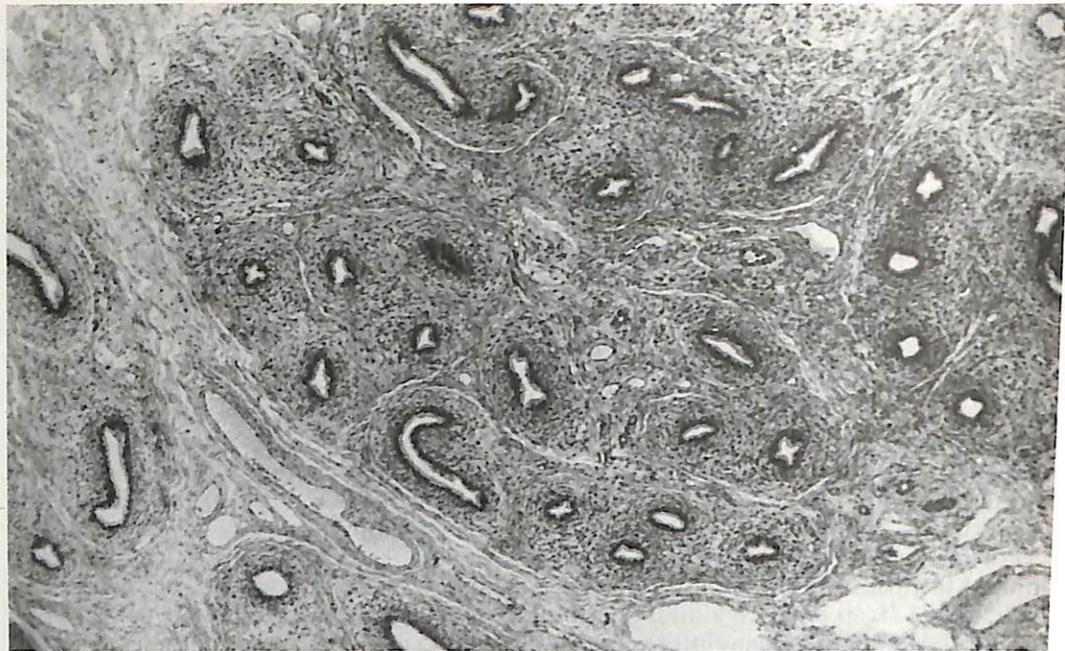


Figura 7.- Escaso desarrollo del conducto. Grupo III (zeranol). Segmento distal. Ob. 4X.

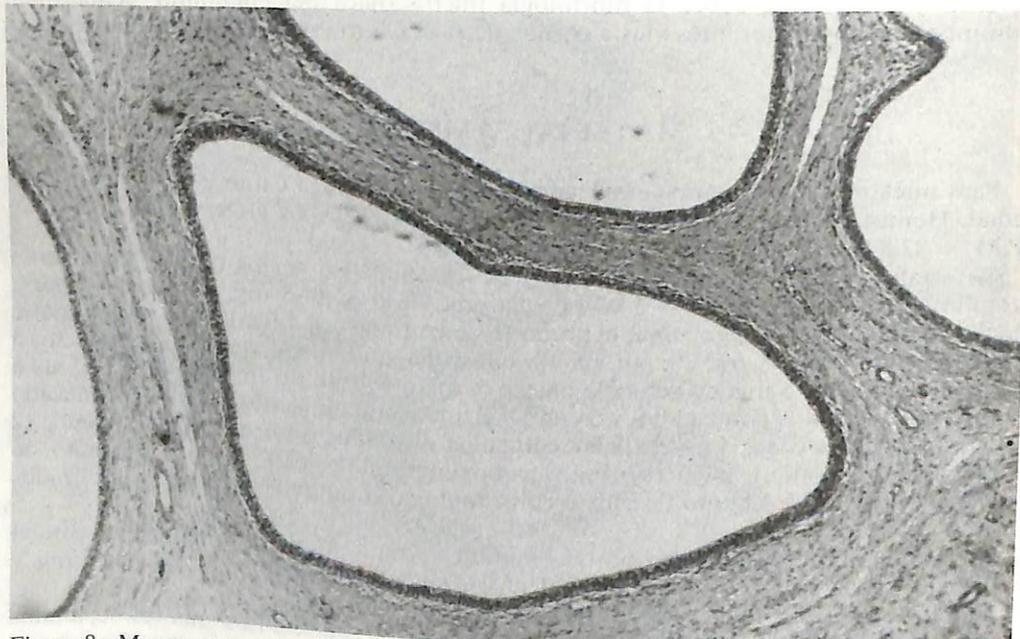


Figura 8.- Macroquistes. Grupo III (DES). Segmento distal. Ob. 4X.

parafina, se obtuvieron cortes seriados de 4 micrómetros de grosor, que fueron teñidos con H.-E. y con los tricrómicos de Masson-Goldner y Van Gieson.

El estudio microscópico se realizó en tres segmentos: proximal, medio y distal. Se determinaron igualmente el diámetro del conducto epididimario, la altura de su epitelio, así como el grosor de la capa muscular, con la ayuda de un micrómetro ocular. Para ello, se eligieron al azar 10 secciones transversales por cada epidídimo (derecho e izquierdo) en cada uno de los tres segmentos señalados, considerando como tales aquellas en las que la diferencia máxima entre los diámetros no excedía más de un 10% de su valor medio.

RESULTADOS

Los tratados con DES y zeranol del grupo I, presentaron un conducto epididimario de menor diámetro a partir de 12 dosis, en los segmentos proximal y medio. En el segmento distal el conducto fue menor con 16 y 20 dosis de zeranol y en todos los que recibieron DES. Esta disminución en el diámetro ductal coincidía con un epitelio menos desarrollado, sobre todo en los segmentos medio y distal (Gráfica I).

Las células principales de este último segmento, carecían de estereocilios en los que recibieron 4, 8 y 10 dosis de DES. Con mayor número de dosis, estas células y también las basales mostraban degeneración vacuolar en todos los segmentos (Fig. 1) siendo frecuente, si bien discreta, la descamación celular que se acompañó en uno de los animales tratados, con la presencia de líquido en la luz del conducto.

Utilizando la dosis máxima de zeranol, observamos una proliferación intraepitelial de aspecto pseudoglandular, preferentemente en el segmento medio. Dentro del epitelio aparecían estructuras a modo de alveolos (Fig. 2 y 3).

En el intersticio, la capa muscular incrementó su grosor en el segmento distal con el DES y en el tratado con 20 dosis de zeranol (Gráfica I). Hay que destacar además, la existencia de escasos infiltrados de células mononucleadas con el DES.

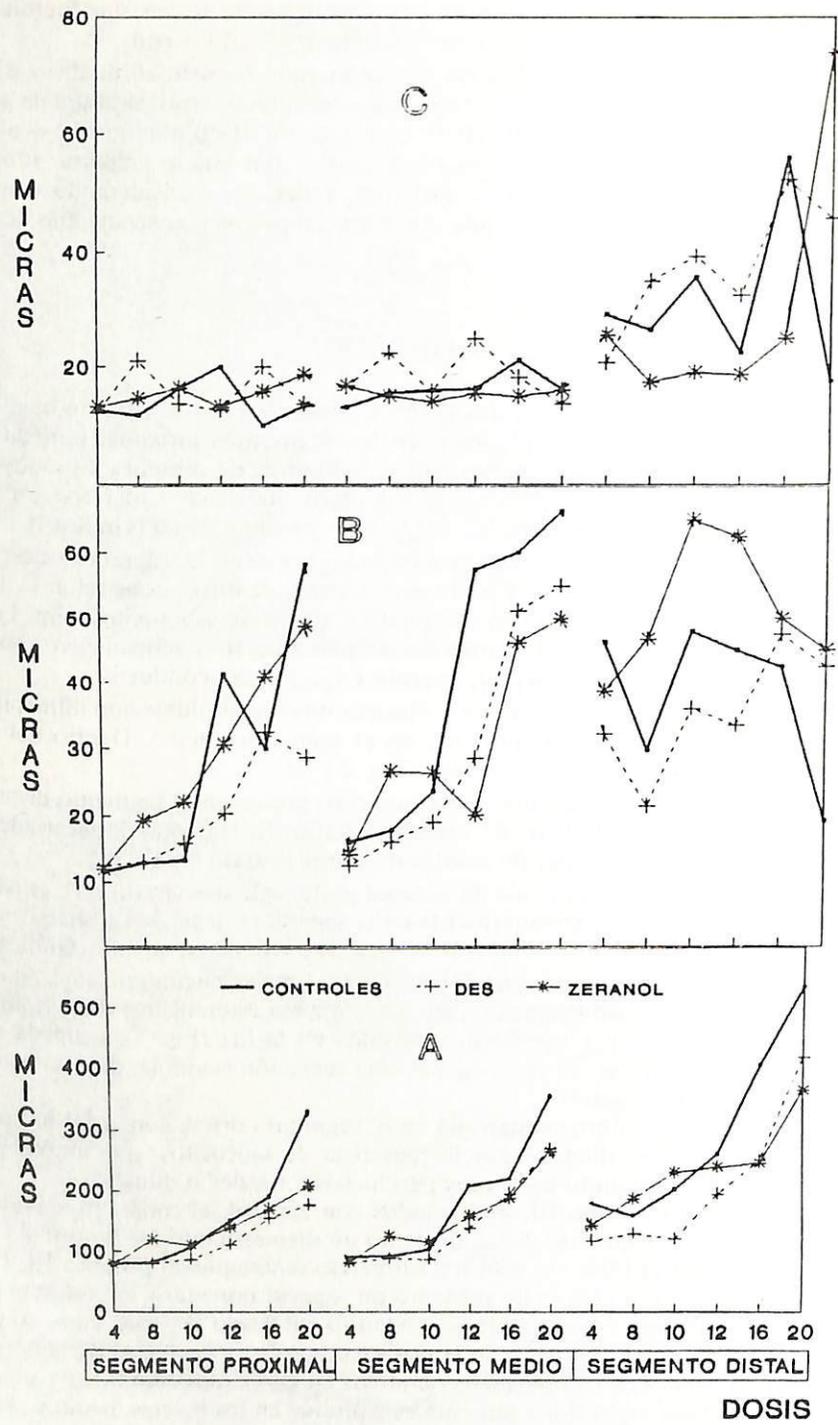
En los tratados con 16 y 20 dosis de zeranol pertenecientes al grupo II, el conducto presentó menor diámetro, particularmente en el segmento distal; sin embargo, ya con 8 y 10 dosis de DES se encontró dilatado, formando verdaderos quistes (Gráfica II).

En todos los animales tratados con DES, el epidídimo se encontraba tapizado por un epitelio cilíndrico bajo, con signos de degeneración, sin estereocilios (Fig. 4), infiltrado de polimorfonucleares, que formaban acúmulos en la luz (Fig. 5), ocupada en ocasiones además, por células epiteliales y por una secreción acidófila, dispuesta en gotas de diferentes tamaños (Fig. 6).

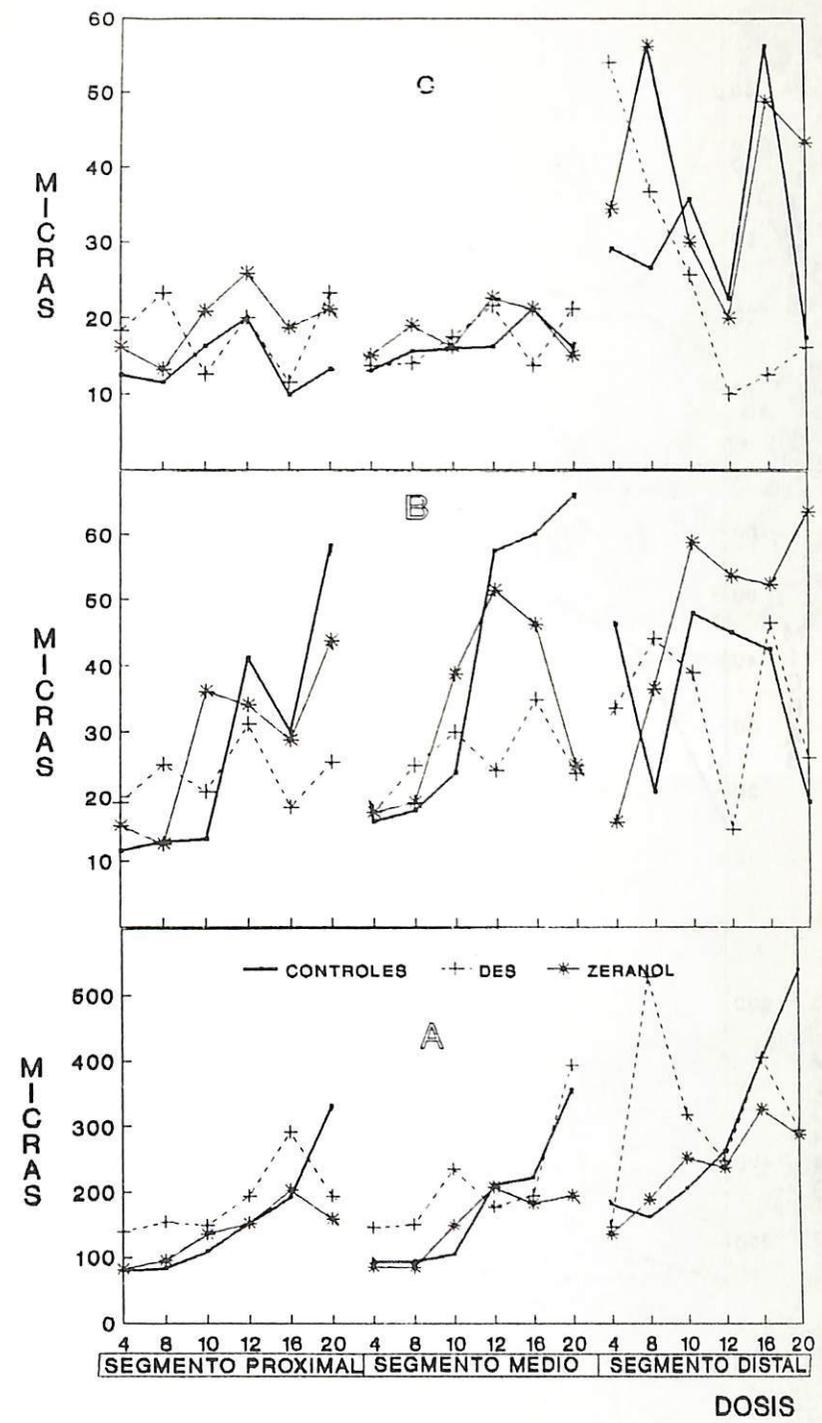
En el estroma existía fibrosis marcada en el segmento distal, con el DES. La luz de pequeñas venas, estaba dilatada por la presencia de leucocitos, que atravesaban su pared y emigraban formando acúmulos periductales, focales o difusos.

En los corderos del grupo III, implantados con zeranol, el conducto epididimario, principalmente en el segmento distal, presentó un diámetro inferior al normal (Fig. 7); por el contrario con el DES era ectásico formando macroquistes (Gráfica III, Fig. 8).

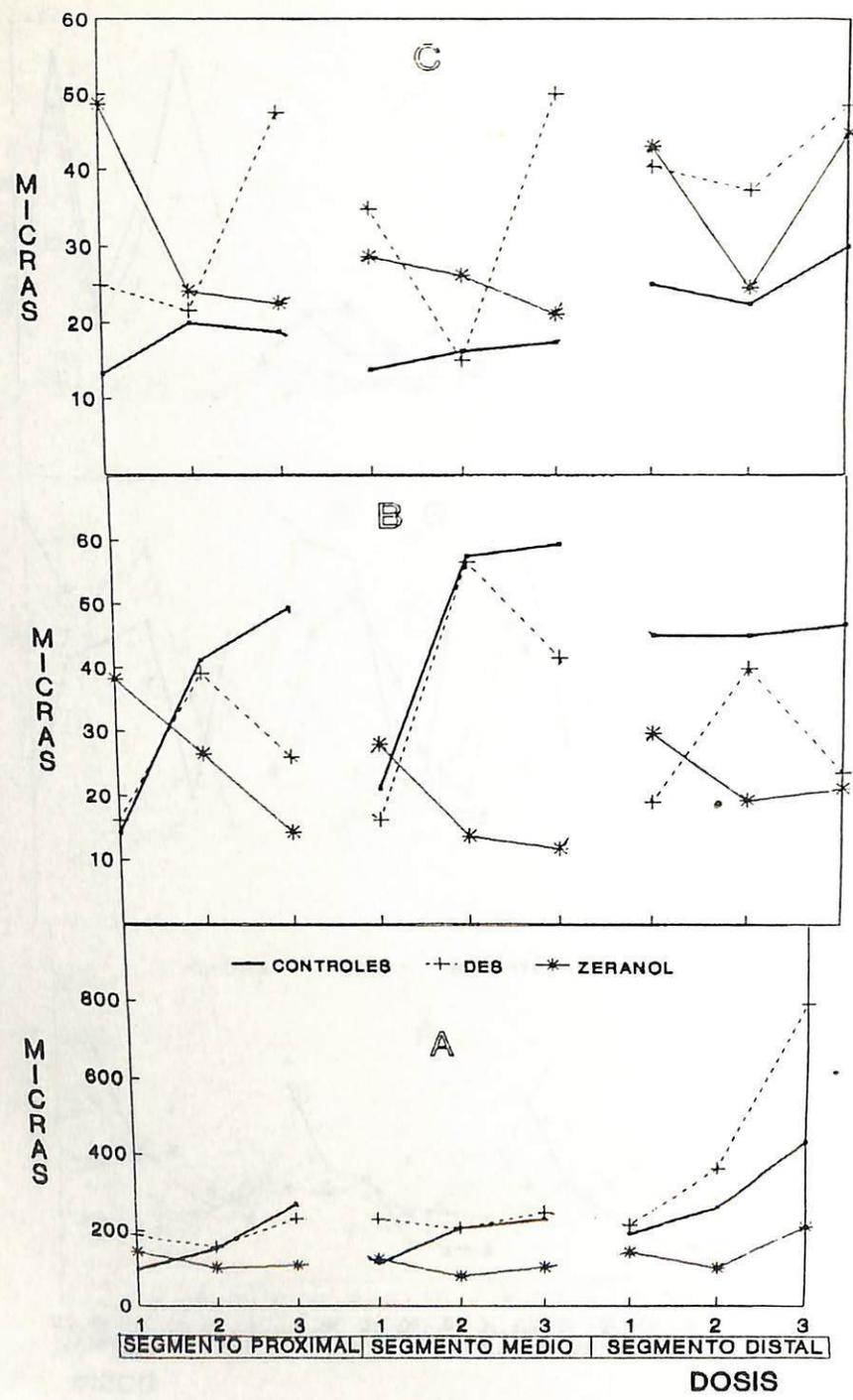
Si bien con el zeranol el epitelio presentó un aspecto inmaduro, sin estereocilios en sus células principales, y solamente se encontró infiltrado de leucocitos con 3 implantes, con el DES, y en función de la dosis, comprobamos además de la pérdida de diferenciaciones apicales, cambios degenerativos en las células cilíndricas y una hiperplasia de células basales, preferentemente esta última, en los niveles medio y proximal. Como consecuencia de esta estratificación y proliferación celular, la luz del conducto aparecía de forma estrellada (Fig. 9).



Gráfica I: Vía oral. Diámetro tubular (A). Altura del epitelio (B). Grosor capa muscular (C).



Gráfica II: Vía intramuscular. Diámetro tubular (A). Altura epitelio (B). Grosor muscular (C).



Gráfica III: Implante. Diámetro tubular (A). Altura epitelio (B). Grosor capa muscular (C).

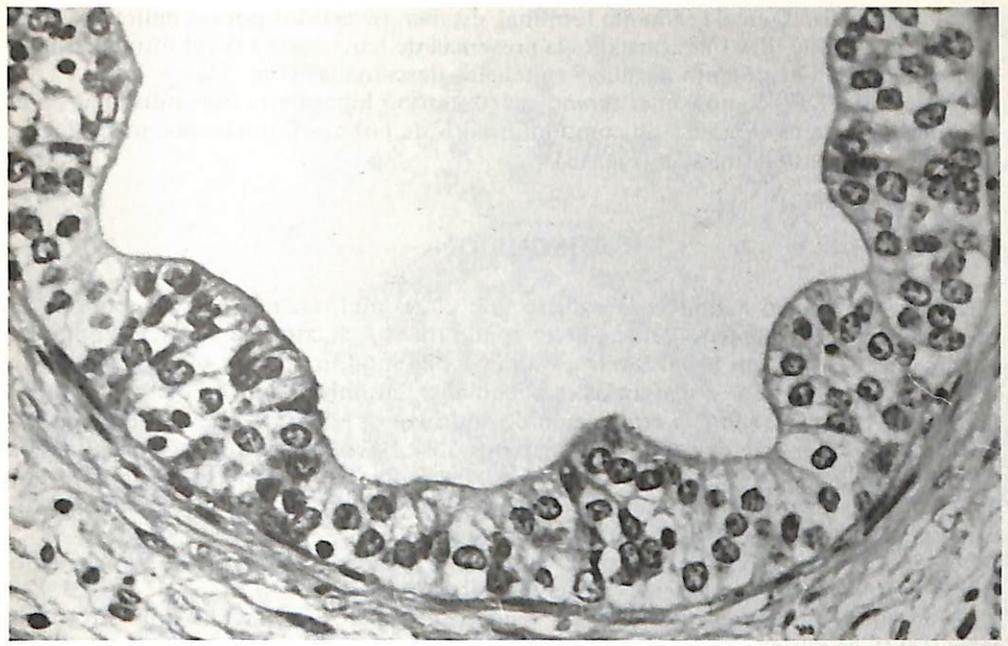


Figura 9.- Proliferación de células basales. Grupo III (DES). Segmento medio. Ob. 45X.

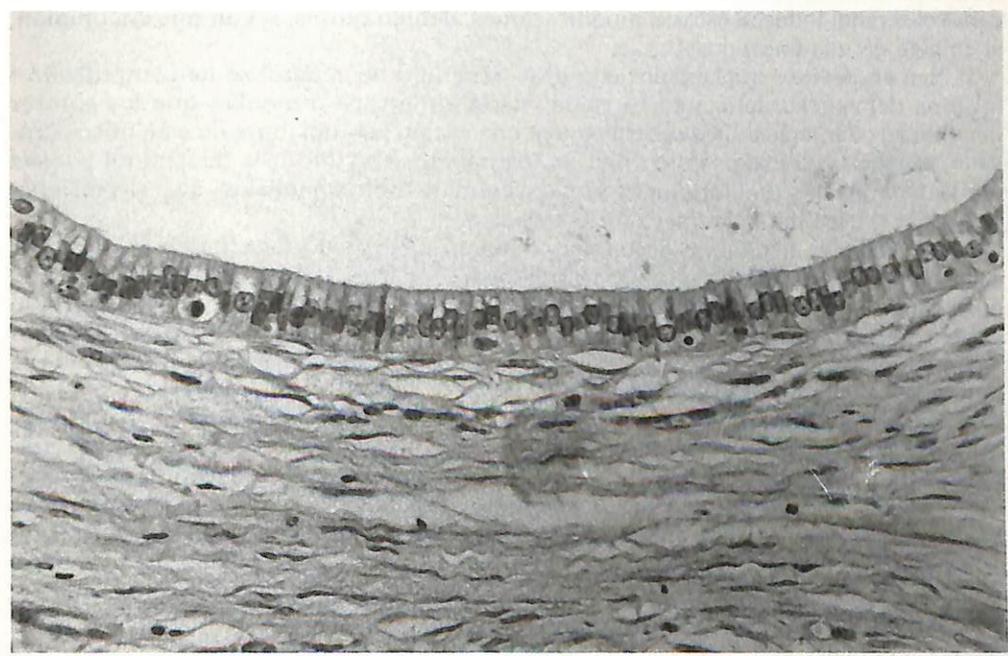


Figura 10.- Epitelio de los macroquistes. Grupo III (DES). Segmento distal. Ob. 25X.

Los macroquistes, en el segmento terminal, estaban revestidos por un epitelio simple cilíndrico bajo (Fig. 10). Fue constante la presencia de leucocitos a nivel intraepitelial y en la luz del conducto junto a células epiteliales descamadas (Fig. 11).

Tanto con el DES como con el zeranol se comprobó hiperplasia fibromuscular en el estroma, con edema (Fig. 12), así como infiltrados de polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Fig. 13).

DISCUSION

En nuestro estudio hemos comprobado que el zeranol, en relación directa con la dosis, disminuye el diámetro del conducto epididimario, así como la altura del epitelio. Igualmente, ocurrió con el DES por vía oral. Estas modificaciones observadas en la rata ¹⁵ y en el hombre ^{21,23}, pensamos se deben al efecto inhibitorio que ejercen tanto el DES como el zeranol sobre la producción de andrógenos ^{5,8}, tanto circulantes (necesarios para mantener este epitelio en el segmento distal), como luminales (relacionados con esta función en el segmento proximal), según se ha demostrado en bovinos ⁶. Por otra parte, los estrógenos actúan además sobre el metabolismo androgénico, inhibiendo la actividad 5 α -reductasa en este órgano ²¹.

Los quistes observados por nosotros con el DES en los grupos II y III han sido descritos en hamsters ⁷, ratones ¹ y en el hombre ¹¹.

La ausencia de estereocilios en las células principales, señalada por otros autores ^{15,21,23}, se iniciaba en nuestras experiencias siempre en el segmento distal, avanzando posteriormente al medio y proximal.

Los cambios regresivos y proliferativos del epitelio que hemos comprobado con el DES, han sido señalados en ratas ¹⁵ y en conejos sexualmente inmaduros ¹⁴, respectivamente con el estradiol. Por el contrario en corderos se ha indicado ²², que tanto el DES como el zeranol inducen escasas modificaciones, debido quizás, según nuestra opinión, al empleo de una única dosis.

Si bien en bovinos implantados con dosis repetidas de zeranol se ha comprobado ⁴ invasión del epitelio del conducto epididimario en la capa muscular, que los autores denominan adenomiosis, y que atribuyen a una acción estimuladora de este micoestrógeno, en nuestro trabajo sólo en uno de los tratados con 20 dosis de zeranol por vía oral, comprobamos proliferaciones pseudoglandulares intraepiteliales, que sí presionaban sobre la capa muscular, pero no la invadían.

La presencia de líquido en la luz del conducto no ha sido descrita en los trabajos consultados, aunque sí la existencia de restos celulares ²². Este líquido que puede proceder de vías espermáticas intratesticulares, probablemente no puede ser absorbido por un epitelio modificado y carente de estereocilios, aún cuando los estrógenos, según se ha demostrado en células vaginales durante el estro, parecen actuar favoreciendo la fluidez de la membrana celular ¹⁶.

La hiperplasia fibromuscular observada por nosotros, preferentemente en el segmento distal, con ambas sustancias estrogénicas, ha sido descrita en otros trabajos ^{10,14,15,23} y parece debida a una estimulación directa de los receptores estrogénicos, presentes en el epidídimo de diferentes especies ^{12,19,24}. Por otra parte, este efecto era más evidente en animales sexualmente inmaduros, donde la concentración de estos receptores, máxima en el segmento distal, llega a descender hasta 10 veces en el epidídimo adulto ¹⁹, donde parece existir además una mayor actividad proteolítica ².

En el estroma del epidídimo en bovinos tratados con zeranol, se han descrito pequeños infiltrados de linfocitos ⁴, no así en el resto de trabajos consultados; por el contrario, en nuestro estudio, los acúmulos de leucocitos han sido un hallazgo cons-

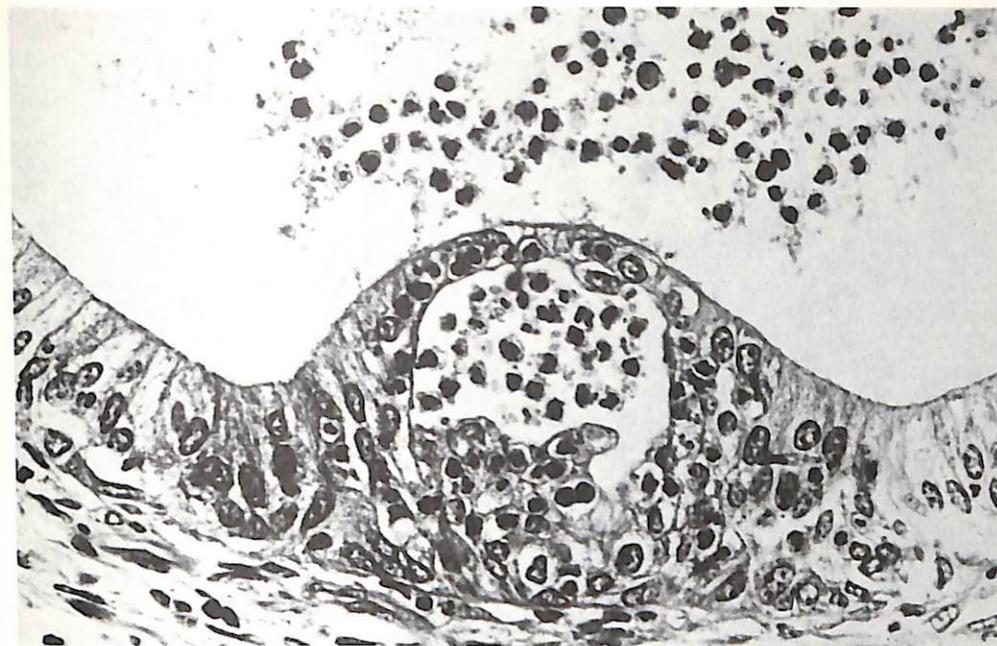


Figura 11.- Leucocitos intraepiteliales y en la luz. Grupo III (DES). Segmento medio. Ob. 45X.

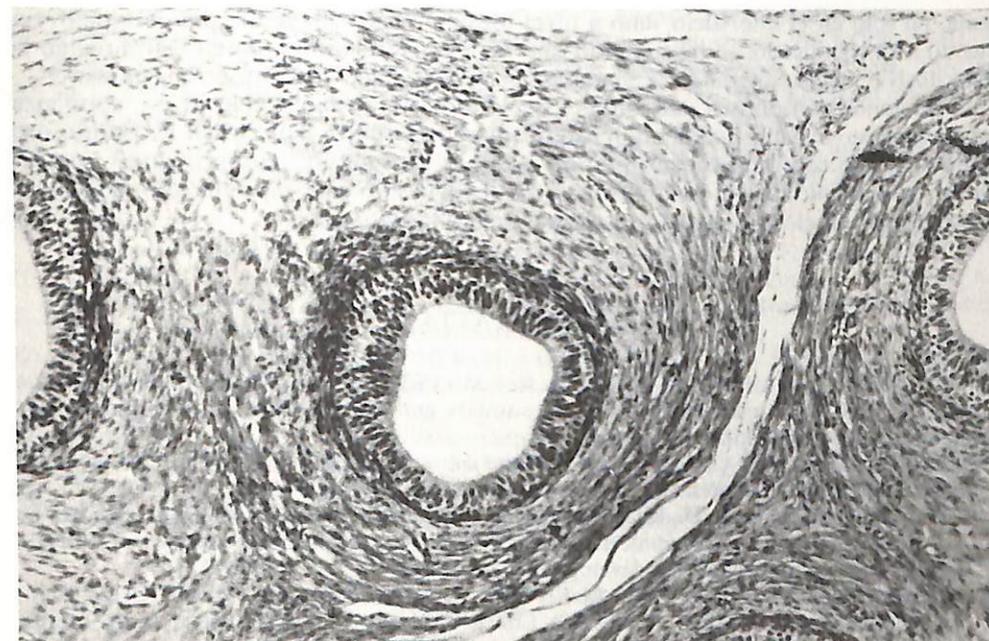


Figura 12.- Hiperplasia fibromuscular. Grupo III (zeranol). Segmento distal. Ob. 10X.

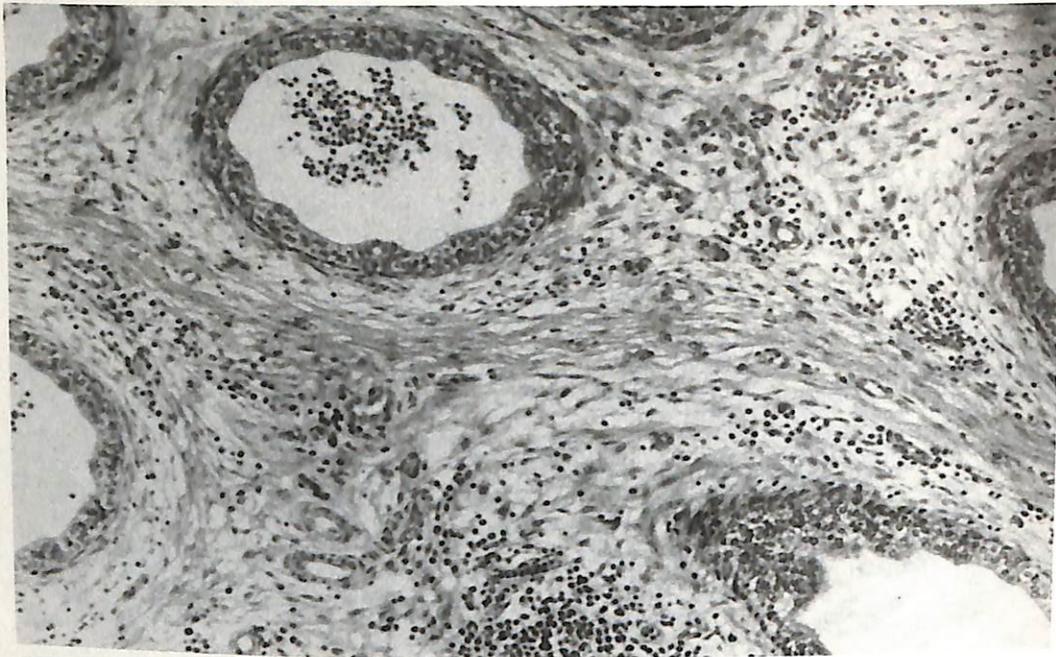


Figura 13.- Infiltrados difusos en el estroma. Grupo III (DES). Segmento medio. Ob. 10X.

tante, no sólo en el intersticio, sino a nivel intraepitelial y en la luz del conducto. En cuanto a su significado, se ha sugerido que los estrógenos intervienen estimulando la fagocitosis e incluso alterando la maduración de estos fagocitos mononucleares³.

La diferenciación normal del conducto epididimario en la especie ovina, comienza en el segmento distal, ascendiendo posteriormente al medio y proximal¹³. En nuestro estudio hemos confirmado este modelo regional ascendente, comprobando que las alteraciones se iniciaban y eran máximas, en el segmento más diferenciado, observándose después en el nivel medio y proximal del conducto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DALTERIO, S., BARTKE, A., STEGER, R. y MAYFIELD, D. (1985). Neonatal exposure to DES in BALB/c male mice: effects on pituitary gonadal function. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22 (6), 1.019-1.024.
- 2) DANZO, B. J. (1986). A protease acting on the estrogen receptor may modify its action in the adult rabbit epididymis. *J. steroid Biochem.* 25 (4), 511-519.
- 3) DEAN, J. H., LAUER, L. D., MURRAY, M. J., LUSTER, D., NEPTUN, D. y ADAMS, D. O. (1986). Functions of mononuclear phagocytes in mice exposed to diethylstilbestrol: a model of aberrant macrophage development. *Cell Immunol.*, 102, 315-322.
- 4) DESCHAMPS, J. C., OTT, R. S., McENTEE, K., HEATH, E. H., HEINRICH, R. R., SCHANKS, R. D. y HIXON, J. E. (1987). Effects of zeranol on reproduction in beef bulls: scrotal circumference, serving ability, semen characteristics, and pathologic changes of the reproductive organs. *Am. J. Vet. Res.* 48 (1), 137-147.

- 5) FABRY, J., RENAUVILLE, R. y BURNY, A. (1984). Influence of anabolic treatment on luteinizing hormone and testosterone secretion in bulls. *Anim. Prod.*, 39 (3), 345-354.
- 6) GOYAL, H. O. (1983). Histoquantitative effects of orchietomy with and without testosterone enanthate treatment on the bovine epididymis. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 1.085-1.090.
- 7) GRAY, L. E., FERREL, J. M. y OSTBY, J. S. (1985). Alteration of behavioral sex differentiation by exposure to estrogenic compounds during a critical neonatal period: effects of zearalenone, methoxychlor, and estradiol in hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 80 (1), 127-136.
- 8) JUNIEWICZ, P. E., WELSH, T. H. y JOHNSON, B. H. (1985). Effects of zeranol upon bovine testicular function. *Theriogenology*, 23 (4), 565-582.
- 9) KAMAL, N., AGARWAL, A. K., JEHAN, Q. y SETTY, B. S. (1985). Biological action of estrogen on the epididymis of prepubertal Rhesus Monkey. *Andrologia*, 17 (4), 339-345.
- 10) KROES, R., BERKVEN, M. M., LOENDERSLOOT, H. J. y RUITENBERG, E. J. (1971). Modifications du tractus génital consécutives à l'administration d'oestrogènes chez le veau mâle. *Zentbl. VetMed. A*, 18, 717-730.
- 11) LEARY, F. J., RESSEGUIE, L. J., KURLAND, L. T., O'BRIEN, P. C., EMSLANDER, R. F. y MOLLER, K. L. (1984). Males exposed in utero to diethylstilbestrol. *J. Am. med. Ass.*, 252 (21), 2.984-2.990.
- 12) MURPHY, J. B., EMMOTT, R. C., HICKS, L. L. y WALSH, P. C. (1980). Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis, and genital skin: a marker for estrogen-responsive tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50, 938-948.
- 13) NILNOPHAKOON, N. (1978). Histological studies on the regional postnatal differentiation of the epididymis in the ram. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.*, 7, 253-272.
- 14) ORGBIN-CRIST, M. C., ELLER, B. C. y DANZO, B. J. (1983). The effects of estradiol, tamoxifen, and testosterone on the weights and histology of the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits. *Endocrinology*, 113 (5), 1.703-1.715.
- 15) RAO, M. V. y CHINYOY, N. J. (1984). Structural changes in reproductive organs of male rats after estradiol benzoate treatment. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 84 (2), 211-217.
- 16) REDDY, A. G., SHIVAJI, S. y GUPTA, P. D. (1989). Effect of estradiol on the membrane fluidity of the rat vaginal epithelial cells. *J. steroid. Biochem.*, 33 (6), 1.229-1.233.
- 17) SETCHELL, B. P. (1977). Male reproductive organs and semen. En COLE, H. H. y CUPPS, P. T.: *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, New York, 229-254.
- 18) SETTY, B. S., JEHAN, Q., SRIVASTAVA, A. y KAMAL, N. (1986). Biological response of the rat epididymis to estrogen. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 87 (3), 229-238.
- 19) TONEY, T. W. y DANZO, B. J. (1988). Developmental changes in and hormonal regulation of estrogen and androgen receptors present in the rabbit epididymis. *Biol. Reprod.*, 39, 818-828.
- 20) TONEY, T. W. y DANZO, B. J. (1989). Estrogen and androgen regulation of protein synthesis by the immature rabbit epididymis. *Endocrinology*, 125 (1), 231-242.
- 21) VAZQUEZ, M. H., LARMINAT, M. A. DE, GURPIDE, E., SCORTICATI, C. y BLAQUIER, J. A. (1986). Androgen metabolism in the human epididymis. Effects of in vivo estrogen administration. *J. steroid. Biochem.* 25 (2), 239-244.
- 22) WIGGINS, J. P., ROTHENBACHER, H. y WILSON, L. L. (1980). Histologic evaluation of the effects of diethylstilbestrol and zeranol on certain lamb tissues. *Am. J. Vet. Res.*, 41 (4), 487-492.
- 23) WOLF, M. (1986). Licht- und elektronenmikroskopische untersuchungen am menschlichen nebenhoden nach östrogen- und antiandrogentherapie. *Andrologia*, 18 (3), 280-291.
- 24) YOUNES, M., EVANS, B. A. J., CHAISIRI, N., VALOTAIRE, Y. y PIERREPOINT, C. G. (1979). Steroid receptors in the canine epididymis. *J. Reprod. Fert.*, 56, 45-52.