

**6.- DISCUSIÓN**

## **6.1. EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS CONTÍNUOS EN EL DESARROLLO PONDOESTATURAL DEL EMBRIÓN DE POLLO**

Uno de los principales problemas que genera la aplicación de los campos electromagnéticos continuos (CEMc), es el de mantener las condiciones de incubación de los embriones dentro de los límites de normalidad. Estudios realizados por distintos autores (Rondoni 1948, Deuchar 1952, Mookerjee 1953, Harrison y Klein 1954, Root 1957, Ancel 1958), ya demostraron que variaciones en la temperatura de incubación de los huevos provocaban alteraciones en el desarrollo de los embriones. Por este motivo, tanto la temperatura de incubación como el grado de humedad y el volteo de los huevos, han sido rigurosamente controlados durante todo el periodo en que los huevos permanecen en el interior de la incubadora bajo la acción del CEMc generado. De este modo los resultados que aportamos, sólo pueden ser razonablemente atribuidos a las diferentes intensidades de campo aplicado.

Autores como Lauber y Shutze (1964), Isakson, Huffman y Spiegel (1970) o Delgado y cols. (1981) y Delgado y cols. (1982), han detectado la aparición de malformaciones en los embriones desarrollados bajo la acción de campos magnéticos, sin embargo, la reproducción de sus experimentos en otros laboratorios, no da lugar a los mismos resultados (Maffeo, Miller y Carstensen 1984). Estas diferencias podrían ser debidas a discordancias en la metodología utilizada o a la falta de control de alguna de las condiciones de incubación.

Piera y cols. en 1992 publicaron los resultados sobre el estudio de la influencia de los CEMc sobre el estadio, peso y talla de los embriones de pollo en desarrollo. Utilizan intensidades de 18,1 y 36,1 mT; los embriones se sometieron a la acción de una u otra intensidad, desde el principio de la incubación hasta los 5, 10 y 15 días. Se demostró que los embriones de 10 y 15 días que habían sido sometidos a CEMc de 18,1 mT presentaban

estadios de desarrollo superiores a los controles y a expuestos a intensidades de 36,1 mT. Estos resultados eran parecidos a los presentados por Duriez y Basset (1980) utilizando intensidades de campo similares (100 y 500 Gs/cm<sup>2</sup>).

Jové y cols. (1999<sup>b</sup>), describen un efecto acumulativo de los CEMc al observar un efecto más pronunciado a los 10 y 15 días de exposición que a los 5 días. La diferencia de pesos observada a los 15 días coincide con Piera y cols. (1992), que describen una aceleración del desarrollo más manifiesta a la intensidad de 18,1 mT que a la de 36,1 mT. Los autores postularon la existencia de un “efecto ventana” por el hecho de que los efectos detectados sobre el desarrollo fuese más manifiesto a la intensidad de 18,1 mT que a la de 36,1 mT. Esta hipótesis ya había sido formulada con anterioridad por autores como Mulay y Mulay (1964), Adey (1980), Ubeda y cols. (1983), Blackman y cols. (1985).

El hecho de que en los trabajos realizados sólo se hubieran empleado dos intensidades de CEM nos parece insuficiente para confirmar o refutar dicha hipótesis. Con la finalidad de intentar esclarecer la existencia de dicho efecto, en el presente trabajo se utiliza una gama más amplia de intensidades de CEMc, situándolas por encima y por debajo de las utilizadas hasta el momento por nuestro grupo de investigación.

En lo que respecta al estadio, no hemos hallado ninguna diferencia entre los embriones expuestos y los controles (ni por edad, ni por intensidad de campo aplicado).

Los mecanismos fundamentales del desarrollo de los seres vivos, son dos: la diferenciación y el crecimiento. Las variaciones en los procesos de maduración y diferenciación (aceleración o enlentecimiento) se traducen en una variación en el estadio de desarrollo; no hallar diferencias entre los embriones expuestos y los controles en este parámetro, parece indicar

que no existe un efecto demostrable de la acción de los CEMc sobre los procesos de diferenciación.

En el estudio del peso y de la talla hemos apreciado que a los 10 días, ambos parámetros son ligeramente superiores en los embriones expuestos que en los controles, a todas las intensidades utilizadas salvo para el grupo de 31,1 mT (estadísticamente significativo). En los embriones de 15 días observamos que sólo los embriones expuestos a las intensidades más bajas, presentan peso y talla superior al de los controles. A los 21 días todos los embriones expuestos presentan (sea cual sea la intensidad aplicada) un peso inferior al de los controles, que resulta estadísticamente significativo para los embriones del grupo expuesto a 31,1 mT (como a los 10 días). Los resultados de la talla, a esta edad, presentan una gran variabilidad y ninguna significación estadística.

Estos resultados no parecen aportar ninguna luz sobre la existencia del efecto ventana, sin embargo, lo que sí parece ponerse de manifiesto es el efecto acumulativo de los CEMc, que coincide con los resultados obtenidos por Jové y cols. (1999<sup>b</sup>), ya que el peso de los expuestos disminuye a medida que aumenta la intensidad y el tiempo de exposición.

Si nos fijamos en los procesos de crecimiento, que pueden traducir el peso y la talla de los embriones, las diferencias halladas entre expuestos y controles parecen seguir una pauta que relaciona la intensidad del campo aplicado y el tiempo de exposición. Las intensidades más altas producen una disminución del peso y de la talla de los embriones, sin embargo, este hecho no va acompañado de un retraso del momento de eclosión.

## **6.2. EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS CONTÍNUOS EN LAS DIMENSIONES DE LA GLÁNDULA PINEAL: distancias y diámetros**

El interés del estudio de estos parámetros es el de permitirnos conocer de que modo crece la glándula pineal. Del estudio de las distancias establecidas podremos deducir como cambia la forma de la glándula a lo largo de su desarrollo. Del estudio de los diámetros, y de los segmentos que en ellos se delimitan, podremos conocer el modo en que se realiza el desarrollo de la glándula, es decir las variaciones de grosor de sus paredes y del espacio (luz glandular) que delimitan.

Autores como Campbell y Gibson (1970), Akasaka y cols. (1995) y Jové y cols, (1999<sup>a</sup>), han comprobado y descrito que la glándula sufre modificaciones en su forma a lo largo del desarrollo y que estos cambios van acompañados de variaciones de grosor de sus paredes. En efecto, según los dichos autores, las paredes de la glándula no crecen de forma uniforme y relacionan dicha desigualdad con sus distintos estados madurativos. Así, aceptan que la pineal evoluciona fundamentalmente a expensas de su porción apical y de su pared anterior. Calvo y Boya (1978) consideran que la pineal adulta se desarrolla a expensas de su pared anterior mientras que la posterior, corresponde a una pequeña porción del parénquima adulto

Para establecer las dimensiones y determinar, tanto las distancias como los diámetros de la glándula pineal, se han tenido en cuenta los cambios de situación, de orientación y de forma que sufre la epífisis a lo largo del desarrollo del embrión.

A los 10 días, la glándula ocupa una situación dorsal, con un eje mayor horizontal, de forma que la pared anterior contacta prácticamente con el techo del diencéfalo. Según algunos autores, es en este momento cuando se inicia la actividad funcional de la glándula (Akasaka y cols., 1995).

A los 15 días la situación es más dorsal y su orientación es vertical debido al crecimiento de las estructuras vecinas (hemisferios cerebrales y cerebelo). La forma es más o menos triangular en su extremo distal y ovalada en el proximal. Es el momento de su máxima actividad que decrecerá hasta la eclosión del pollo (Campbell y Gibson, 1970; Akasaka y cols., 1995).

A los 21 días, al igual que describen Calvo y Boya (1978), apreciamos que su orientación es completamente vertical y de forma triangular con los vértices inferiores entre los hemisferios cerebrales y el cerebelo.

Por lo anteriormente expuesto, resulta evidente que los puntos de referencia que se utilicen para determinar las dimensiones de la glándula deben ser específicos, fijos y constantes para cada una de las edades (Jové y cols., 1999<sup>a</sup>), no siendo posible uniformizarlos. Es por ello que el estudio de la variación de los parámetros mencionados se realiza a cada una de las edades (10, 15 y 21 días). Por este mismo motivo, las comparaciones se realizan entre los diferentes grupos de embriones expuestos y los controles de una misma edad.

Como ya hemos mencionado, el estudio de las distancias (antero-posterior y craneocaudal de la glándula y de su luz), nos permitirá deducir la forma y el tamaño global de la glándula. Por ello la determinación de dichos parámetros ha sido realizada sobre líneas paralelas a unos ejes preestablecidos que enmarcan a la glándula y/o su luz, por lo que sus variaciones también traducen las diferencias de tamaño de ambas (Jové y cols., 1999<sup>a</sup>).

Para poder comprobar la falta de uniformidad en el desarrollo de las paredes de la glándula, se calculan, a partir de los diámetros establecidos los porcentajes de cada uno de los segmentos (Jové y cols., 1999<sup>b</sup>) lo cual nos dará información sobre las variaciones de grosor de las mismas.

Relacionando los valores obtenidos de las distancias, entre sí, en cada una de las etapas estudiadas (10, 15 y 21 días) podremos conocer la forma de la glándula en los controles y su variación a largo del desarrollo del embrión. Los datos obtenidos nos permiten, con posterioridad, comparar la forma que presentan los embriones de los distintos grupos expuestos con los controles y así valorar los efectos de los CEMc aplicados.

Por la relación DAP/DCC podremos conocer la morfología externa de la glándula. Así, a los 10 días la DAP de la epífisis es el doble que la DCC lo cual nos permite deducir que su forma es elongada. A los 15 días, la relación entre ambas distancias disminuye, sin embargo a los 21 días, dicha relación vuelve a aumentar y se iguala a la de los 10 días. Estas variaciones indican que en las etapas intermedias del desarrollo se produce un evidente cambio de forma que continua en las etapas posteriores hasta los momentos previos a la eclosión. Estos resultados confirman los presentados por Jové y cols. (1999<sup>b</sup>).

Por los resultados obtenidos del estudio de la relación entre las distancias de la glándula y su luz, podremos deducir la posición relativa de esta última con respecto a la porción más apical/posterior de la glándula. Entre los 10 y los 15 días, se produce un ligero aumento de las diferencias entre las distancias en ambos sentidos (anteroposterior y craneocaudal). El aumento de la diferencia entre las distancias anteroposteriores nos indica que el extremo más apical de la luz ha quedado retrasado con respecto al de la glándula. Algo similar ocurre con las diferencias entre las distancias craneocaudales, un aumento entre ellas, nos refleja un aumento de la distancia entre la porción más posterior de la luz glandular y la porción más posterior de la pineal (este última diferencia no es tan marcada como el que se detecta en la región apical). Estos cambios, en su conjunto, apuntan a un paulatino desplazamiento de la luz hacia la zona más posterior de la glándula.

A los 21 días estos cambios aún son más evidentes. El valor de la diferencia entre el extremo mas apical de la glándula y de la luz casi se ha triplicado con respecto a los 10 días. El valor de la diferencia entre las distancias craneocaudales tiene el mismo comportamiento.

El conjunto de las diferencias detectadas en los parámetros estudiados nos muestran una glándula pineal que aumenta progresivamente de tamaño, pero de forma desigual. Así, los cambios de tamaño que se detectan parecen indicar un aumento de las porciones mas anteriores de la glándula que a su vez provocan un desplazamiento posterior de su luz.

A los 10 días, el valor de la distancia anteroposterior de todos los embriones expuestos es superior al de los controles (la diferencia que existe entre el grupo de 26,1 mT y los controles es estadísticamente significativa). Por lo que respecta a la distancia craneocaudal todos los embriones expuestos presentan valores menores que los controles, con excepción de los grupos expuestos a 9,1 y 22,7 mT. Todos estos valores son estadísticamente significativos. Si analizamos la relación existente entre ambas medidas (DAP/DCC), observamos que en todos los casos es superior en los embriones expuestos que en los controles, es decir, que la distancia anteroposterior es algo mayor del doble que la distancia craneocaudal, pudiendo llegar a ser superior al triple en el caso de los expuestos a 26,1 mT. Si para analizar los resultados obtenidos con los grupos de embriones expuestos aplicamos el mismo razonamiento realizado con los grupos control, apreciamos que la glándula pineal de los embriones expuestos es más alargada que la de los controles, en cualquiera de las intensidades de CEMc aplicado. Por lo que respecta a la relación entre las distancias de la glándula y su luz (DAPL/DAP y DCCL/DCC), todos los valores obtenidos por los grupos de embriones expuestos son inferiores a los de los controles, lo cual parece implicar un pequeño desplazamiento posterior de la luz.



A los 15 días, la distancia anteroposterior, no presenta valores uniformes, mientras en unos grupos expuestos los valores son más altos que en los controles en otros grupos los valores son inferiores (13,6 mT y 22,7 mT) sin que ninguno de los resultados obtenidos sea estadísticamente significativo. Por lo que respecta a la distancia craneocaudal todos los valores de los embriones expuestos son superiores a los de los controles aunque, tampoco en este caso, los resultados sean estadísticamente significativos. Si observamos el cambio producido entre los 10 y los 15 días, vemos que los valores obtenidos en todos los grupos han aumentado y que los cifras más altas corresponden a los grupos de embriones expuestos. Si comparamos, entre ambos momentos del desarrollo, la relación existente entre las dos distancias (DAP/DCC) observamos que a los 15 días es menor en todos los grupos de embriones expuestos. Este hecho evidencia un cambio de forma en la pineal de los embriones expuestos de 15 días con respecto a la de 10 días, consistente en un ensanchamiento y acortamiento de la glándula como en los grupos controles. Por lo que respecta a la relación entre las dimensiones de la glándula y su luz, no se aprecian variaciones.

A los 21 días, el valor absoluto de la distancia anteroposterior craneocaudal sigue aumentando con respecto a los 10 y a los 15 días, sin embargo, el conjunto de embriones expuestos presentan valores inferiores a los de los controles con excepción del grupo expuesto a 9,1 mT que presenta valores superiores. La relación entre las dimensiones longitudinales y las verticales ha aumentado con respecto a los 15 días volviendo a alcanzar cifras semejantes a las de los 10 días; es decir las DAP vuelve a alcanzar valores superiores al doble de la DCC, salvo en el caso del grupo de expuestos a 9,1 mT. Este hecho se traduce en un nuevo cambio (menos evidente en el grupo de expuestos a 9,1 mT) en la forma de la glándula que se torna más voluminosa.

Si valoramos la relación existente entre las dimensiones de la glándula y su luz observamos un cambio con respecto a las etapas anteriores. Por lo que respecta a la relación DAPL/DAP, a los 21 días, es inferior a la de los controles en todos los grupos de exposición (resultado equivalente al de las etapas anteriores); sin embargo, la relación de las dimensiones verticales nos muestran valores superiores a los controles en todos los grupos de embriones expuestos. Esta última observación parece indicar que el cambio de morfología externa de la glándula, va acompañado de una variación en la disposición de su luz, en el sentido de haber sido desplazada por un aumento del grosor de las paredes que la delimitan.

Mientras la variación en las dimensiones de la glándula nos permiten conocer como ha cambiado la forma de la pineal a lo largo del desarrollo, del estudio de los diámetros y sobre todo de los segmentos que se establecen en cada una de ellos, podremos conocer el modo en que se realiza dicho desarrollo. Este punto es importante porque autores como Campbell y Gibson (1970) y Jové y cols. (1999<sup>a</sup>) han comprobado que las modificaciones de las paredes de la glándula pineal a lo largo de su desarrollo, no son uniformes. Esta desigualdad la relacionan con el estado madurativo/funcional de la glándula; así, se acepta que la pineal se desarrolla fundamentalmente a expensas de la porción apical y de su pared anterior.

Con las determinaciones realizadas obtenemos los datos necesarios para la evaluación del proceso de crecimiento de las distintas paredes de la glándula y de su luz. Del estudio del diámetro sagital y sus segmentos obtenemos información sobre el desarrollo anteroposterior de la glándula y de la proporción que ocupan su porción apical (SA), su luz (SL) y su porción posterior (SP); del diámetro vertical conoceremos la altura de la glándula y que ocupan en ella la pared anterior (VI), la luz (VL) y la pared posterior (VS).

Entre los grupos controles, los valores absolutos de los diámetros aumentan de forma similar a lo largo del desarrollo. Por lo que respecta a los segmentos de este último, observamos que a los a los 10 días el segmento anterior (porción apical) mantiene un amplio predominio sobre los otros dos; a los 15 días, los porcentajes entre los segmentos se iguala, en detrimento del segmento anterior, mientras que a los 21 días, el cambio que se aprecia nos indica un nuevo aumento de los segmentos anterior y posterior, a costa del de la luz. En el caso de los segmentos del diámetro vertical vemos, que la variación de las proporciones de sus segmentos con la edad, es más uniforme. Así, mientras los segmentos superior y de luz disminuyen progresivamente, el segmento inferior (pared anterior) aumenta, manteniéndose la relación entre los segmentos a cada una de las edades.

Estas apreciaciones concuerdan perfectamente con las realizadas al analizar los resultados de las dimensiones de la glándula y su relación entre ellas, confirmándose los cambios de forma descritos entre los 10 y los 21 días. Por lo que respecta a las proporciones de los segmentos, los resultados también confirman los cambios de forma supuestos por la interpretación de la relación entre las dimensiones de la glándula y su luz. Así podemos deducir que el motivo por el cual tiene lugar un desplazamiento progresivo de la luz glandular a lo largo del desarrollo es el aumento de grosor de la porción apical y de la pared anterior de la epífisis. Estas observaciones ratifican las de autores como Calvo y Boya (1978) y Jové y cols. (1999<sup>a</sup>), en lo que hace referencia a los cambios de morfología general de la glándula y a la forma en que estos se producen.

El estudio de los resultados de estos mismos parámetros en los grupos de embriones expuestos muestra, que a los 10 días, el valor absoluto del diámetro vertical en todos los grupos, es inferior al de los controles y las proporciones de los distintos segmentos se mantienen similares a las de los controles. Así, el segmento inferior (pared anterior), es superior a los

otros dos segmentos en todos los grupos, salvo en el grupo de expuestos a 26,1 mT. En este último grupo el segmento superior (pared posterior) aumenta en detrimento del inferior; ambos valores son estadísticamente significativos.

A estos mismos días, los valores absolutos del diámetro sagital no presentan un comportamiento tan uniforme como el vertical. Mientras en unos grupos (9,1 mT y 22,7 mT) los valores son mayores a los de los controles en otros presenta valores inferiores; sin embargo, el porcentaje entre sus segmentos es similar al de los controles y el segmento equivalente a la porción apical de la glándula es el mayor en todos los grupos.

A los 15 días los valores absolutos de los diámetros son: inferiores a los de los controles, en el caso del sagital y superiores a los de los controles en el caso del vertical. En ambos casos, hay una excepción en sentido contrario que se refiere a los grupos expuestos a 9,1 mT. Por lo que se refiere a los porcentajes de cada uno de los segmentos, en esta fase del desarrollo, los valores que refieren el diámetro sagital, son muy variables, no mantienen la proporcionalidad de los controles (SA 33%, SL 31%, SP 36%); en general el segmento anterior es siempre superior a los otros dos y el segmento correspondiente a la luz de la glándula, está muy reducido, esto se hace muy evidente en el grupo de expuestos a 9,1 mT (SA 60%, SL 9%, SP 30%). Los segmentos del diámetro vertical, sin embargo, guardan las mismas proporciones que los de los controles. Estos resultados confirman el cambio de forma de la glándula apuntado con anterioridad, en el sentido de adoptar una forma más redondeada que la de los 10 días.

Los 21 días los valores absolutos de ambos diámetros, en los embriones expuestos, son inferiores a los de los controles, con excepción del diámetro vertical de los grupos de 9,1 y 18,1 mT que es ligeramente

superior. Por lo que hace referencia a los segmentos de dichos diámetros, vemos que en el caso del sagital, los porcentajes se mantienen equivalentes a los de los controles ( $\pm$  SA 48%, SL 15%, SP 37%), salvo en los grupos de exposición más alta (26,2 mT/ 31,1 mT/ 36,1 mT) en los que la porción del segmento anterior aumenta en detrimento del posterior, cosa que no ocurre en los otros grupos. Los segmentos del diámetro vertical, se mantienen similares a los de los controles, las pequeñas diferencias mencionadas, con respecto a ellos, en los grupos de 9,1 y 18,1 mT no se reflejan en los porcentajes de sus segmentos que se mantienen en los mismos valores que los controles.

En resumen podríamos decir que, en general, las glándulas de los embriones expuestos siguen el mismo patrón de desarrollo que los controles aunque sean ligeramente más pequeñas. Las pequeñas diferencias detectadas no siguen una pauta que nos permita establecer la existencia del denominado efecto ventana, ya que incluso los valores que han resultado estadísticamente significativos tampoco tenían una distribución uniforme ni constante en un determinado grupo. La particularidad que parece reflejarse en los grupos de embriones expuestos con respecto a los controles, es que en la edad intermedia (a los 15 días) los embriones expuestos presentan un nivel de diferenciación de la porción apical de la glándula superior al de los controles y que se mantiene a lo largo del desarrollo para hacerse más evidente en los grupos más altos de exposición.

Estos resultados difieren en algunos aspectos de los obtenidos por Jové y cols. (1999<sup>b</sup>); en su estudio describe que a los 10 días los dos grupos de embriones expuestos presentan diámetros superiores a los de los controles y a los 15 los resultados se invierten siendo los resultados de los expuestos inferiores a los de los controles. En su caso, los resultados obtenidos en los embriones expuestos se relacionan directamente con la

intensidad de CEMc aplicados y no del tiempo de exposición a los mismos.

### **6.3. EFECTOS DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS CONTÍNUOS SOBRE LOS AGREGADOS CELULARES DE LA GLÁNDULA PINEAL**

Delimitadas las diferentes áreas de la glándula (Jové, 1996) se determina su superficie y se cuantifica el número de vesículas existentes en cada una de ellas, a cada una de las edades.

Durante el desarrollo de la pineal del embrión de pollo pueden observarse distintas formas de agrupación celular, cuya evolución puede ser utilizada como punto de partida del estado de maduración y diferenciación de la glándula (Spiroff, 1958; Campbell y Gibson, 1970; Calvo y Boya, 1978; Ohshima y Matsuo, 1988). Según, Calvo y Boya (1978) el primer estadio evolutivo de dichas agrupaciones son las “rosetas” (grupos de células dispuestas radialmente con un centro difuso), cuyo momento de aparición es motivo de controversia entre los diferentes autores: 3-4 días para Spiroff (1958), 5º día para Ohshima y Matsuo (1988), ó 7º día para Campbell y Gibson (1970).

Siguiendo con la descripción de Calvo y Boya (1978), las rosetas se convierten en vesículas tras la aparición de una luz central siendo, a los 10 días de desarrollo, la agrupación celular más abundante. Jové (1996) y Jové y cols. (1999<sup>a</sup>), confirman la clasificación de los agregados celulares de la pineal realizada con anterioridad y demuestran que a los 5 días, el 85% de los embriones poseen como único tipo de agrupación celular las rosetas, situadas fundamentalmente en las áreas anterior y apical de la glándula. Según los mismos autores, a partir de los 10 días de desarrollo, las vesículas han pasado a ser el tipo de agrupación celular más abundante, sustituyendo a las rosetas. También diferencian dos tipos de formaciones vesiculares (esféricas y elípticas) y a pesar de que no clarifican la significación de unas u otras, apuntan que ésta característica

pueda estar relacionada con sus diferentes estados evolutivos, siendo las elípticas una forma más evolucionada.

El interés por el estudio de los distintos tipos de agregados celulares que aparecen durante el desarrollo y maduración de la glándula pineal deriva de la relación que parecen poseer dichas formaciones con la síntesis de melatonina (Wainwright, 1974; Greve y cols., 1996; Akasaka y cols., 1995).

Los aspectos histológicos e inmunohistoquímicos de la glándula pineal de los vertebrados, han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, los trabajos realizados sobre la pineal de las aves, son escasos (Quay, 1965; Ralph y cols., 1975; Doskocil, 1976; Binkley, 1973; 1981; Reiter, 1985 y 1995; Goto, Miki y Kondo, 1989; Möller y Möller, 1990; Welsh, 1994; Jové, 1996). Hasta el momento los estudios sobre la presencia y tamaño de las vesículas pineales están basados, fundamentalmente en análisis cualitativos, son pocos los que aportan datos cuantitativos (Jové y cols., 1999<sup>a</sup>).

Según Akasaka y cols. (1995) los mecanismos que regulan la síntesis de melatonina en el pollo, se establecen durante su desarrollo embrionario. Campbell y Gibson (1970), y Greve y cols. (1996) basándose en estudios histoquímicos apoyan dicha hipótesis y manifiestan que el máximo papel secretor de la glándula se sitúa entre los días 10 y 17, a partir del cual dicha capacidad disminuye. A pesar de la posible relación entre los agregados celulares de la glándula pineal y la síntesis de melatonina, son pocas las descripciones histológicas y/o morfométricas realizadas sobre dichas formaciones en la epífisis de las aves (Spiroff, 1958; Campbell y Gibson, 1970; Amura, 1977; Calvo y Boya, 1978; Jové, 1996; Jové y cols., 1999<sup>a</sup>; Piera y cols., 2000).

El estudio de la evolución de las áreas de la glándula, en los controles, nos muestra las diferencias que se establecen entre cada una de ellas a



lo largo del desarrollo. A los 10 días la diferencia de superficie entre las áreas, es pequeña, siendo la apical quien presenta a una mayor superficie. A los 21 días (momento previo a la eclosión) estas diferencias se hacen muy marcadas y las áreas apical y anterior cuadruplican su volumen en detrimento del área posterior. Estos resultados confirman la existencia de distintas etapas en la velocidad de crecimiento de la glándula como apuntaba Spiroff (1958): crecimiento rápido, entre los días 5 y 12 de incubación; un período de pequeños cambios de volumen, entre los días 12 y 17; una última etapa de incremento rápido de su volumen, que abarca desde los últimos 5 días de incubación hasta el 2º mes posteclosión.

Los resultados obtenidos en el estudio de las áreas en los embriones expuestos nos permiten apreciar que su desarrollo sigue un patrón muy similar al de los controles. Así, en todas las edades hay un predominio de las áreas anterior y apical frente a la posterior. Sin embargo si analizamos lo que sucede en cada una de ellas a las distintas edades vemos que a los 10 días, no hay un predominio del área apical frente a la anterior como en los controles; ambas se igualan en detrimento del área posterior.

A los 15 días, la superficie del área apical aumenta considerablemente en todos los grupos de embriones expuestos. Las áreas anterior y posterior, por el contrario, disminuyen de superficie con respecto a los controles. Todas las diferencias detectadas del área apical y de los grupos expuestos a: 9,1 mT, 22,7 mT y 26,2 mT en el área posterior, son estadísticamente significativas.

A los 21 días ocurre algo distinto, la relación de tamaños entre las áreas es semejante a la de los controles, es decir, las áreas anterior y apical siguen teniendo mayor superficie que la posterior; sin embargo la respuesta a los CEMc aplicados es distinta. En general, los grupos de embriones expuestos a las intensidades de campo inferiores poseen

valores superiores a los de los controles (las diferencias no son significativas); por el contrario, los grupos expuestos a las intensidades más altas, presentan todos superficies inferiores a las de los controles. En este último caso, las diferencias que se aprecian en las áreas anterior y apical del grupo de 22,7 mT, son estadísticamente significativas.

Por lo que respecta al número de vesículas por área, los resultados en los grupos control muestran que existe una disminución progresiva del número de vesículas a lo largo del desarrollo y que las áreas que poseen valores superiores son la anterior y la apical.

En los embriones expuestos los resultados no son tan uniformes y varían en función del momento del desarrollo que analicemos, el área y la intensidad de exposición a que han sido sometidos los embriones. Así, a los 10 días, en las áreas anterior y posterior hay menos vesículas que en los controles, mientras que en el área apical ocurre lo contrario. Las únicas diferencias estadísticamente significativas las encontramos en esta última superficie en los grupos expuestos a 26,2 y 31,1 mT.

A los 15 días de desarrollo (momento que coincide con el período de máxima actividad glandular), los embriones de los grupos expuestos presentan una respuesta inversa a la de los 10 días. En el área apical, la densidad vesicular de todos los grupos expuestos es menor a la de los controles y en la anterior es superior. Todas las diferencias del área apical son estadísticamente significativas y mientras que en el área anterior solo lo son las detectadas entre los grupos expuestos a 26,2 y 31,1 mT y los controles. A los 21 días los resultados en los grupos de embriones expuestos muestran que en todas las áreas de la glándula hay un mayor número de vesículas que en los controles. Sin embargo, las únicas diferencias estadísticamente significativas las hallamos en el grupo de expuestos a 22,7 mT.

Si relacionamos los resultados obtenidos en el estudio de las áreas, con la densidad vesicular observamos que, tanto a los 10 como a los 15 días, existe una relación directa entre el aumento del área y la disminución del número de vesículas. Los resultados más evidentes y con un porcentaje más elevado de diferencias significativas, los encontramos en los embriones de 15 días; todas las áreas apicales son mayores en los expuestos y también todos ellos presentan un menor número de vesículas que los controles. En las otras dos áreas las diferencias significativas no corresponden siempre a los mismos grupos pero sin embargo tiene una tendencia a coincidir en los grupos de exposición a 22,7 y 26,2 mT. Otro resultado a tener en cuenta a los 15 días, es la disminución del número de vesículas que tiene lugar en el área posterior de los embriones expuestos a 9,1 mT, 22,7 mT y 26,2 mT, sin embargo, la desviación estándar es tan alta que resta valor al resultado. El hecho de que los cambios más evidentes ocurran a los 15 días y en el área apical tiene un doble interés; por un lado, esta etapa del desarrollo coincide con el periodo de máxima actividad glandular, y por otro, que el resultado coincide con los resultados apuntados por otros autores. Calvo y Boya (1978), Sakai, Hira y Matsushima (1996), Jové y cols. (1999<sup>b</sup>), Piera y cols. (2000), describen un desarrollo desigual de la glándula con un predominio de las zonas apical y anterior frente a la posterior. Relacionan esta desigualdad en el crecimiento con la maduración y la presencia predominante de vesículas frente a otras formas de agrupación celular que se hallan en la zona más posterior de la glándula. En referencia a la disminución del número de vesículas entre los días 10 y 15 que se detecta en nuestros resultados, también hallamos coincidencias con otros autores o con los obtenidos por nuestro grupo investigador en trabajos anteriores.

Así, Campbell y Gibson (1970) tras calcular la relación existente entre la superficie vesicular y la del conjunto de la glándula a lo largo del desarrollo nos dicen que entre los días 7 y 11 dicha proporción es baja,

para ir aumentando a partir del día 17. Piera y cols. (2000) realizan un estudio similar pero diferenciando las tres regiones de la glándula y al igual que en el presente estudio refieren una disminución del número de vesículas por área entre los días 10 y 15 de incubación.

Al relacionar los resultados del cálculo de las áreas y de la densidad vesicular en los embriones de 21 días, observamos que, en general, los embriones expuestos presentan superficies inferiores a las de los controles y un número de vesículas, superior (con la salvedad del grupo expuesto a 9,1 mT). Todas las diferencias detectadas a esta edad corresponden al grupo de expuestos a 22,7 mT.

De acuerdo con los resultados de Spiroff (1958) y de Campbell y Gibson (1970), la disminución de la densidad detectada en nuestro estudio, puede estar relacionada con la mayor compactación de la estructura glandular que tiene lugar durante este período de desarrollo. Autores como Ito y Matsushima (1968), Diehl y cols. (1984), Matsushima y cols. (1993) sugieren que los cambios de volumen de la glándula pueden estar relacionados con los cambios de tamaño de las células pineales. Otros como Calvo y cols. (1997), relacionan los cambios de volumen de la glándula con las fases de luz y oscuridad en coincidencia con el ritmo circadiano de secreción de melatonina. Así podría suceder que los cambios detectados en la glándula durante los días 10, 15 y 21 de incubación, puedan ser utilizados como un indicativo de la actividad funcional de la misma durante su desarrollo.

Tras la revisión de la literatura, solo podemos comparar nuestros resultados con los obtenidos por Jové y cols. (1999<sup>b</sup>) y Piera y cols. (2000), y de forma similar a lo que describen dichos autores, el aumento de número de vesículas y la disminución de la superficie del área anterior, podrían traducir un mayor grado de diferenciación de dicha área.

---

Numerosos autores (Semm, Schenider y Vollrath, 1980; Grota y cols., 1994; Reiter, 1994<sup>b</sup>; Selmaoui y Touitou, 1995), sostienen que la sensibilidad de la glándula pineal a los CEM se refleja en una disminución de la síntesis de melatonina. Greve y cols. (1996), Akasaka y cols. (1995) y Nowak y cols. (1997), describen en el embrión de pollo, los mecanismos reguladores de la síntesis de melatonina, así como la presencia de productos de secreción en las vesículas.

A la luz de los resultados expuestos creemos poder afirmar que no existe una respuesta uniforme a los CEMc. Que los cambios que se detectan reflejan variaciones en el ritmo de crecimiento y maduración de la glándula pineal y que de forma general interpretamos como de aceleración de sus procesos de maduración. Estos hechos se hacen especialmente evidentes en los embriones los 10 y 15 días de desarrollo, expuestos a CEMc de 26,2 mT y 31,1 mT y en a los 21 días de incubación, en el grupo expuestos a CEMc de 22,7 mT.