

ESTUDIO DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE PROLACTINA (PRL) EN CABRITOS (*Capra hircus*) MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA.

Light and electron microscopy study of PRL producing cells in kid goat (*Capra hircus*).

J. Seva, M.A. Gómez, J.A. Navarro, J. Sánchez, S. Gómez, A. Bernabé.

U.D. Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

RESUMEN

Se han utilizado métodos histoquímicos e inmunocitoquímicos para identificar mediante microscopía óptica y electrónica las células productoras de prolactina (PRL) en cabritos. Este tipo celular constituye el 37.25% de las células de la adenohipófisis en hembras y el 32.9% en machos, con un diámetro medio de 13.3 y 12.9 (μm , respectivamente). Ultraestructuralmente en hembras hay 3 tipos celulares dependiendo del tamaño de los gránulos de secreción: tipo I con gránulos grandes ($> 500 \text{ nm}$), tipo II con gránulos de tamaño medio (350-500 nm) y tipo III con pequeños gránulos (175-350 nm). En machos todas las células son de tipo I. Se concluye expresando que estas diferencias pueden ser debidas a un mayor nivel de síntesis y utilización de la hormona prolactina por parte de las células PRL en hembras que en machos.

Palabras clave: Células PRL, microscopio óptico, microscopio electrónico, adenohipófisis, oro coloidal, PAP, cabrito.

ABSTRACT

Staining, histochemical and immunocytochemical methods were used for identificating of PRL producing cells in kid goat by light and electron microscopy. This cell type is 37.25% of adenohipophysial cells in female and 32.9% in male, with a mean diameter of 13.3 and 12.9 μm , respectively. Ultrastructurally there are three cellular types in female depending on the range of the granular population: type I with large granules ($>500 \text{ nm}$), type II with medium sized granules (350-500 nm) and type III with small granules (175-350 nm) In male there are only type I cells. It is concluded that these differences may be related to a higher level of synthesis and utilization of prolactin hormone from PRL cells in female than in male kid goats.

Key words: PRL cells, electron microscopy, light microscopy, adenohipophysis, gold colloidal, PAP, goat.

INTRODUCCIÓN

Las variaciones en la actividad funcional de las células productoras de PRL son bastante conocidas en rata (KUROSUMI, 1991) y están relacionadas con las variaciones en las características morfológicas de las mismas. Sin embargo tales variaciones apenas han sido estudiadas en ruminantes, limitándose la mayor parte de los cambios al estado reproductivo de las hembras (MIKAMI, 1970; SCHULTE et al., 1981; TASSEL y KENNEDY, 1972). El objetivo de este trabajo es investigar la existencia de diferencias morfológicas en células productoras de PRL en cabras jóvenes de diferentes sexos, mediante microscopía óptica y electrónica, utilizando para ello métodos inmunocitoquímicos que han sido probados para identificar de forma correcta células productoras de PRL, como son la técnica peroxidasa-antiperoxidasa (NAVARRO, 1993) e inmuno-oro coloidal (SANCHEZ et al. 1992).

MATERIAL Y MÉTODOS

Microscopía óptica

En este estudio se ha utilizado la *Pars distalis* de la adenohipófisis de 12 cabras jóvenes -6 machos, 6 hembras- (*Capra hircus*) de la raza Murciano-granadina, de 3 meses de edad. La glándula pituitaria fue recogida rápidamente tras el desangrado y decapitación del animal, una vez sacrificado.

Las glándulas se fijaron en líquido de Gerad (GABE, 1968), incluida en parafina y seccionada en cortes de 4-5 mm de grosor.

Para realizar el marcaje de las células PRL se empleó el método peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), descrito a continuación:

Tras desparafinar, las secciones se coloca-

ron en un recipiente con lugol para eliminar el sublimado. Posteriormente se blanquearon con hiposulfato sódico al 5%, se lavaron con abundante agua corriente y se mantuvieron en TBS (Tris Buffer Saline, 0.005 M, pH 7.6) durante 5 min. Después:

1. Tratamiento con peróxido de hidrógeno al 5% durante 5 min. para la eliminación de la actividad peroxidasa endógena.
2. Lavado en TBS durante 5 min.
3. Cubrición con suero normal de cerdo (Dako, Denmark) diluido en TBS durante 20 min.
4. Aplicación de PRL de conejo anti-oveja (UBC Bioproducts, Belgium) a dilución 1/1000 e incubación 2 h a temperatura ambiente.
5. Lavado en TBS durante 20 min.
6. Tratamiento con el anticuerpo secundario Ig G de cerdo frente a Ig G de conejo (Dako, Denmark) diluido en TBS durante 20 min.
7. Lavado en TBS durante 20 min.
8. Aplicación del complejo PAP (Dako, Denmark) diluido en TBS durante 20 min.
9. Lavado en TBS durante 20 min.
10. Revelado con DAB (3,3 -diamino-bencidina tetracloride, Sigma) durante 5 min.

Se aplicaron los controles inmunocitoquímicos recomendados por CHILDS y ELLISON (1980), utilizando secciones adyacentes y evaluando la especificidad y sensibilidad de la reacción con el siguiente test:

- a) El antisuero primario se sustituye por suero normal de cerdo o TBS.
- b) El antisuero primario se adsorbe con su homólogo (PRL hormona, Sigma) después de la incubación de la sección.
- c) El primer antisuero se aplica a las secciones aumentando las diluciones.

Las observaciones inmunohistoquímicas se compararon con secciones tratadas con los métodos histológicos tradicionales en el estudio de la adenohipófisis como hematoxilina-eosina, PAS, tetracromo de Herlant, azul alcian PAS-naranja G, Cleveland-Wolfe (GABE, 1968).

Microscopía electrónica

Para este estudio, se extrajo la glándula pituitaria de 6 animales (3 machos, 3 hembras), tras la eutanasia con pentotal® y perfusión de la cabeza con glutaraldehído al 5% y paraformaldehído al 10% en tampón fosfato 0.06 M. Las muestras fueron tomadas de la porción central de la adenohipófisis. Estas se dejaron inmersas en líquido fijador durante 2 horas, se lavaron durante toda la noche en tampón fosfato 0.06 M añadiendo un 8% de sacarosa. Después las muestras fueron postfijadas en osmio e incluidas en Epon.

Se realizó el método inmunocitoquímico del complejo inmuno-oro coloidal (De MEY, 1983), para ello se recogieron secciones de unos 100 nm de grosor, que se depositaron en rejillas de níquel de 300 agujeros y se blanquearon con una solución acuosa saturada de metaperyodato sódico durante 30 min. a temperatura ambiente. Las rejillas posteriormente se mantuvieron flotando en TBS con un 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y se incubó con PRL de conejo anti-oveja a dilución 1:2500 (UBC Bioproducts, Belgium), diluida en TBS + 1% BSA durante 24 h a 4 °C. Tras diversos lavados en TBS + 1% BSA, las rejillas fueron colocadas con el complejo IgG-oro coloidal (10 nm; Serva, Germany) a dilución 1:40 en TBS + BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con TBS, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Con el fin de confirmar la especificidad del marcaje se realizaron los test de controles antes mencionados.

Estudio morfométrico

Para realizar el estudio de microscopía óptica se midieron el diámetro celular y nuclear en 50 células de cada animal con un analizador de imagen semiautomático IBAS I (Kontron). El número de células inmunomarcadas se calculó al obtener el número de células PRL respecto del total de número de células existentes por campo, en 25 campos de 10.000 μm^2 por animal.

Para realizar el estudio de microscopía electrónica se midieron el diámetro y el área de 30 gránulos de secreción de 30 células por animal con un analizador de imagen semiautomático IBAS I (Kontron), utilizando micrografías con un aumento final de 11.340. El número de células y gránulos se determinó previamente calculando $n > (S/0.05(\bar{x}))^2$, donde S es la desviación típica, \bar{x} la media de muestra y 0.05 es el nivel de confianza elegido (AHEERNE y DUNNILL, 1982). El diámetro y área medio se corrigieron utilizando el factor de WEIBEL (WEIBEL y GOMEZ, 1962). El tratamiento estadístico se realizó con el programa informático STATGRAPHICS, comparando análisis de varianza entre machos y hembras. Por último se aplicó un test de chi-cuadrado a los grupos obtenidos.

RESULTADOS

Estudio estructural

En cortes de adenohipófisis adyacentes las células inmunomarcadas con suero anti-PRL ovina son eritrosinófilas y pueden ser PAS

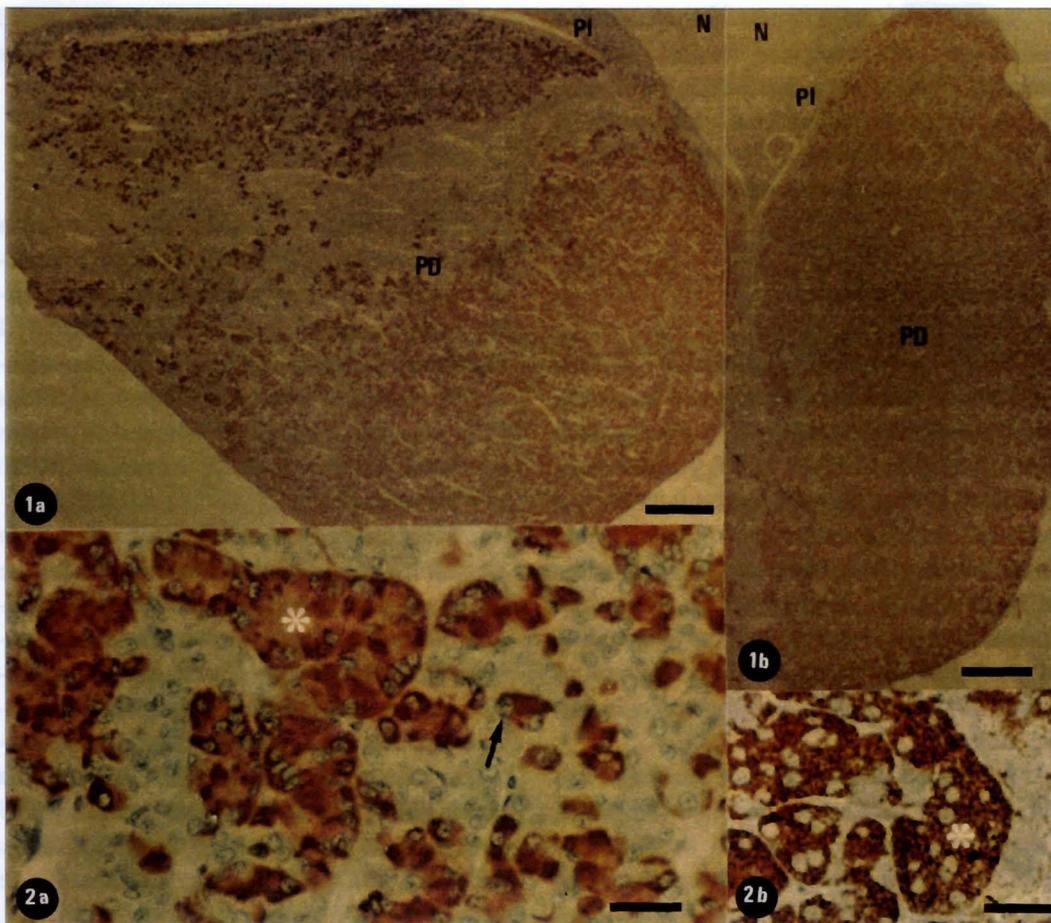


Figura 1a. Distribución de células PRL en corte sagital de adenohipófisis de cabrito. PD (*Pars distalis*), PI (*Pars intermedia*), N (Neurohipófisis). Bar= 0.5 mm.

Figura 1b. Distribución de células PRL en corte transversal de adenohipófisis de cabrito. PD (*Pars distalis*), PI (*Pars intermedia*), N (Neurohipófisis). Bar= 0.5 mm.

Figura 2a. Células PRL de cabrito formando grupos (asterisco) y aisladas (flecha). Bar= 25 μ m.

Figura 2b. Células PRL de cabrito formando grupos (asterisco). Corte semifino. Bar= 25 μ m.

positivas o negativas. Representan el 37,25% de las células adenohipofisarias en hembras y el 32,9% en machos. En corte sagital se distribuyen por toda la *Pars distalis*, excepto en la franja que cruza la glándula en sentido rostro-caudodorsal (figura 1a) y transversalmente ocupan los límites dorsales y ventrales, siendo

más numerosas en los dorsales (figura 1b).

Las células inmunomarcadas se disponen en grupos, constituyendo cordones glandulares completos, o entremezcladas con otros tipos celulares y ocasionalmente aparecen aisladas. La forma de las células es variable (ovoide, piramidal, alargada) (figura 2). El núcleo es

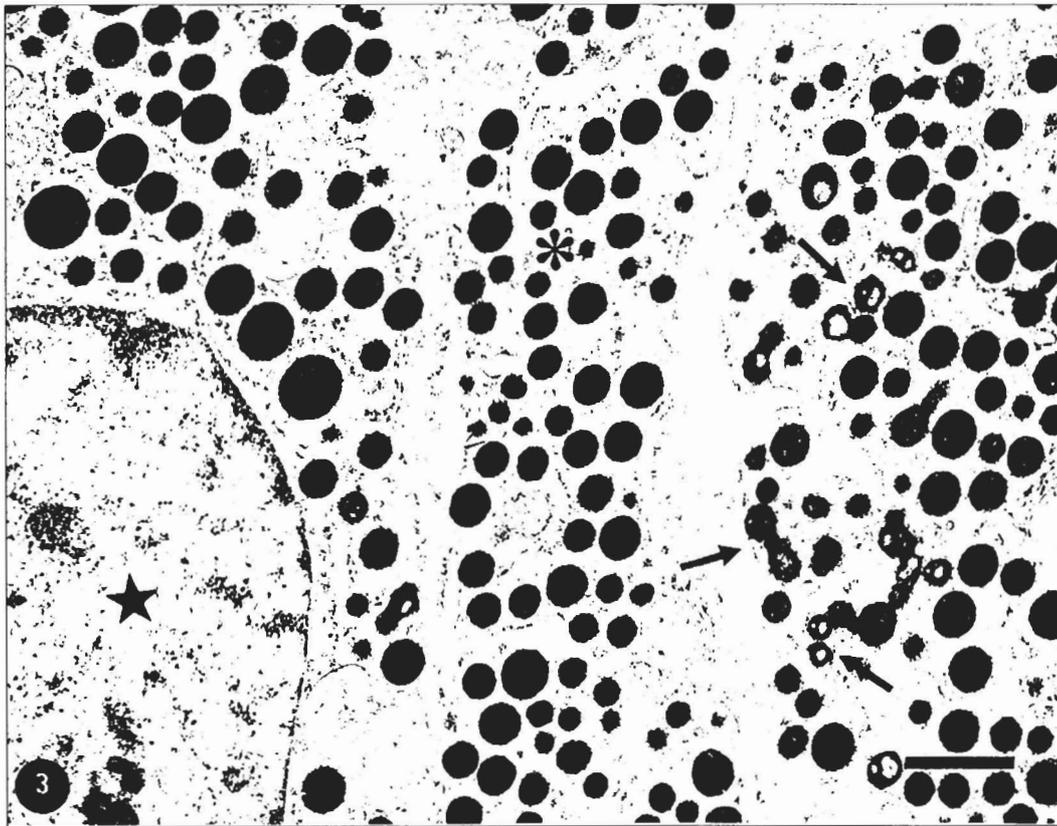


Figura 3. Células PRL de cabrito hembra con gránulos de secreción con inmunoreacción positiva a ambos lados de la célula central (asterisco) negativa. Célula tipo I (estrella) con gránulos de gran tamaño. Se observan imágenes de exocitosis en la célula de la derecha (flecha). Bar= 1 μ m.

típicamente esférico y polarizado. El tamaño medio celular y el diámetro medio nuclear se encuentran indicados en la tabla 1.

Estudio Ultraestructural

En células de adenohipófisis de cabritos marcadas con el suero PRL anti-oveja sólo se encontró inmunoreacción en la matriz de los gránulos de secreción (figura 3). Estos son redondeados, muy electrodensos y se distribuyen por todo el citoplasma y demuestran diferencias significativas en el tamaño entre

machos y hembras. El valor medio del área del gránulo de secreción es 0.438 μ m² en los machos y 0.356 μ m² en las hembras. Existen diferencias significativas en el tamaño de los gránulos de secreción entre sexos, siendo el diámetro medio de 725.5 nm en hembras y 835.8 nm en machos.

La distribución de los gránulos de secreción en intervalos permitió diferenciar en las hembras tres tipos de células según el porcentaje de gránulos perteneciente a cada uno de ellos: células tipo I con gránulos de secreción predominantemente de tamaño grande, y son el

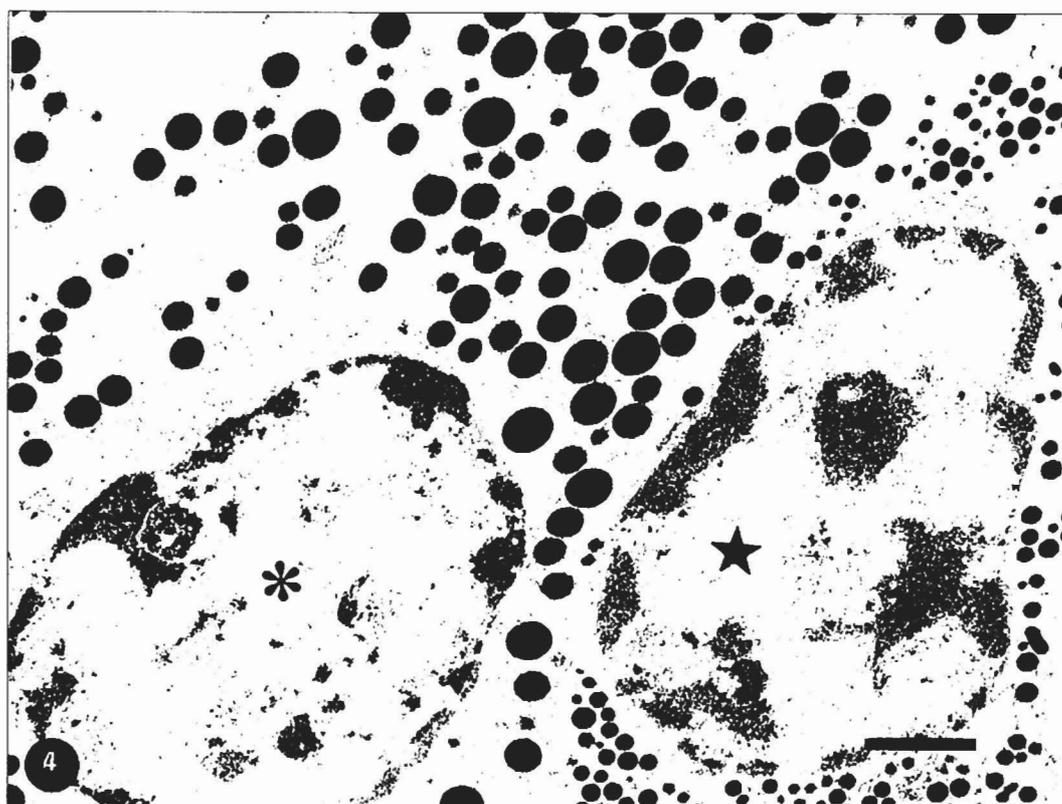


Figura 4. Células PRL de cabrito tipo III con pequeños gránulos (estrella) y tipo II con gránulos de tamaño medio (asterisco). Bar= 1 μ m.

84.45%, células tipo II con un predominio de gránulos de tamaño medio, y son el 14.4% y células tipo III donde predominan los gránulos pequeños y son el 1.1% de las células inmunomarcadas (figura 4); Al realizar el test de la chi-cuadrado la población de tipo III presenta una mayor heterogeneidad que las de tipo I y II. En los machos todas las células inmunomarcadas son del Tipo III.

El retículo endoplásmico rugoso se encuentra constituido por cisternas conectadas entre sí y distribuidas al azar; a veces se disponen paralelas y cercanas a la membrana citoplasmática. En células con abundantes gránulos

de secreción de gran tamaño se presentan complejos de Golgi ocupando amplias áreas con imágenes de formación granular. Las células poco granuladas pueden presentar varios dictiosomas de menores dimensiones. Las mitocondrias tienen una forma alargada y en células poco granuladas se encuentran localizadas perinuclearmente y próximas al complejo de Golgi.

Hay una mayor frecuencia de imágenes de exocitosis en hembras (6.05%) que en machos (1.61%). Estas imágenes son formaciones de morfología redondeada o irregular de contenido heterogéneo con áreas electrodensas e inmu-

Tabla 1. Número y tamaño (μm) de las células PRL de cabritos machos y hembra.

	DENSIDAD CELULAR *	TAMAÑO CELULAR **	TAMAÑO NUCLEAR**
HEMBRAS	20.49 \pm 0.967	13.3 \pm 0.1	6.67 \pm 0.04
MACHOS	17.76 \pm 0.887	12.9 \pm 0.1	7.02 \pm 0.06

* Media desviación estandar de células PRL en 10.000 μm^2 .

**Diámetro medio \pm desviación estandar.

nomarcadas y adielectrónicas próximas a la membrana celular (figura 3).

DISCUSIÓN

La utilización del suero anti-PRL ovino resulta eficaz para la identificación de las células PRL de cabritos en muestras perfundidas y no perfundidas incluidas en parafina y Epon. Las células productoras de prolactina son eritrosinófilas y PAS + o PAS - como ha sido descrito en cabra adulta (NAVARRO, 1993), a diferencia de lo observado por SHING y DHINGRA (1979) que con técnicas clásicas sólo describen la existencia de células PRL PAS + en cabras en gestación y lactación, pero no en animales impúberes y cabras en anestro.

Las células PRL en cabritos machos y hembras tienen una distribución semejante a la de cabra adulta (NAVARRO, 1993), cordero (GOMEZ *et al.*, 1989) y vaca (MIKAMI, 1970). Este tipo celular es el más abundante en la *Pars distalis* de la adenohipófisis como también ocurre en cabra adulta (NAVARRO, 1993) y cordero (GOMEZ *et al.*, 1989). Al igual que observa GIROD (1984) las células PRL son predominantes en la hembra, donde representan el 37,25% de las células adenohipofisarias, mientras que en los machos constituyen el 32,9%. Por otro lado los tamaños encontrados por SHING y DHINGRA (1979) para este tipo

celular son inferiores a los obtenidos en este estudio, lo que creemos, puede deberse a la metodología utilizada.

Los gránulos de secreción de los cabritos son redondeados, homogéneos y muy electrodensos, coincidiendo con las descripciones de SHIRASAWA *et al.* (1985) y SANCHEZ *et al.* (1992) en cabra y DACHEUX y DUBOIS (1976) y PARRY *et al.* 1978 en otras especies ruminantes, no observándose los gránulos de secreción polimorfos descritos en rata (KUROSUMI, 1968), ratón (BARNES, 1962,1963) y cobayo (BEAUVILLAIN *et al.*,1977).

El tamaño de los gránulos de secreción de los machos es significativamente mayor que el de las hembras, en las que la población granular es más heterogénea (tabla 1). SANCHEZ *et al.* (1992) sugieren que cuando la hormona PRL no es necesaria se almacena en gránulos de gran tamaño, lo que explicaría el hecho de que los gránulos son mayores en animales impúberes que en adultos. Si esta hipótesis fuera cierta podemos concluir diciendo que las cabras impúberes hembra liberan mayor hormona PRL que los machos, lo que explicaría la variabilidad del tamaño granular.

El amplio rango de los gránulos de secreción de las células PRL hace difícil su identificación, entre estos se encuentran los gránulos pequeños (células PRL tipo III) que pueden ser confundidos con los de otros tipos celulares de

la adenohipófisis (GN, GH y ACTH) cuando no se utilizan técnicas inmunocitoquímicas para microscopio electrónico. Por lo tanto los métodos inmunocitoquímicos son útiles para conseguir una correcta identificación de células PRL.

No existen diferencias en el resto de las características morfológicas de las células PRL entre machos y hembras. Las características del retículo endoplásmico rugoso son similar a las descritas en cabras por SHIRASAWA *et al.* (1984).

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Murcia y a D. Juan Sánchez y D. Carlos De Jodar por su labor técnica desempeñada en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- AHEERNE W.A., DUNNIL M.S. 1982. Morphometry. Edwards Arnold Ltd, London.
- BARNES B.G. 1962. Electron microscope studies on the secretory cytology of the mouse anterior pituitary. *Endocrinology* 71: 618-628.
- BARNES B.G. 1963. The fine structure of the mouse adenohipofisis in various physiological states. En: *Cytologie de l'adenohypophyse*. pp. 91-103. Ed: CNRS. Paris.
- BEAUVILLAIN J.C., MAZZUCA M., DUBOIS M.P. 1977. The prolactin and growth-hormone producing cells the guinea-pig pituitary. Electron microscopic study using immunocytochemical means. *Cell. Tiss. Res.* 184: 343-358.
- CHILDS G., ELLISON D. 1980. A critique of the contributions of immunoperoxidase cytochemistry to or undestaining of pituitary cell function, as illustrated by our current studies of gonadotropes, corticotropes and endogenous pituitary GnRH and TRH. *J. Histochem.* 12: 405-418
- DACHEUX F., DUBOIS M.P. 1976. Ultrastructural localization of prolactin, growth hormone and luteinizing hormone by immunocytochemical techniques in the bovine pituitary. *Cell. Tiss. Res.* 174: 245-260.
- DE MEY J. 1983. Colloidal gold probes in immunocytochemistry. En: *Immunochemistry. Practical Applications in Pathology and Biology*. pp. 82-112. Eds.: POLAK J.M., VAN NOORDEN S. Wright and Sons, Bristol.
- GABE M. 1968. *Tecnicas histologiques*. Masson et Cie, Paris.
- GIROD C. 1984. Fine structure of the pituitary *Pars distalis*. En: *Ultrastructure of endocrine Cell and Tissues*. pp. 12-18. Ed: MOTA P.M. Martinus Nijhoff, Boston.
- GÓMEZ S., BERNABÉ A., NAVARRO J.A., SÁNCHEZ J., GÓMEZ M.A. 1989. Estudio estructural, inmunocitoquímico y ultraestructural de las células PRL de cordero (*Ovis aries L.*) *An. Vet. (Murcia)* 5: 59-66.
- KUROSUMI K. 1968. Funtional classification of cell types of the anterior pituitary land accomplished by electron microscopy. *Arch. Histol. Jap.* 29: 329-362.
- KUROSUMI K. 1991. Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohipofisis in the rat: a review. *J. Electron Microscopy Tech.* 19: 42-56.
- MIKAMI S. 1970. Light and electron microscopic of six types of glandular cells of the

- bovine adenohipophysis. Z. Zellforsch. 105: 457-482.
- NAVARRO J.A. 1993. Células PRL. En: Modificaciones de la Pars distalis adenohipofisaria de cabra murciano-granadina en anestro, gestación y producción láctea: estudio inmunocitoquímico y ultraestructural. Tesis doctoral. Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico. Universidad de Murcia, Murcia. pp. 62-68.
- PARRY D.M., McMILLEN I.C., WILLCOX D.L. 1978. Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the ovine pituitary. Cell Tiss. Res. 194:327-336.
- SÁNCHEZ J., BERNABÉ A., NAVARRO J.A., GÓMEZ M.A., GÓMEZ J. 1992. Immunogold identification of prolactin cells of goats in anoestrus, pregnancy and milk production: ultrastructural variations. Acta Anat. 143: 118-126.
- SHIRASAWA N., YAMAGUCHI S., YOSHIMURA F. 1984. Granulated folliculo-stellate cells and growth hormone cells immunostained with anti-s 100 protein serum in the pituitary glands of the goats. Cell Tiss. Res. 237: 7-14.
- SHIRASAWA N., KIHARA H., YOSHIMURA F. 1985. Fine structural and immunohistochemical studies of goats adenohipophysial cells. Cell Tiss. Res. 240: 315-321.
- SINGH Y., DHINGRA L.D. 1979. Morphogenesis of the *Hypophysis cerebri* in goat. 4. Pars distalis and Pars infundibularis adenohipophysis. Indian J. Anim. Sci. 49: 1067-1075.
- TASSEL R., KENNEDY J.P. 1972. Tintorial differentiation of the cell types in the Pars anterior of the sheep. Aust. J. Biol. Sci. 25: 1249-1257.
- WEIBEL, E.R., GÓMEZ, D.M. 1962. A principle for counting tissue structures on random sections. J. Appl. Physiol. 17: 343.