

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS GONADOTROPAS DE CORDERO (*OVIS ARIES* L.)

Immunocytochemical and ultrastructural study of gonadotrope cells of lamb (*Ovis aries* L.).

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

Histología y Anatomía Patológica. Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Apartado de Correos, 4021. 30071. Murcia.

Recibido: 9 Noviembre 1992

Aceptado: 20 Enero 1993

RESUMEN

Se estudian las características estructurales y ultraestructurales de las células gonadotropas (GN) de la *Pars distalis* adenohipofisaria de corderos de raza Segureña, seis machos y seis hembras, de seis meses de edad y un peso aproximado de 24 kg.

Se han utilizado técnicas tintoriales e histoquímicas (tetracromo de Herlant, PAS, PAS-OG, AA-PAS-OG y Cleveland-Wolfe) contrastadas con el método inmunocitoquímico del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) sobre cortes en parafina y con la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en cortes semifinos adyacentes a ultrafinos, utilizando sueros anti-FSHh y anti-LHh previamente adsorbidos con las hormonas LH y FSH, respectivamente. El estudio ultraestructural está basado en la comparación de cortes ultrafinos y semifinos adyacentes, inmunomarcados con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa. En los corderos la mayoría de las células GN inmunomarcadas son monohormonales. Las células LH representan el 7.5-10% del total de células adenohipofisarias y las células FSH el 0.1%, y se distribuyen por las zonas anterior y dorso-caudal de la glándula. Ultraestructuralmente se caracterizan por presentar gránulos de secreción homogéneos y electrodensos de 250 nm de diámetro, desarrollo variable del retículo endoplásmico granular y abundantes lisosomas.

Palabras clave: células gonadotropas, inmunocitoquímica, *Pars distalis*, adenohipofisis, ultraestructura, cordero.

ABSTRACT

We have studied the structure and ultrastructure of adenohipophyseal *Pars distalis* of 6 males and 6 females of sheep belonging to the Segureña breed, aged 3 months and weighing about 24 kg.

Routine staining and histochemical methods (Herlant tetracrome, PAS, PAS-O, AA-PAS-OG and Cleveland-Wolfe) are compared with avidine-biotin-complex (ABC). Ultrastructural identification of cells is based on comparisons between ul-

trathin sections and semithin sections labelled by means of the peroxidase-antiperoxidase technique (PAP). Antisera FSHh and LHh were utilized previously adsorbed with FSH and LH hormones. Gonadotrope LH cells are a 7.5-10% and FSH cells are a 0.1% of the total of cells, and appear distributed in the anterior and dorso-caudal region after a sagittal section. These cells are characterized by large lysosomes, a single type of secretory granules (250 nm) and different appearance of granular endoplasmic reticulum.

Key words: gonadotrope cells, immunocytochemistry, *Pars distalis*, adenohypophysis, ultrastructure, lamb.

INTRODUCCIÓN

La existencia de ambas hormonas gonadotropas, FSH y LH, en una misma célula hipofisaria fue sugerida por BARNETT *et al.* (1956) en la rata, y posteriormente corroborada mediante técnicas inmunocitoquímicas por otros autores en esta misma especie (OSAMURA 1983; DADA *et al.* 1983, 1984; INOUE y HAGINO 1984; INOUE y KURUSUMI 1984; NAKAMURA *et al.* 1985; MUNUERA 1986), en cerdo (BATTEN y HOPKINS 1978), y cabra (SHIRASAWA *et al.* 1985; NAVARRO *et al.* 1992). Además de las células que contienen ambas hormonas existen células monohormonales que contienen LH (BATTEN y HOPKINS 1978; RICHARDSON 1981; DADA *et al.* 1983, 1984; GROSS 1984; GROSS *et al.* 1984) o FSH (MORIARTY 1975; NAKAMURA *et al.* 1985; van NOORDEN *et al.* 1986). Otros autores defienden la existencia de células monohormonales tanto FSH como LH (OSAMURA 1983).

En la especie ovina, la mayoría de los trabajos sobre células gonadotropas se han realizado mediante técnicas histoquímicas (WARBRITTON y MCKENZIE 1937; MIKAMI y DAIMOND 1968; TASSELL y KENNEDY 1972; MOLINA 1984), diferenciando dos tipos de células gonadotropas, LH y FSH. GROSS (1984) y GROSS *et al.* (1984) estudian con técnicas inmunocitoquímicas las células gonadotropas de la *Pars tuberalis* y encuentran que la mayoría de las células son bihormonales y sólo el 10-15% son monohormonales LH. A nivel, ultraestructural DACHEUX y DUBOIS (1978) identifican un sólo tipo morfológico de célula gonadotropa, caracterizada por la presencia de gránulos de secreción de 250 nm de diámetro, escaso desarrollo del retículo endoplásmico granular (REG) y abundantes lisosomas.

En el presente trabajo se estudian las características morfológicas y tintoriales de las células

gonadotropas de corderos mediante su identificación inmunocitoquímica en cortes en parafina y semifinos adyacentes a ultrafinos para microscopía electrónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material de estudio se han empleado las adenohipófisis de 12 corderos (6 machos y 6 hembras), de raza Segureña con un peso aproximado de 24 Kg, recogidas en el matadero, inmediatamente después del sacrificio. El estudio estructural es similar al de GÓMEZ *et al.* (1987), pero se realizó la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa - ABC- (HSU y RAINE, 1981). El estudio ultraestructural es semejante al descrito por NAVARRO *et al.*, (1992). Para comprobar la posible reacción cruzada de las hormonas glicoproteicas (FSH, LH, TSH) se practicó la adsorción de cada antisuero frente a las otras dos hormonas.

RESULTADOS

Estudio estructural

Las células de la adenohipófisis de corderos marcadas con suero anti-FSH preadsorbido con hormona LH representan el 0.1% del total de células adenohipofisarias, y las marcadas con suero anti-LH preadsorbido con la hormona FSH el 7.5-10%. En ambos casos se distribuyen por toda la *Pars distalis*. Son más numerosas en la porción anterior, zona vascular o "zona del sexo", así como en la porción dorsocaudal en los cortes sagitales (Figuras 1, 2).

Al comparar secciones adenohipofisarias adyacentes inmunomarcadas con suero anti-FSH o anti-LH teñidas con diferentes técnicas histoquímicas, las células inmunomarcadas son PAS positivas y azul alcian positivas. Con el tetracromo de

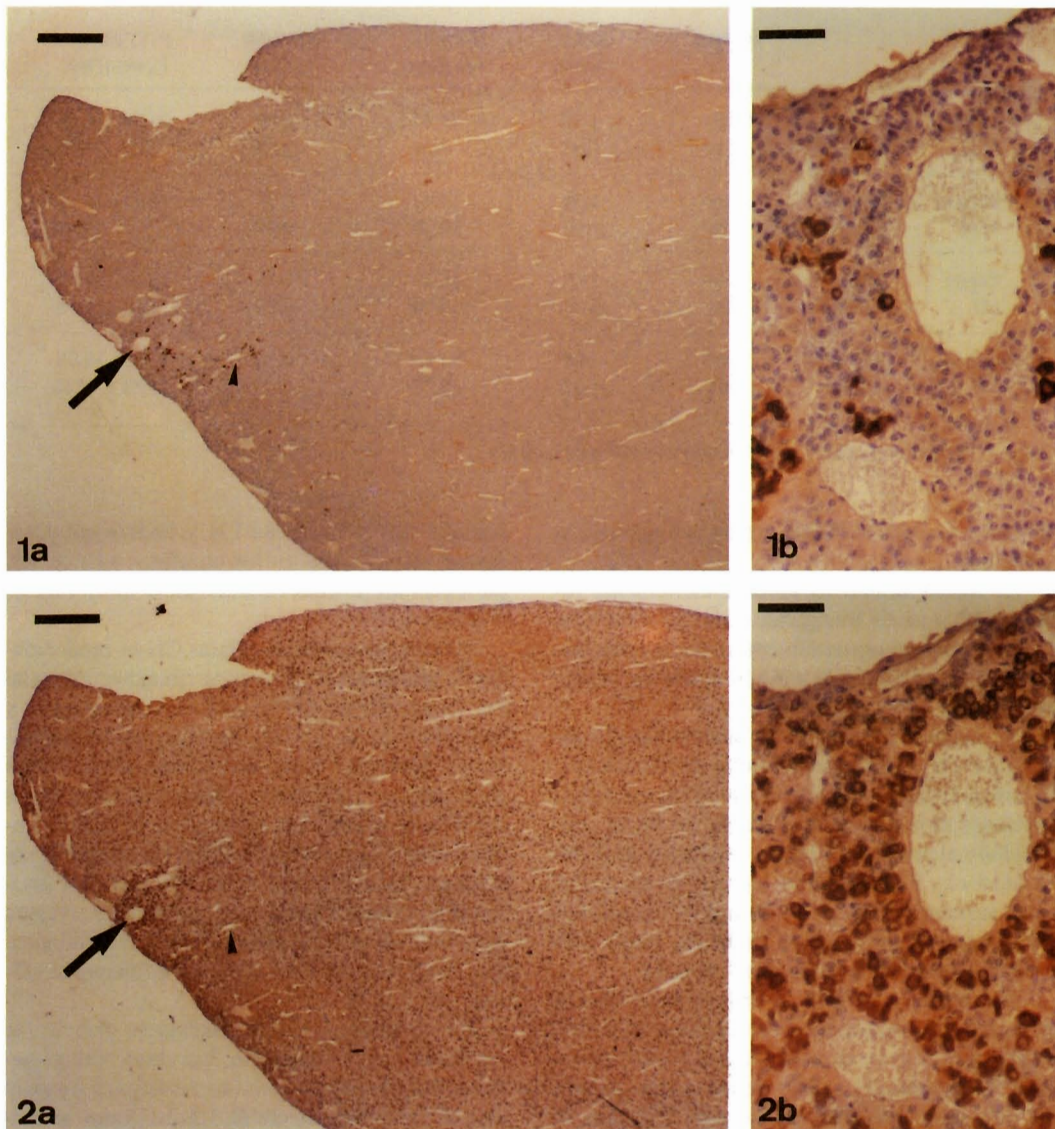


FIGURA 1a,b. Distribución de las células FSH en la *Pars distalis* adenohipofisaria (flecha, cabeza de flecha) inmunomarcadas con suero anti-FSHh después de haber sido adsorbido con hormona LHh. (Barra= 100 μ m). b. Detalle de la porción anteroventral (flecha). Método ABC. Barra= 25 μ m.

FIGURA 2a,b. Distribución de las células LH (flecha, cabeza de flecha) inmunomarcadas con suero anti-LHh. (Barra= 100 μ m). b. Detalle (flecha). Método ABC. Barra= 25 μ m.

		MEDIA	DESV. TÍPICA	COEFIC. VARIAC.	ERROR MEDIA	INTERVALO CONFIDEN
Célula FSH	Citopl.	14.52	2.39	16.47	0.28	13.96 - 15.09
	Núcleo	7.17	0.67	9.43	0.08	7.02 - 7.33
Célula FSH	Citopl.	14.83	2.36	15.92	0.14	14.53 - 15.12
	Núcleo	7.99	0.96	12.18	0.06	7.87 - 8.11
Célula LH	Citopl.	14.36	2.35	16.38	0.16	14.04 - 14.69
	Núcleo	8.24	0.82	10.00	0.06	8.12 - 8.36
Célula LH	Citopl.	13.65	2.88	21.13	0.16	13.33 - 13.98
	Núcleo	7.44	1.02	13.77	0.62	7.33 - 7.56

TABLA 1. Diámetros medios y estadísticos del citoplasma y núcleo.

Herlant y Cleveland Wolfe toman una coloración azul clara.

La forma celular es predominantemente redondeada, a veces triangular, alargada o estrellada. Se encuentran generalmente aisladas, con tendencia a agruparse en la porción rostral de la adenohipófisis.

No existen diferencias de tamaño significativas entre las células gonadotropas de los machos. El tamaño medio estimado de las células inmunomarcadas con suero anti-FSH es de 14.67 μm , pudiendo alcanzar 21.5 μm en machos y 24.4 μm en hembras. El tamaño de las células marcadas con suero anti-LH es de 14.36 μm en los machos y 13.65 μm en las hembras, pudiendo medir 22.9 μm y 21.5 μm respectivamente (Tabla 1).

El núcleo es esférico y voluminoso, con la cromatina distribuida por el nucleoplasma a modo de gruesos grumos, asociada a la envoltura nuclear. El tamaño del núcleo de las células marcadas con suero anti-FSH oscila entre 7.17 μm en los machos y 7.99 μm en las hembras. El de las células inmunomarcadas con suero anti-LH varía entre 8.24 μm y 7.44 μm respectivamente (Tabla 1). Generalmente, el núcleo se sitúa en un extremo de la célula y presenta un nucléolo pequeño.

Estudio ultraestructural

Las células marcadas en los cortes semifinos con suero anti-FSH o anti-LH, previamente ad-

sorbido con la hormona LH y FSH respectivamente, identificadas en los ultrafinos adyacentes, presentan las mismas características morfológicas (Figuras 3, 4).

El citoplasma de las células GN es moderadamente electrodensito y contiene abundantes gránulos de secreción redondeados, homogéneos y electrodensos, de 250 nm de diámetro medio (Tabla 1). El núcleo suele ser esférico, a veces irregular, con escasa heterocromatina. El retículo endoplásmico granular está bien desarrollado y presenta dos disposiciones distintas: en forma de cisternas aplanadas que contienen material adielectrónico o moderadamente electrodensito (Figura 3); o bien en cisternas dilatadas e intercomunicadas, de contenido adielectrónico o finamente granular (Figura 4).

El complejo de Golgi, cuando se observa, se encuentra bien desarrollado. Las mitocondrias tienen forma variable, generalmente esférica o globosa, con un tamaño medio de 1.5-2x0.8 μm , de matriz moderadamente electrodensa y escasas crestas. Existen abundantes lisosomas de gran tamaño, que pueden llegar a medir hasta 1.5 μm de diámetro, contenido homogéneo y moderadamente electrodensito. En ocasiones se observan algunas células provistas de cilios y cuerpos multivesiculares.

DISCUSIÓN

Los porcentajes de células marcadas con sue-

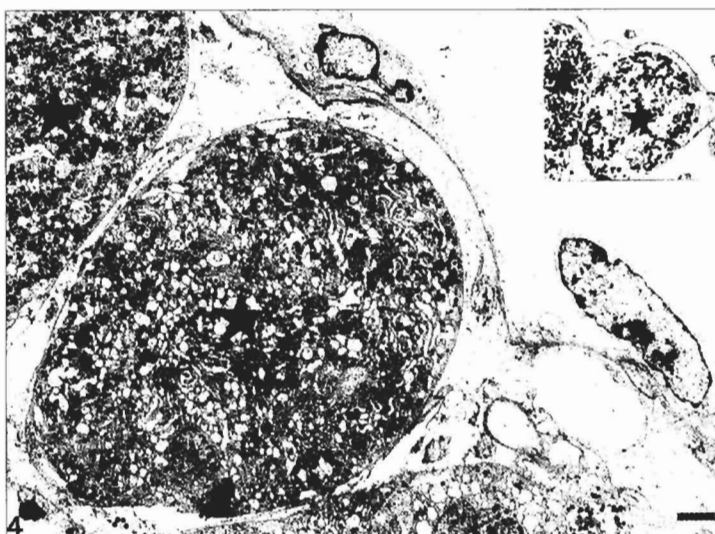
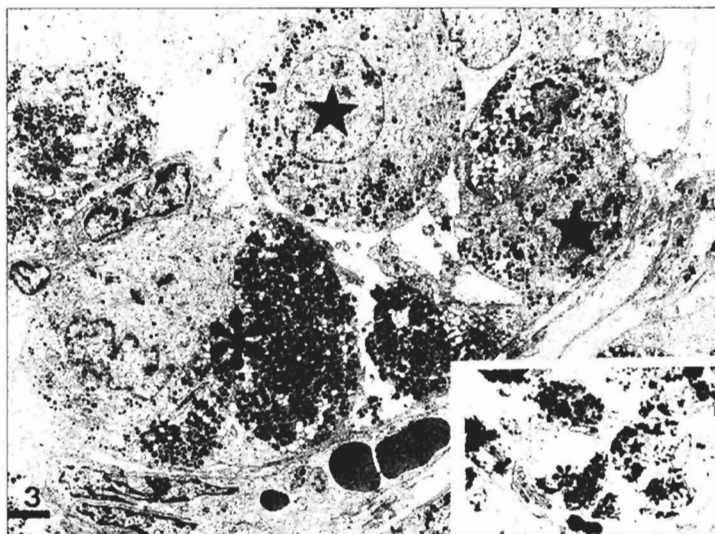


FIGURA 3. Células gonadotropas (estrella) inmunomarcadas con suero anti-FSHh (detalle 600x), con abundantes gránulos de secreción y lisosomas de mayores dimensiones y de menor electrodensidad que los gránulos. Las células PRL (asteriscos) aparecen en el semifino adyacente teñidas de menor intensidad por el contraste con H-E. Barra= 2 μ m.

FIGURA 4. Acinos de células inmunoteñidas (estrellas) en la sección adyacente con suero anti-FSHh (detalle 750x). Las células presentan gran desarrollo del REG a modo de cisternas dilatadas y contenido finamente granular y poco denso a los electrones. Los lisosomas son de mayor tamaño y menor densidad electrónica que los gránulos de secreción. Barra= 2 μ m.

ro anti-FSH y anti-LH, previamente adsorbidas con hormona LH y FSH respectivamente, indican que la mayoría de las células gonadotropas en corderos son monohormonales, predominando las células que contiene LH (7.5-10%), mientras que sólo un 0.1% contienen FSH. Estos datos difieren de los resultados observados por GROSS (1984) y GROSS *et al.* (1984) en la *Pars tuberalis*, donde la mayoría de las células son bihormonales y sólo un 10-15% monohormonales. El escaso número de células bihormonales encontradas podría deberse al bajo contenido de FSH no detectable inmunocitoquímicamente en animales jóvenes, como ya sugirieran NAKANE (1975), DACHEUX (1978) y TOUGARD *et al.* (1980).

Consideradas en conjunto, las características morfológicas de las células GN son similares, salvo el menor tamaño de las células LH de las hembras.

La distribución de las células GN en el cordero se ajusta a los modelos descritos en rumiantes por MIKAMI y DAIMON (1968), DUBOIS y HERLANT (1968), SINGH y DHINGRA (1979), GUTTE y SEEGER (1987), NAVARRO *et al.* (1992) y GÓMEZ *et al.* (1987) y cerdo (BLANCO 1973). Si bien no se han observado en las porciones periféricas en la concentración indicada por WARBRITTON y MCKENZIE (1937). Su porcentaje es inferior al señalado por MOLINA (1984) en corderos y similar al encontrado en cabritos por GÓMEZ *et al.* (1987). Las características tintoriales de las células GN se mantienen constantes independientemente del antisuero utilizado para su identificación. Son PAS positivas como observan HASSAN *et al.* (1981) y GUTTE y SEEGER (1987) en ovino y GÓMEZ *et al.* (1987) y NAVARRO *et al.* (1992) en cabra y se tiñen de azul con el tetracromo de Herlant y el Clevelan-Wolff. Esto sugiere que las diferencias descritas por TASSELL y KENNEDY (1972) frente al reactivo de Schiff y por MIKAMI y DAIMON (1968) y MOLINA (1984) con el tetracromo de Herlant, pueden ser debidas a la inclusión de otros tipos celulares como gonadotropas, al no utilizar técnicas inmunocitoquímicas para su identificación, dado que las células TSH y ACTH presentan características tintoriales simila-

res (NAVARRO *et al.* 1989, 1991).

Las células GN de los corderos tienen formas y tamaños semejantes a los encontrados por WARBRITTON y MCKENZIE (1937), HASSAN *et al.* (1981) y MOLINA (1984), que son similares en el caprino (GÓMEZ *et al.* 1987).

Las células marcadas con suero anti-FSH y anti-LH, previamente adsorbidas con las hormonas LH y FSH, respectivamente, presentan en los ultrafinos adyacentes las mismas características ultraestructurales. Esto no ha permitido diferenciar los dos tipos morfológicos clásicos de células FSH y LH descritos por KUROSUMI y OOTA (1968) basados en la existencia de dos poblaciones diferentes de gránulos de secreción y en la disposición del REG. Sólo se ha observado una población de gránulos de secreción esféricos, homogéneos y electrodensos, cuyo tamaño medio (250 nm) es similar al descrito por DACHEUX y DUBOIS (1978). Sin embargo se ha observado la disposición del REG en cisternas estrechas y paralelas, y en forma de cisternas dilatadas. Esta variabilidad en la disposición del REG ha sido descrita en la cabra (GÓMEZ *et al.*, 1987), con la denominación de tipo GN I a la célula con el REG en forma de cisternas estrechas y paralelas y tipo GN II cuando se dispone en cisternas dilatadas. Representarían, según NAVARRO *et al.* (1992), distintos aspectos de su actividad funcional, al variar la frecuencia de un tipo u otro según la fase del ciclo reproductor en la cabra.

Otra característica morfológica de las células GN es la abundancia de lisosomas de grandes dimensiones similares a los descritos en otras especies (DACHEUX 1978; DACHEUX y DUBOIS 1978; GÓMEZ *et al.* 1987; NAVARRO *et al.* 1992).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. A. Falagán (INIA) la ayuda prestada en la obtención de las muestras; a D. J. Sánchez la preparación de los cortes histológicos; a D. C. de Jódar la ayuda técnica prestada; y al personal del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Murcia el apoyo técnico en la parte ultraestructural.

BIBLIOGRAFÍA

- BARNETT, R. J., LADMAN, A. J., McALLISTER, N. J., SIPERSTEIN, E. R. 1956. Localization of glycoprotein hormones in the anterior pituitary glands of rats investigated by differential protein solubilities, histological stains and bioassays. *Endocrinology* 59: 398-418.
- BATTEN, T. F. C., HOPKINS C. R. 1978. Discrimination of LH, FSH, TSH, and ACTH in dissociated porcine anterior pituitary cells by light and electron microscope immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 192: 107-120.
- BLANCO, A. 1973. Estructura y ultraestructura de la adenohipófisis del cerdo. *Arch. Zootec.* 22: 103-138.
- CHILDS, G., ELLISON, D. 1980. A critique of the contributions of immunoperoxidase cytochemistry to our understanding of pituitary cell function, as illustrated by our current studies of gonadotropes, corticotropes, and endogenous pituitary GnRH and TRH. *Histochemical J.* 12: 405-418.
- DACHEUX, F. 1978. Ultrastructural localization of gonadotropic hormones in the porcine pituitary using the immunoperoxidase technique. *Cell Tissue Res.* 191: 219-232.
- DACHEUX, F., DUBOIS, M. P. 1978. LH-producing cells in the ovine pituitary. An electron microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 188: 449-463.
- DADA, M.O., CAMPBELL, G.T., BLAKE, C.A. 1983. A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohipophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 113: 970-984.
- DADA, M.O., CAMPBELL, G.T., BLAKE, C.A. 1984. The localization of gonadotroph in normal adult male and female rats. *Endocrinology* 114:397-406.
- DUBOIS, M. P., HERLANT, M. 1968. Caracteres cytologiques des cellules gonadotropes, thyrotropes, corticotropes, somatotropes et des cellules a prolactine presentes dans le lobe anterieur de l'hypophyse des bovins. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8: 5-26.
- GÓMEZ, M.A., NAVARRO, J.A., BERNABÉ, A., SÁNCHEZ, J., CARRASCO, L., SIERRA, M.A. 1987. Estudio citológico, inmunocitoquímico y ultraestructural de la *Pars distalis* adenohipofisaria de cabritos (*Capra hircus*): células gonadotropas. *An. Vet. (Murcia)*3:29-42.
- GÓMEZ, M.A., NAVARRO, J.A., CAMARA, P., SÁNCHEZ, J., SIERRA, M.A., BERNABÉ, A. 1989. Cytological, immunocytochemical and ultrastructural study of GH Cell of *Pars distalis* adenohipofisaria of kids (*Capra hircus*). *Anat. Histol. Embryol.* 18: 165-176.
- GROSS, D. S. 1984. The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 283-298.
- GROSS, D. S., TURGEON, J. L., WARING, D. W. 1984. The ovine pars tuberalis: A naturally occurring source of partially purified gonadotropes which secrete luteinizing hormone in vitro. *Endocrinology* 114: 2084-2091.
- GUTTE, V.G., SEEGER, J. 1987. Zur Histologischen Differenzierung der Hypophysenvorderlappenzellen beim Schaf (*Ovis aries* L.). *Mh. Vet. Med.* 42: 465-468.
- HASSAN, A.H.S., KAMEL, G., EL-HOMMOSI, F.F. 1981. The effect of zearanol implantation on some endocrine glands and gonads in fat-tailed lambs. 1981. *Z. Mikrosk. Anat. Forsh., Leipzig* 95: 634-646.
- HERLANT, M. 1960. Etude critique de deux techniques nouvelles destinée a mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. Microsc. Appl.* 10:37-44.
- HSU, S.M., RAINE, L. 1981. Protein A, Avidin, and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 1349- 1353.
- INOUE, K., KURUSUMI, K. 1984. Ultrastructural immunocytochemical localization of LH and FSH in the pituitary of untreated male rat. *Cell Tissue Res.* 285: 77-83.
- INOUE, K., HAGINO, N. 1984. Comparative immunocytochemical demonstration of ACTH-, LH- and FSH-containing cells in the pituitary of neonatal, immature and adult rats. *Cell Tissue Res.* 235: 71-75.

- KUROSUMI, K., OOTA, Y. 1968. Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary glands of persistent estrous and diestrous rats. *Z. Zellforsch.* 85: 34-46.
- MIKAMI, S., DAIMON, T. 1968. Cytological and cytochemical investigations of the adenohypophysis of the sheep. *Arch. Histol. Jap.* 29:427-445.
- MOLINA, M., 1984. Estudio histológico de las células gonadotropas de la adenohipófisis de corderos de raza Merina tratados con estradiol y acetato de trenbolona. *INIA, anales serie ganadera* 20: 57-63.
- MORIARTY, G.C. 1975. Electron microscopic-immunocytochemical studies of rat pituitary gonadotrophs: A sex difference in morphology and cytochemistry of LH cells. *Endocrinology* 97: 1215-1225.
- MUNUERA, I. 1986. Contribución al estudio morfológico de las células gonadotropas en ratas Wistar macho tras la inoculación de GnRH. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- NAKAMURA, F., TAYA, K., SASAMOTO, S., YOSHIMURA, F. 1985. Relationship between characteristics of immunoreactive FSH/LH cells and the levels of gonadotropin in the female rat. *Acta Anat.* 124:104-110.
- NAKANE, P.K. 1975. Identification of anterior pituitary cells by immunoelectronmicroscopy. En: *The anterior pituitary*, pp 45-61 Eds.: TIXIER-VIDAL, A., FARQUHAR, N.G. Academic Press, New York. 283 pp.
- NAVARRO, J.A., GÓMEZ, M.A., BERNABÉ, A., GÓMEZ, S., SÁNCHEZ, J., RODRIGUEZ, J. 1989. Estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de las células TSH de cabras (*Capra hircus*) en anestro, gestación y producción lactea. *An. Vet. (Murcia)*. 5: 35-44.
- NAVARRO, J.A., GÓMEZ, M.A., GÓMEZ, S., SÁNCHEZ, J., BERNABÉ, A. 1991. Structure and ultrastructure of adrenocorticotrophic hormone cells in goats in anoestrus, gestation and milk production. *Acta Anat.* 140: 163-168.
- NAVARRO, J.A., GÓMEZ, M.A., BERNABÉ, A., GÓMEZ, S., SÁNCHEZ, J., 1992. Structural and ultrastructural modifications of adenohypophysial gonadotropic cells in goat (*Capra hircus*) in anoestrus, gestation and milk production. *Histol. Histopath.* 7:379-384.
- OSAMURA, R.Y. 1983. Histology, ultrastructure and immunocytochemistry. En: *Endocrine System*, pp 121-129. Eds.: JONES, T.C., MOHR, U., HUNT, R.D. Springer-Verlag, Berlín. 366 pp.
- RACADOT, J. 1962. Les types cellulaires du lobe anterior de l'hypophyse des mammifères. *Biol. Med.* 51: 166-171.
- RICHARDSON, B.A. 1981. Localization of gonadotrophic hormones in the pituitary gland of the California leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *Cell Tissue Res.* 220:115-123.
- SABATINI, D. D., BENSCH, K., BARNETT, R. J. 1962. New means of fixation for electron microscopy and histochemistry. *Anat. Rec.* 142: 274.
- SHIRASAWA, N., KIHARA, H., YOSHIMURA, F. 1985. Fine structural and immunohistochemical studies of goats adenohypophysial cells. *Cell Tissue Res.* 240: 315-321.
- SINGH, Y., DHINGRA, L.D. 1979. Morphogenesis of the hypophysis cerebri in goat. 4. *Pars distalis* and *Pars infundibularis* adenohypophysis. *Indian J. Anim. Sci.* 49: 1067-1075.
- TASSELL, R., KENNEDY, J. P. 1972. Tinctorial differentiation of the cell types in the pars anterior of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 1249-1257.
- TOUGARD, C., PICART, R., TIXIER-VIDAL, A. 1980. Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 101-114.
- Van NOORDEN, S., STUART, M.C., CHEUNG, A., ADAMS, E.F., POLAK, J.M. 1986. Localization of human pituitary hormones by multiple immunoenzyme staining procedures using monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 287-292.
- WANSON, J.C., DROCHMAN, P. 1968. Epoxy technique inclusion for electron microscopy. *Cell Biol.* 38:130.
- WARBRITTON, V., MCKENZIE, F.F. 1937. The pituitary glands of ewes in various phases of reproduction. *Res. Bull.* 257: 3-59.