

ESTUDIO ESTRUCTURAL, INMUNOCITOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS GH DE CORDERO (*Ovis aries* L.)

Structural, immunocytochemical and ultrastructural study of GH cells of lamb (*Ovis aries* L.)

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

U. D. Histología y Anatomía Patológica. Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Producción Animal. Universidad de Murcia. Espinardo, 30071 Murcia.

Recibido: 23 octubre 1989

Aceptado: 26 abril 1990

RESUMEN

Se estudia la estructura y ultraestructura de las células GH de la adenohipófisis de 12 corderos (6 machos y 6 hembras). En microscopía óptica se han utilizado técnicas de tinción e histoquímicas (tetracromo de Herlant, PAS, PAS-OG, AA-PAS-OG y Cleveland-Wolfe) contrastadas mediante inmunomarcaje con el método complejo avidina-biotina (ABC). La identificación ultraestructural de las células se ha basado en la comparación de cortes semifinos inmunomarcados con la técnica peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) adyacentes a ultrafinos. Las células GH representan el 15-20% del total de células glandulares adenohipofisarias y se distribuyen en corte sagital por toda la *Pars distalis* (PD), excepto en la franja que cruza en sentido antero-caudo-dorsal. Tienen un tamaño medio estimado de 12,7 μm en machos y 14,3 μm en hembras. Presentan, como característica ultraestructural, gránulos de secreción esféricos, muy electrodensos y de 290,99 nm de diámetro.

Palabras clave: Células GH, inmunocitoquímica, *Pars distalis*, adenohipófisis, cordero.

SUMMARY

The distribution, structure and ultrastructure of cells containing GH hormone were investigated in lamb pituitary glands using avidin biotin peroxidase complex method (ABC) on paraplasm sections and peroxidase antiperoxidase complex method (PAP) on semithin sections contrasted by light microscopy and then studied in electron microscopy. GH cells account for 15-20% of adenohipophyseal glandular cells and are distributed into the whole *Pars distalis* (PD), except in the antero-caudo-dorsal fringe which run across the PD in saggital cut. Their size is 12,7 μm and 14,3 μm in males and females, respectively. Ultrastructurally they are characterized by very electrodense secretory spherical granules of 290,99 nm in diameter.

Key words: GH cell, immunocytochemical, *Pars distalis*, adenohipophysis, Pituitary, lamb.

INTRODUCCIÓN

Las células productoras de la hormona del crecimiento son orangófilas y PAS negativas (MIKAMI y DAIMON, 1968). Se consideraban las típicas células acidófilas (HERLANT, 1973). Ultraestructuralmente, presentan gránulos de secreción muy electrodensos y homogéneos con un tamaño de 290 nm (ALEXANDER et al., 1973), si bien estas características son insuficientes para diferenciarlas de las células PRL (PARRY et al., 1978, 1979).

Existen pocos trabajos que relacionen las características tintoriales e histoquímicas a nivel estructural (ORTMAN, 1987) o a nivel ultraestructural (PARRY et al., 1978, 1979) con técnicas inmunocitoquímicas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es el estudio de las características histoquímicas, estructurales, ultraestructurales y morfométricas de las células GH identificadas mediante técnicas inmunocitoquímicas basadas en la aplicación del complejo avidina-biotina (ABC) y el sistema peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en cortes adyacentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material de estudio se han empleado las adenohipófisis de 12 corderos, machos (6) y hembras (6), de raza Segureña con un peso aproximado de 24 kgs en vivo. La metodología

utilizada es similar a la de GÓMEZ et al. (1987, 1989), si bien se aplicó la técnica ABC (HSU y RAINE, 1981) en cortes incluidos en parafina y para el estudio ultraestructural el método de la superimposición de NOGAMI y YOSHIMURA (1980) con la técnica PAP en los semifijos adyacentes a ultrafinos.

RESULTADOS

Estudio estructural

Las células marcadas con suero anti-GH constituyen el 15-20% de las células secretoras. Se distribuyen homogéneamente por toda la *Pars distalis*, preferentemente en la mitad dorsal y caudal y disminuyen en la porción rostro-caudodorsal (FIG. 1).

Estas células son PAS negativas y se tiñen de amarillo con el Cleveland-Wolfe, tetracromo de Herlant y PAS-OG (FIGS. 2, 3).

Generalmente se presentan aisladas y, en las porciones anteriores de la glándula, en grupos, a modo de "nidos" o de "empalizada" (FIGS. 1, 4).

Su forma es variable, encontrándose células esféricas u ovals en mayor número (FIG. 4). El tamaño medio estimado en los machos es de 12,7 μm de diámetro y en las hembras de 14,3 μm (CUADRO 1).

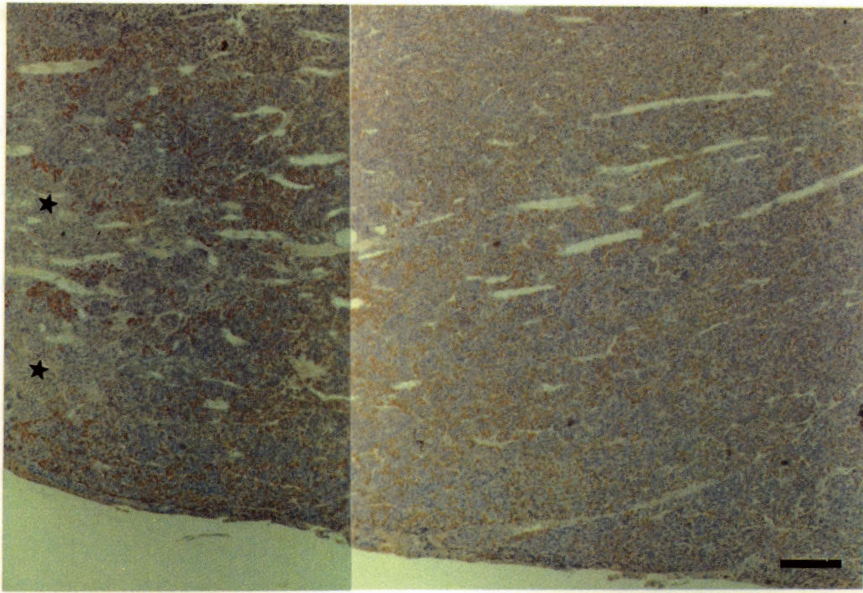
El núcleo, de forma esférica u ovoide, desplazado hacia un extremo, presenta escasa cro-

FIGURA 1. Corte sagital de la *Pars distalis*. Las células inmunomarcadas con suero anti-GHh presentan una distribución homogénea por toda la adenohipófisis dejando libre la porción anterior (estrellas). ABC. Barra = 100 μm .

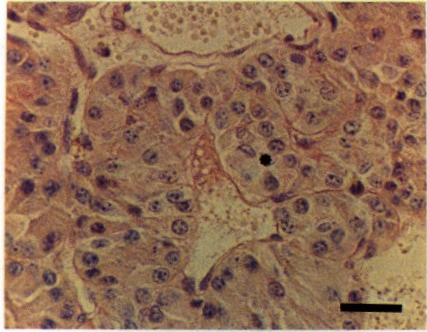
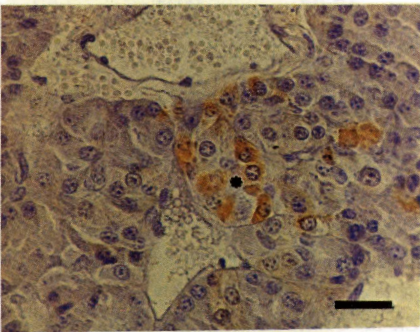
FIGURA 2 a, b. Cortes adyacentes teñidos con suero anti-GHh (a) y PAS (b). Las células somatotropas son PAS negativas (asterisco). ABC. Barra = 25 μm .

FIGURA 3 a, b. Cortes adyacentes teñidos con suero anti-GHh (a) y PAS-OG (b). Las células GH (flechas) se tiñen de amarillo con el PAS-OG. ABC. Barra = 25 μm .

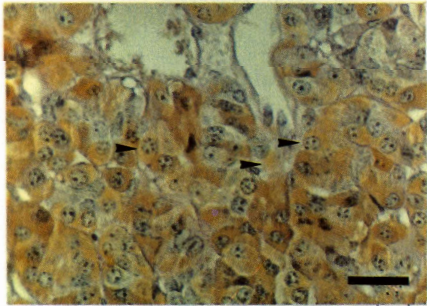
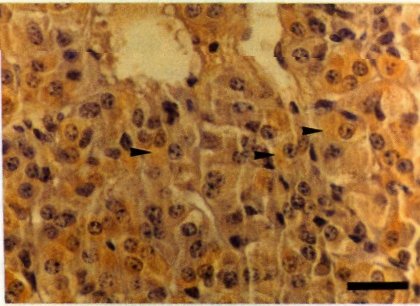
FIGURA 4 a, b. Cortes semifijos inmunomarcados con suero anti-GHh (PAP). Las células GH (a) se presentan aisladas (flechas) o agrupadas (b) en acinos (estrellas). PAP. Barra = 25 μm .



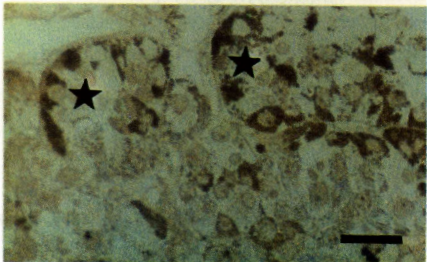
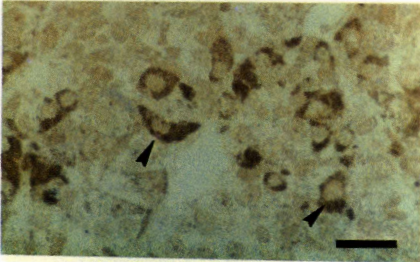
1



2ab



3ab



4ab

CUADRO I
 DIÁMETROS MEDIOS Y ESTADÍSTICOS DEL CITOPLASMA Y NÚCLEO DE LAS CÉLULAS
 GH DE CORDERO (MACHO Y HEMBRA) EN UM.

	X	S. D.	C. D.	S. E.	I. C.	
Macho	Citopl.	12,73	1,19	9,39	0,16	12,40-13,05
	Núcleo	7,08	0,73	10,44	0,01	7,02-7,13
Hembra	Citopl.	14,33	2,85	19,89	0,12	14,08-14,57
	Núcleo	7,61	0,98	12,93	0,04	7,52-7,69

matina. El tamaño medio es 7 μm de diámetro en los machos y 7,6 μm en las hembras (CUADRO 1).

El citoplasma presenta inmunorreacción homogénea, de tonalidad dorada con el ABC (FIGS. 2, 3), aunque las células que se encuentran en la línea dorsal tienen un color marrón oscuro.

Estudio ultraestructural

El núcleo, con escasa heterocromatina (FIG. 6), tiene forma redondeada u ovoide. Su envoltura es ligeramente dentada. En ocasiones, se observa un pequeño nucléolo generalmente excéntrico.

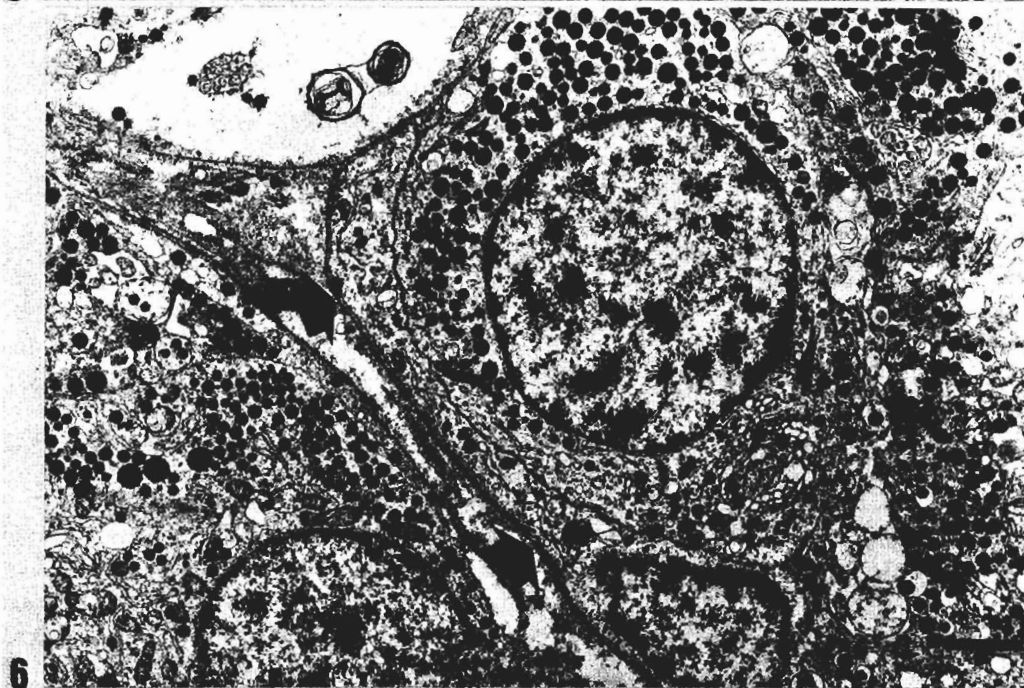
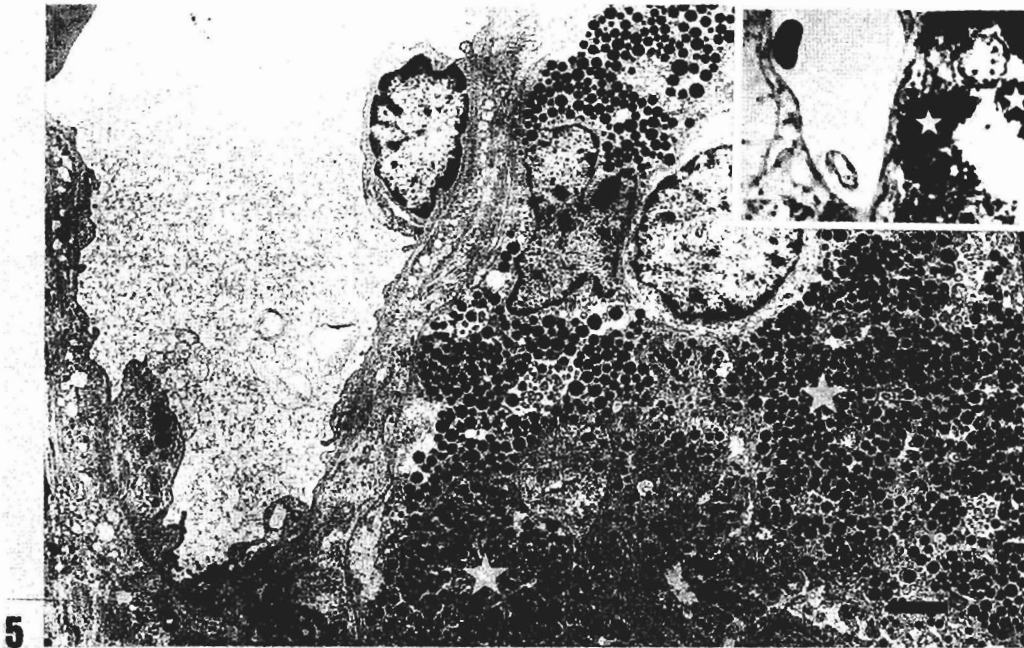
Estas células tienen una gran población de gránulos de secreción esféricos, muy electrodensos y distribuidos por todo el citoplasma,

con tendencia a acumularse en un polo de célula y orientados hacia la luz de los capilares (FIGS. 5, 6). A veces, se puede observar células con escasos gránulos, situados cerca de la membrana citoplasmática y en el centro de aquéllas. El diámetro medio estimado de los gránulos es de 290,99 nm (158,72-476,16 nm). En las células con gran abundancia de gránulos (FIG. 6), el retículo endoplásmico granular se encuentra escasamente desarrollado, constituido por estrechas cisternas, a veces sinuosas y ligeramente dilatadas, distribuidas por todo el citoplasma. En las células con escasos gránulos es más abundante, a modo de anillos, espirales o láminas, en la periferia celular y ocupando gran parte del citoplasma. A menudo se aprecian conexiones del retículo endoplásmico con la envoltura nuclear (FIG. 6).

El complejo de Golgi es amplio, dispuesto en dos o más complejos de localización yuxta-

FIGURA 5. Células GH inmunomarcadas con suero anti-GHh (estrellas) en la sección adyacente (detalle 1.000A). PAP. Barra = 2 μm .

FIGURA 6. Célula GH con abundantes gránulos de secreción polarizados hacia los capilares, complejo de Golgi (asterisco) y cilio de localización yuxtannuclear (punta de flecha). Barra = 2 μm .



CUADRO 2
 DIÁMETROS MEDIOS Y ESTADÍSTICOS DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN DE LAS
 CÉLULAS GH EN NM.

X	D. S.	C. D.	S. E.	I. C.
290,99	49,80	28,66	1,30	288,44-293,54

nuclear y con frecuentes imágenes de formación de gránulos.

Las mitocondrias son alargadas y estrechas, de 1,5 por 0,5 μm . Se encuentran en escaso número, distribuidas al azar o bien cerca del núcleo y próximas a la región del Golgi. La matriz es electrodensa y las crestas perpendiculares al eje mayor.

Los lisosomas, de 400 a 500 nm, son moderadamente electrodensos y escasos.

Algunas células GH presentan cuerpos multivesiculares, pequeñas vesículas moderadamente electrodensas distribuidas por todo el citoplasma, algunos microtúbulos y cilios (FIG. 6).

DISCUSIÓN

Las células GH manifiestan analogías tinto-riales con las observadas en la especie ovina (MIKAMI y DAIMON, 1968; HASSAN et al., 1981; MOLINA, 1984; ORTMAN, 1987), caprina (YAMAOKA, 1954; SINGH y DHINGRA, 1979) y bovina (DUBOIS y HERLANT, 1968; MIKAMI, 1970).

Las células GH aparecen repartidas por toda la glándula, de forma aislada o en grupos en la porción rostral, generalmente relacionadas con las células PRL, como indicaran PARRY et al. (1979) y TASSEL y KENNEDY (1972), entre otros. Se localizan preferentemente en la porción caudal y dorsal como describen TASSELL y KENNEDY (1972) y no en la porción anterodorsal como indica ORTMAN (1987).

El porcentaje que representan en el total de las células glandulares adenohipofisarias del

cordero es ligeramente inferior a los encontrados por HASSAN et al. (1981) y GUTTE y SEEGER (1987). En corderos de raza merina precoz MOLINA (1984) señala cifras muy superiores.

El predominio de las formas ovales y esféricas es descrito por DUBOIS y HERLANT (1968), MIKAMI (1970) y GUTTE y SEEGER (1987) en rumiantes, y no es raro el hallazgo de otras formas como las triangulares o columnares como indican WARBRITTON Y MCKENZIE (1937) y PARRY et al. (1978).

El tamaño celular medio estimado es similar al encontrado en cabritos (GÓMEZ et al., 1989) y en corderos (HASSAN et al., 1981), resultando las medidas, en general, inferiores a las halladas por MOLINA (1984) en corderos. El rango observado por WARBRITTON y MCKENZIE (1937) es similar al encontrado en este estudio.

Las medidas de los núcleos están próximas a las indicadas por WARBRITTON Y MCKENZIE (1937) en el ovino adulto y MOLINA (1984) en cordero, pero resultan ligeramente superiores a las descritas por ORTMAN (1987) en el carnero.

En consonancia con otras observaciones realizadas en la especie ovina (PARRY et al., 1978; DACHEUX, 1980; MOLINA, 1984) y caprina (SHIRASAWA et al., 1985; GÓMEZ et al., 1989), los gránulos tienen forma esférica y aparecen distribuidos por todo el citoplasma, con tendencia a polarizarse hacia la región opuesta al núcleo. El diámetro medio estimado del gránulo de secreción está cercano al reseñado por ALEXANDER et al. (1973). No se dis-

tinguen los diferentes tipos celulares que, atendiendo al tamaño de sus gránulos de secreción, ha diferenciado NAVARRO (1987) en la cabra y KUROSUMI et al. (1986, 1988) en la rata.

El retículo endoplásmico granular presenta analogías morfológicas con las estudiadas en ganado caprino (SHIRASAWA et al. 1984, 1985; NAVARRO, 1987; GÓMEZ et al., 1989).

El complejo de Golgi y las mitocondrias no manifiestan diferencias apreciables con respecto a otras observaciones realizadas en la especie ovina (PARRY et al., 1978, 1979).

Como ya describieran GÓMEZ et al. (1989) en cabritos, los cilios y los cuerpos multivesiculares también se evidencian en las células GH de los corderos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a D. A. Falagan (INIA) la ayuda prestada en la obtención de las muestras; a D. M. Orenes y a D. J. Sánchez la preparación de los cortes histológicos; y al personal del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Murcia que ha hecho posible la elaboración de la parte ultraestructural.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEXANDER, D. P.; BRITTON, H. G.; CAMERÓN, E.; NIXON, C. L.; FOSTER, D. A. 1973. Adenohypophysis of foetal sheep: correlation of ultrastructure with functional activity. *J. Physiol (Lond.)*, 230: 10-13.
- DACHEUX, F. 1980. Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* 207: 277-286.
- DUBOIS, M. P.; HERLANT, M. 1968. Caractères cytologiques des cellules gonadotropes, thyreotropes, 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.; CÁMARA, P.; FERNÁNDEZ, A. J.; GÓMEZ, J. C. 1987. Estudio citológico, inmunocitoquímico y ultraestructural de la pars distalis adenohipofisaria de cabritos (*Capra hircus*): células ACTH. *An. Vet. (Murcia)*. 3: 17-28.
- GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; CÁMARA, P.; SÁNCHEZ, J.; SIERRA, M. A.; BERNABÉ, A. 1989. Cytological, immunocytochemical and ultrastructural study of GH cells of *pars distalis* adenohipophysaria of kids (*Capra hircus*). *Anat. Histol. Embryol.* 18: 165-176.
- 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. Forsch., Leipzig* 95: 634-646.
- HSU, S. M.; RAINE, L. 1981. Protein A, Avidin, and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 1,349-1,353.
- KUROSUMI, K.; KOYAMA, T.; TOSAKA, H. 1986. Three types of growth hormone cells of the rat anterior pituitary as revealed by immunoelectron microscopy using a colloidal gold antibody method. *Arch. Histol. Jap.* 49: 227-242.
- MIKAMI, S. 1970. Light and electron microscopic investigations of six types of glandular cells of the bovine adenohipophysis. *Z. Zellforsch.* 105: 457-482.
- MIKAMI, S.; DAIMON, T. 1968. Cytological and cytochemical investigations of the adenohipophysis of the sheep. *Arch. Histol. Jap.* 29: 427-445.
- MOLINA, M. 1984. Estudio histológico de las células TSH, STH, ACTH y LTH de la adenohipofis de corderos de raza Merina tratados con estradiol y acetato de trenbolona. INIA, *Anales serie Ganadera* 20: 27-55.
- NAVARRO, J. A. 1987. Modificaciones de la *pars distalis* adenohipofisaria de cabra Murciano-granadina en anestro, gestación y producción láctea: Estudio inmunocitoquímico y ultraestructural. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- NOGAMI, H.; YOSHIMURA, F. 1980. Prolactin immunoreactivity of acidophils of the small granule type. *Cell Tissue Res.* 211: 1-4.

- ORTMAN R. 1987. A correlative immunochemical and cytological study of the two types of acidophils in the anterior lobe of the pituitary of the ram. *Z. Mikros.-Anat. Forsch.* 101: 962-972.
- PARRY, D. M.; McMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S.; THORBURN, G. D. 1979. Immunocytochemical localisation of prolactin and growth hormone in the perinatal sheep pituitary. *Cell Tissue Res.* 197: 501-514.
- PARRY, D. M.; McMILLEN, I. C.; WILLCOX, D. L. 1978. Immunocytochemical localisation of prolactin and growth hormone in the ovine pituitary. *Cell Tissue Res.* 194: 327-336.
- 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 goats. 4. *Pars distalis* and *pars infundibularis adenohypophysis*. *Indian J. Anim. Sci.* 49: 1.067-1.075.
- TASSELL, R.; KENNEDY, J. P. 1972. Tinctorial differentiation of the cell types in the pars anterior of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 1.249-1.257.
- WARBRITTON, V.; McKENZIE, F. F. 1937. The pituitary glands of ewes in various phases of reproduction. *Res. Bull.* 257: 3-59.
- YAMOAKA, M. 1954. Cytological studies on the acidophils of the anterior pituitaries of cattle, goats and pig. *J. Fac. Agr. Kyush. Univ.* 14: 449-454.