

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS TSH DE CABRAS (*Capra hircus*) EN ANESTRO, GESTACIÓN Y PRODUCCIÓN LÁCTEA

Immunocytochemical and ultrastructural study of TSH cells of goat (*Capra hircus*) in anoestrus, gestation and milk production

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

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Producción Animal. Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30071 Murcia.

* Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Unidad Docente de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14005 Córdoba.

Recibido: 2 junio 1989

Aceptado: 13 noviembre 1989

RESUMEN

Se estudian las características estructurales y ultraestructurales de las células TSH adenohipofisarias de cabras en anestro, gestación y producción láctea. Para la identificación de las células se han utilizado técnicas de tinción e histoquímicas contrastadas con la técnica inmunocitoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en cortes de 3-4 μm . en paraplást. Además, se realizaron mediciones de las células, de sus gránulos de secreción, mitocondrias y lisosomas con un analizador de imagen semiautomático (IBAS 1). Las células TSH son las menos abundantes de la adenohipófisis y tienen un tamaño de 13,8 μm . en anestro. Aumentan en número durante la gestación, y durante la producción láctea disminuyen de tamaño. Presentan gránulos de pequeñas dimensiones (146-159 nm.), que se distribuyen preferentemente en las porciones periféricas del citoplasma. El retículo endoplásmico se dispone en forma de estrechas cisternas que se dilatan durante la gestación y, sobre todo, durante la producción láctea. En esta última fase ocurre una disminución en el número de gránulos, que aparecen a menudo rodeados de un halo claro que separa el contenido de la membrana.

Palabras clave: Células TSH. *Pars distalis*. Inmunocitoquímica. Ultraestructura. Cabra.

SUMMARY

It has been studied the structural and ultrastructural characteristics of adenohipophyseal TSH cells of goats in anoestrus, gestation and milk production. TSH cells have been identified using staining and histochemical methods and immunocytochemical techniques (PAP). This allows studies of cellular size and shape and secretory granules with a semi-automatic image analyzer (IBAS 1). TSH cells are the less abundant in the adenohipophysis and are sized 13,8 μm in diameter in anoestrus. They increase in number during gestation and during milk production decrease in size. They show small secretory granules (146-159 nm) mostly located at the periphery of the cytoplasm. The granular endoplasmic reticulum is found forming narrow cisternae which become widened during gestation, and above all, during milk production. In this last stage there is a decrease in the number of granules frequently surrounded by a clear halo which separates the content from the membrane.

Key words: TSH cells. *Pars distalis*. Immunocytochemical. Ultrastructure. Goat.

INTRODUCCIÓN

Han sido numerosos los trabajos dedicados a la descripción ultraestructural de las células TSH en especies de laboratorio y otros animales domésticos. En la mayoría de estos trabajos hay coincidencia en que son las células con los gránulos de secreción más pequeños de toda la adenohipófisis, midiendo 80-150 nm en hombre (von LAWZEWITSCH et al., 1972); 100-150 nm en la rata (SEINCHS y ROMMLER, 1978; TOUGARD et al., 1980) o menos de 100 nm (YASHIRO et al. 1981); 200 nm en cerdo (BLANCO 1973) y cordero (MOLINA, 1984) y 300-400 nm en bóvidos (MIKAMI, 1970). En la cabra las células TSH han sido estudiadas ul-

traestructuralmente por SHIRASAWA et al. (1985) en machos y por GÓMEZ et al. (1989) en cabritos, siendo para ambos también sus gránulos los más pequeños de las células adenohipofisarias, midiendo 149 nm y 195 nm respectivamente.

Con el presente trabajo pretendemos estudiar las características estructurales y ultraestructurales de las células TSH en cabras adultas y sus posibles modificaciones en anestro, gestación y producción láctea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material de estudio se utilizaron las

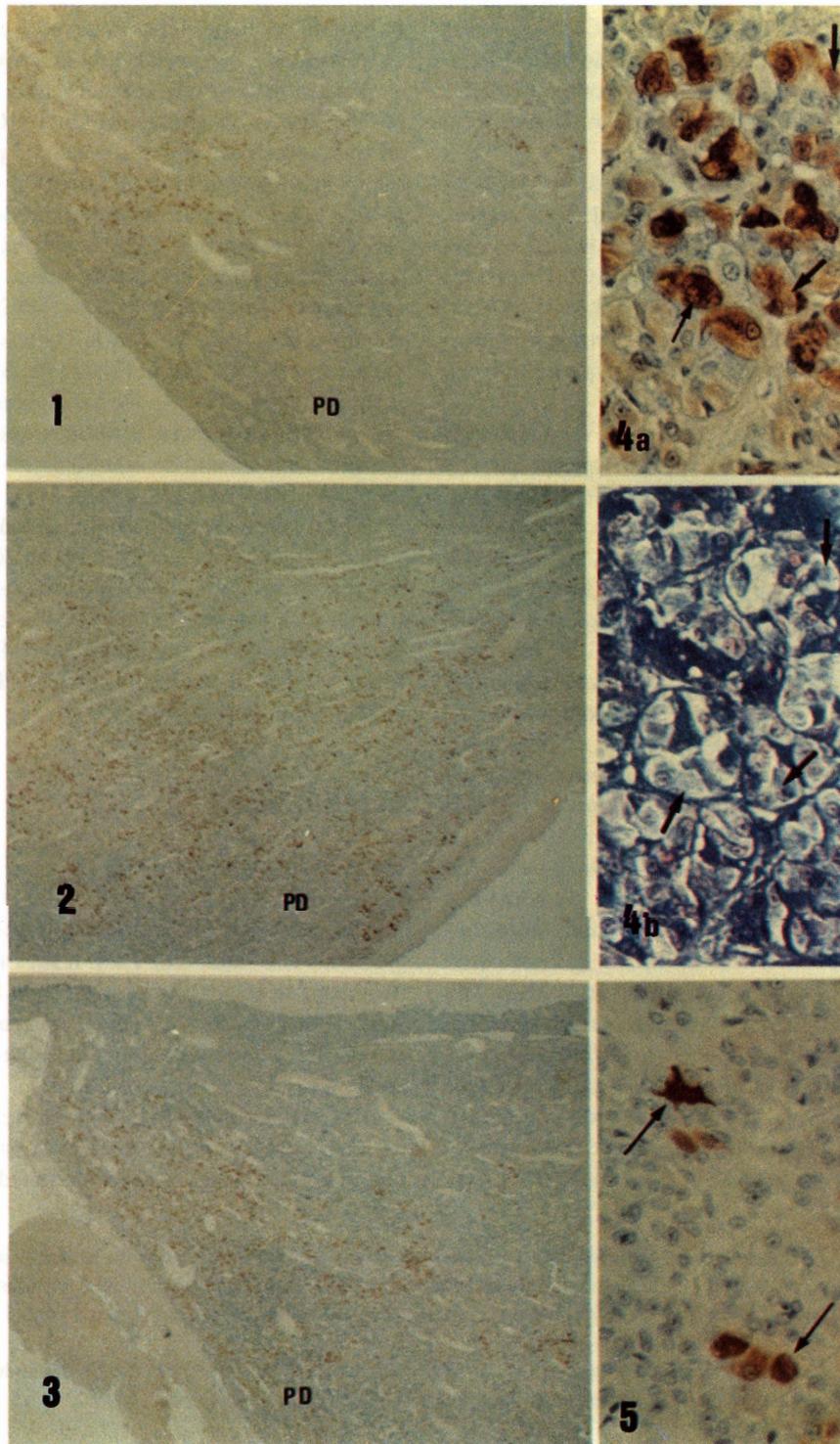
FIGURA 1. Distribución de las células TSH en las zonas ventrales y centrales de la mitad craneal de la *Pars distalis* (PD) de cabras en anestro, estando en escaso número. Suero anti-TSHh. X 31.5.

FIGURA 2. Distribución de las células TSH en la *Pars distalis* (PD) adenohipofisaria de cabras en gestación, donde se observa un incremento en el número de células inmunomarcadas con suero anti-TSHh, respecto a la figura anterior. X 31.5.

FIGURA 3. Distribución de las células TSH en la *Pars distalis* (PD) de cabras en producción láctea, con un número intermedio de células inmunomarcadas con suero anti-TSHh respecto a las figuras precedentes. X. 31.5.

FIGURA 4 a, b. Cortes adyacentes de adenohipófisis de cabras en anestro teñidos con suero anti-TSH (a) y AA-PAS-OG (b) donde las células TSH se tiñen de azul (flechas). X. 700.

FIGURA 5. Células inmunomarcadas con suero anti-TSHh de cabras en anestro inmunoteñidas con suero anti-TSH (flechas) presentando formas variables, redondeadas o estrelladas (flechas). X. 700.



adenohipófisis de 15 cabras (*Capra hircus*) multíparas de 3-5 años de edad, de raza Murciano-granadina, que se distribuyeron en tres lotes (anestro, gestación y producción láctea) de 5 animales cada uno.

Las muestras fueron obtenidas tras eutanasia de los animales con Pentotal. Una vez extraída la adenohipófisis se procede a su sección en dos mitades por su plano sagital. Una de las mitades se fijó en líquido de GERARD (GABE, 1968) para el estudio con el microscopio óptico y la otra en glutaraldehído al 5% para el estudio ultraestructural.

Tras la fijación en líquido de GERARD (GABE, 1968) como fijador especial para la conservación de los gránulos de secreción hormona, las piezas se incluyeron en paraplast, realizándose cortes de 3 a 4 μm , sobre los que posteriormente se practicaron de forma alternativa técnicas de tinción (Hematoxilina-eosina, PAS, azul Alcían-PAS-Orange G y Cleveland-Wolfe (GABE, 1968)) y de marcaje inmunocitoquímico (PAP) según la metodología seguida en un trabajo previo (GÓMEZ et al., 1987), utilizándose como anticuerpo primario suero anti-hormona TSH humana (fracción Ig G de conejo, prediluido en Tris buffer 0,05 pH 7,6 —DAKO—) empleándose en diluciones 1:250 y 1:500 e incubándose durante 3 y 4 horas respectivamente a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizaron Ig G de cerdo contra Ig G de conejo diluidas en 0,05 M Tris buffer, pH 7,6 y posteriormente un complejo PAP desarrollado en conejo (DAKO). El revelado se realizó con DAB (3,3'-diamino-bencidina tetrachloride. SIGMA). Fueron así mismo aplicados los controles inmunocitoquímicos recomendados por CHILDS y ELLISON (1980),

utilizando secciones adyacentes para evaluar la especificidad y sensibilidad de la reacción.

Para el estudio ultraestructural las adenohipófisis fijadas en glutaraldehído se dividieron en tres porciones: anterior, media y posterior, tomándose las muestras de la región central y periférica de cada una de las porciones anteriores, y posteriormente refijadas en glutaraldehído al 5% en solución tampón fosfato según el proceder de SABATTINI et al. (1962), procediéndose, tras la fijación, a la inclusión de las piezas en EPON según la técnica de WANSON y DROCHMAN (1968). De los bloques obtenidos se realizaron cortes ultrafinos que se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963).

El estudio morfométrico del tamaño celular y de los gránulos de secreción se realizó directamente de los cortes histológicos y de las electronografías respectivamente mediante un analizador de imágenes semiautomático IBAS I, de forma similar al realizado por GÓMEZ et al. (1987) en un trabajo previo.

RESULTADOS

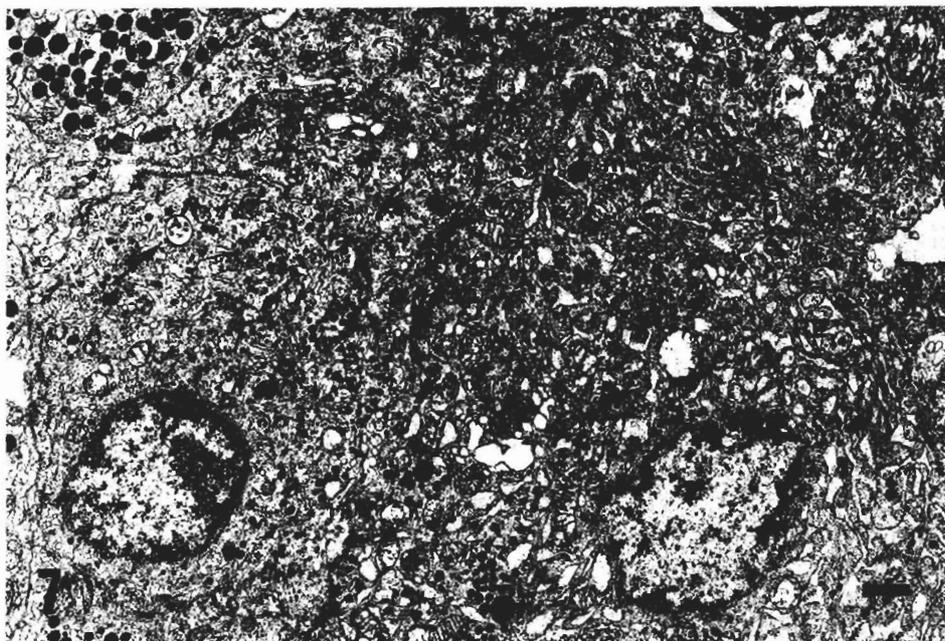
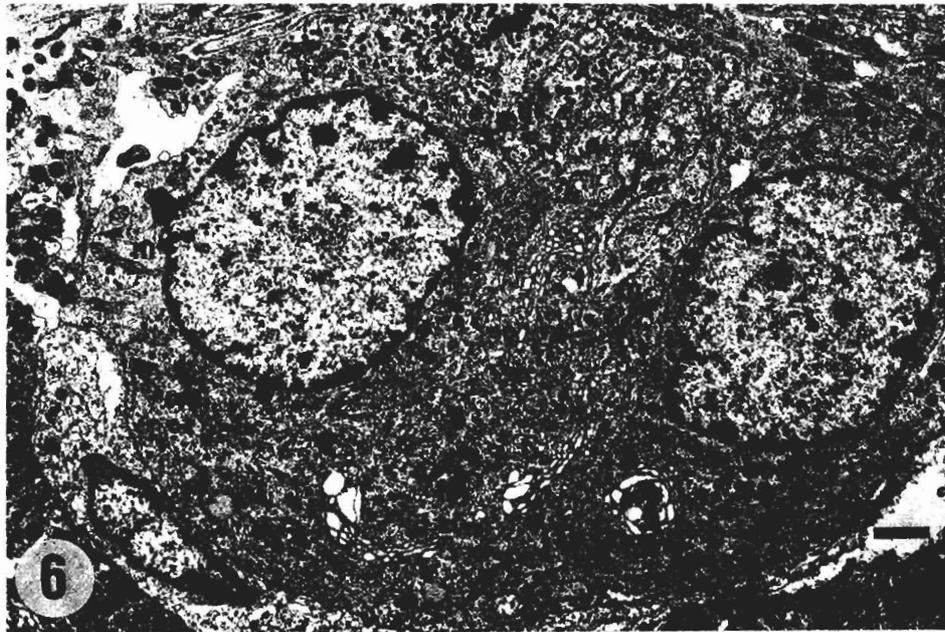
Observaciones microscópicas

En cabras en gestación las células inmunomarcadas con suero anti-TSH, reaccionan positivamente en cortes adyacentes con el PAS y el Azul Alcían (AA), tiñéndose de azul con el AA-PAS-Orange G y el Cleveland-Wolfe (FIG. 4).

Las células anti-TSH positivas se encuentran en escaso número y distribuidas en las porciones central y ventral de la mitad anterior

FIGURA 6. Células TSH de cabra en anestro, donde se observan escasos gránulos en la periferia, retículo endoplásmico granular dispuesto a modo de cisternas aplanadas (RE). Complejo de Golgi (G) desarrollado, mitocondrias (m) y complejos de unión (punta de flecha) con las células vecinas. Barra = 1 μm .

FIGURA 7. Células TSH de cabra en anestro, con ligera dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico granular (RE), mitocondrias (m), lisosomas (L) y cuerpos multivesiculares (flecha). Barra = 1 μm .



de la glándula, pudiendo aparecer algunas periféricamente. Suelen disponerse aisladas y en las proximidades de los grandes vasos (FIG. 1).

Su morfología es muy variable: poligonal, ovoide, triangular y con procesos citoplasmáticos (FIG. 5), si bien, predominan las formas poligonales grandes. El tamaño medio es de 13.822 μm de diámetro. Los núcleos son redondeados, poco teñidos y tienen un nucléolo evidente.

En los animales en gestación hay un aumento de las células inmunomarcadas con suero anti-TSH (FIG. 2), con un diámetro medio de 13.452 μm y presentan pequeñas vacuolizaciones citoplasmáticas.

Durante la producción láctea hay una disminución del número de células inmunorreactivas, aunque continúan siendo más abundantes que en los animales en anestro (FIG. 3). Su tamaño medio es de 12.826 μm de diámetro.

Observaciones ultraestructurales

Las células TSH en anestro se caracterizan ultraestructuralmente por tener grandes núcleos centrales o polarizados, con tendencia a la esfericidad y escasa heterocromatina adosada en su mayor parte a la envoltura nuclear y a los nucleolos, que son generalmente centrales (FIG. 6). En el citoplasma aparecen escasos gránulos de secreción próximos a la membrana citoplasmática, si bien algunos de ellos se distribuyen por el citoplasma y más concretamente en el área de Golgi, desde donde se dirigen hacia la periferia. Presentan un diámetro medio estimado de 159 nm (FIG. 10), contenido homogéneo y de variable electrodensidad que a

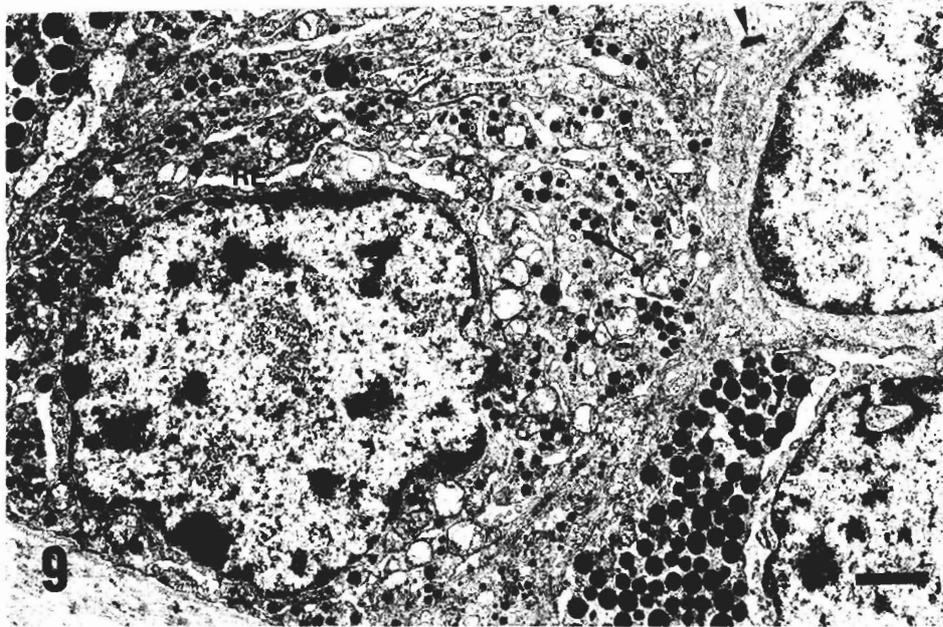
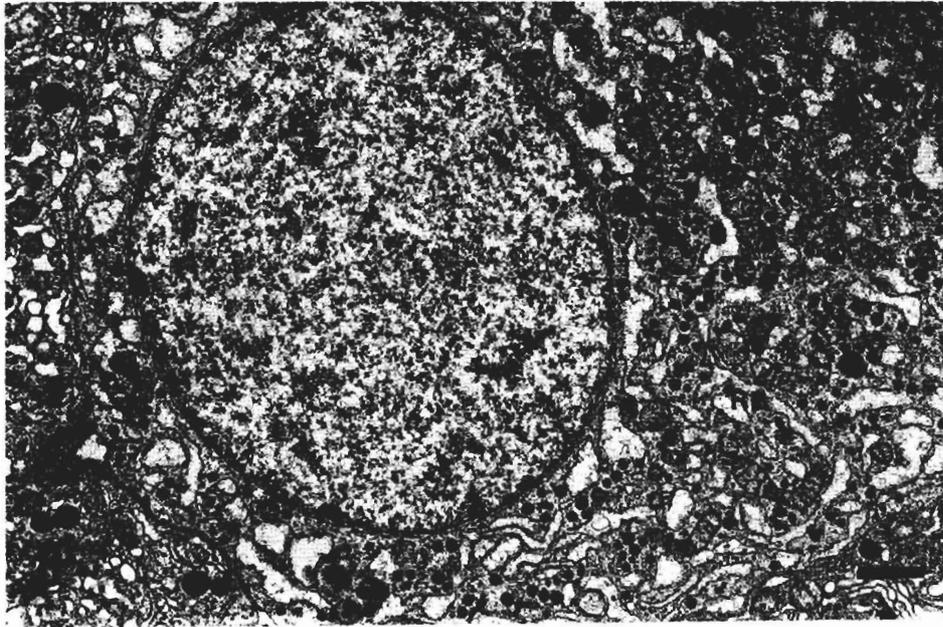
veces aparece separado de la membrana que lo envuelve por un halo claro. El retículo endoplásmico rugoso es abundante y se dispone en forma de estrechas cisternas dispersas por el citoplasma, tendiendo a menudo a agruparse en estratificaciones paralelas próximas a la membrana citoplasmática (FIG. 6); asimismo se pueden encontrar cisternas ligeramente dilatadas (FIG. 7). El complejo de Golgi, de situación yuxtannuclear, está constituido por cisternas dilatadas, con gran cantidad de microvesículas e imágenes de formación de gránulos. Las mitocondrias son muy abundantes alrededor del núcleo y en el área del Golgi y tienen forma alargada y matriz electrodensa. Se observa la presencia de abundantes cuerpos multivesiculares y lisosomas de contenido moderadamente denso a los electrones y un tamaño de 421 nm de diámetro medio (FIG. 7). Los complejos de unión entre las células TSH y las vecinas son frecuentes.

Durante la gestación no aparecen grandes diferencias en las células TSH con respecto a los animales en anestro. Los gránulos de secreción son similares a los descritos anteriormente, con un diámetro medio de 146 nm. Son frecuentes las dilataciones de las cisternas del retículo endoplásmico granular (FIG. 8). Los lisosomas, en menor número y tamaño, presentan una media estimada de 277 nm de diámetro (FIG. 11).

En producción láctea, las células TSH presentan algunas diferencias respecto a los lotes anteriores. Los núcleos son más irregulares, con menor tendencia a la esfericidad y más electrodensos (FIG. 9). El citoplasma presenta con mayor frecuencia una morfología irregular y hay una disminución en el número de gránulos de

FIGURA 8. Célula TSH de cabra en gestación con gran desarrollo del retículo endoplásmico granular (RE) que presenta cisternas dilatadas e intercomunicadas y abundantes mitocondrias (m). Barra = 1 μm .

FIGURA 9. Célula TSH de cabra en producción láctea, con núcleo más irregular, gránulos de secreción con halo claro (flecha), cisternas dilatadas del retículo endoplásmico rugoso (RE) y complejos de unión (punta de flecha). Barra = 1 μm .



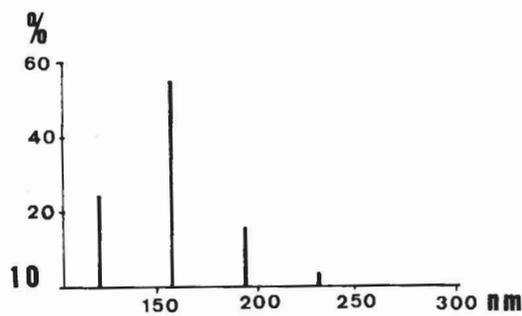


FIGURA 10. Distribución de frecuencias muestral de los gránulos de secreción de las células TSH de cabras en anestro.

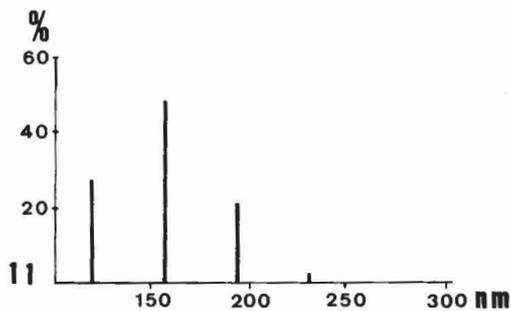


FIGURA 11. Distribución de frecuencias de los gránulos de secreción de las células TSH de cabras en gestación.

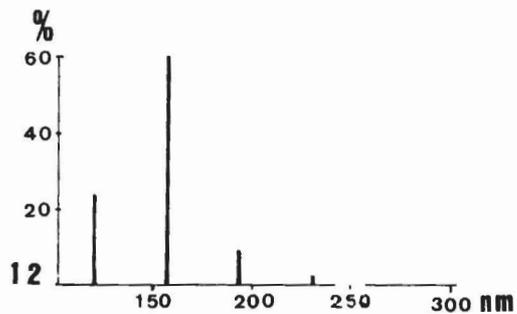


FIGURA 12. Distribución de frecuencias muestral de los gránulos de secreción de las células TSH de cabras en producción láctea.

secreción, con un tamaño medio de 153 nm (FIG. 12). Son abundantes las imágenes de exocitosis. El retículo endoplásmico granular está distribuido por todo el citoplasma, en forma de cisternas intercomunicadas entre sí, moderadamente dilatadas y con un contenido finamente granular y moderadamente electrodenso (FIG. 9). El complejo de Golgi está muy desarrollado y constituido por abundantes vesículas e imágenes de formación de gránulos. Hay una clara disminución de los lisosomas durante la producción láctea.

DISCUSIÓN

Las células inmunomarcadas con suero anti-TSH en la cabra, se caracterizan por presentar una intensa inmunorreacción y ser PAS y AA positivas al igual que ocurre en cabritos (GÓMEZ et al., 1989), corderos (MOLINA, 1984), oveja (MIKAMI Y DAIMOND, 1968; GUTTE y SEEGER, 1987) y cerdo (BLANCO, 1973).

Las características estructurales, coinciden en general con las descritas en la mayoría de las especies, siendo las células menos abundantes de la adenohipófisis de la cabra (NAVARRO, 1987), si bien hay un ligero aumento durante la gestación y producción láctea, más acusado en gestación. Tienden a disponerse de forma aislada, apareciendo más abundantemente en la porción craneal de la glándula, central y ventralmente. Presentan una morfología variable, encontrándose formas ovoides o poligonales, como las descritas por SINGH y DHINGRA (1979) en hembras y por SHIRASAWA et al. (1985) en machos, aunque también hemos encontrado formas irregulares con prolongaciones citoplasmáticas entre las células vecinas, como se han observado en otras especies (SEINCHS y ROMMLER, 1978; YASHIRO et al., 1981; YOSHIMURA et al., 1982) y en cabritos (GÓMEZ et al., 1989), que aparecen sobre todo en los animales en producción láctea. El tama-

ño medio de 13,8 μm de diámetro durante la fase de anestro es superior al dado por SINGH y DHINGRA (1979), pero próximo a los 14,5 μm de diámetro que tienen en cabritos jóvenes (GÓMEZ et al., 1989). Durante la gestación, prácticamente no se observan variaciones en el tamaño y, en cambio, durante la producción láctea hay una disminución del mismo (12,8 μm de diámetro) que puede ser debido a la morfología más irregular que adoptan las células en esta fase.

Ultraestructuralmente, las células TSH presentan núcleos de gran tamaño, con tendencia a la esfericidad y cromatina difusa, pudiéndose encontrar polarizados como ocurre en cabras (SINGH y DHINGRA, 1979), cabritos (GÓMEZ et al., 1989), corderos (MOLINA, 1984) y cerdo (DACHEUX, 1982), si bien no es raro observarlos en posición central.

Los gránulos de secreción son los de menor tamaño de todas las células adenohipofisarias de la cabra (NAVARRO, 1987), característica típica de las células TSH en todas las especies estudiadas, y en la que nos hemos basado para su identificación, presentando una media de 156 nm de diámetro, que no ofrece diferencias significativas en las tres fases estudiadas. Los gránulos de secreción, esféricos, aparecen por todo el citoplasma, pero son más abundantes en la periferia de las células como ha sido descrito en machos cabríos (SHIRASAWA et al., 1985), que a veces, particularmente en hembras en producción láctea aparecen rodeados de un halo claro que separa el contenido de la membrana que lo envuelve.

El retículo endoplásmico rugoso es muy abundante en este tipo celular, en donde se dispone en forma de cisternas aplanadas dispersas por el citoplasma y ordenadas paralelamente entre sí y con la membrana celular, de manera similar a las células TSH "típicas" descritas por GÓMEZ et al. (1989) en cabritos y YOSHIMURA et al. (1982) en la rata. A veces podemos encontrar ligeras dilataciones de estas cisternas, pero no es frecuente el observar las

denominadas células TSH "maduras" de YOSHIMURA et al. (1982) en cabras en anestro y gestación, sin embargo, durante la producción láctea es frecuente este tipo celular, donde destaca el retículo endoplásmico rugoso constituido por cisternas dilatadas y un contenido moderadamente denso a los electrones, mayor desarrollo del complejo de Golgi y una disminución del número de gránulos de secreción que son eliminados por exocitosis. Este hecho podría estar relacionado con una mayor actividad de las células TSH en fase de producción láctea. Así mismo la degranulación pudiera ser probablemente el motivo de la disminución del número de células inmunorreactivas en producción láctea, al no poder ser detectadas inmunocitoquímicamente por su bajo contenido hormonal. La demanda hormonal hace que no sea necesaria su metabolización por ello en esta fase se observa una disminución en el número y tamaño de los lisosomas.

AGRADECIMIENTOS

A D. M. Orenes y D. J. Sánchez por su asistencia técnica, a Dña. F. Calderón y M. García del Servicio de Microscopía Electrónica y a Dña. M. Iniesta por su colaboración en el estudio estadístico.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. 1982. Ultrastructural localization of thyrotropin (TSH) in the porcine anterior pituitary. A comparison between preembedding and postembedding methods. Cell Tissue Res. 222: 299-311.

- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. París. Masson.
- 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: 17-27.
- GÓMEZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; GÓMEZ, S.; CÁMARA, P.; GÓMEZ, J. C.; BERNABÉ, A. 1989. Cytological, immunocytochemical and ultrastructural study of the adenohipofiseal "pars distalis" of the kids (*Capra hircus*): TSH cells. Anat. Histol. Embryol. 18: 165-176.
- GUTTE Von G.; SEEGER, J. 1987. Zur histologischen Differenzierung der Hypophysenvorderlappenzellen beim Schaf (*Ovis aries L.*). Mh. Vet-Med. 42: 27-55.
- LAWZEWITSCH Von, I.; DICKMANN, G. H.; AMENUA, L.; PARDAL, C. 1972. Cytological and ultrastructural characterization of the human pituitary. Acta Anat. 81: 286-316.
- MIKAMI, S., 1970. Light and electron microscopic investigations of sic 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 adenohipofisis 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. Universidad de Murcia.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 209.
- SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARNETT, R. J. 1962. New means of fixation for electron microscopy and histochemistry. Anat. Rec. 142: 274.
- SEINSCH, W.; ROMMLER, A. 1978. Ultrastructural classification of the three different rat gonadotrophs after LH-RH stimulation. Anat. Histol. Embryol. 7: 300-310.
- SHIRASAWA, N.; KIHARA, H.; YOSHIMURA, F. 1985. Fine structural and immunohistochemical studies of goats adenohipophysial 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* adenohipophysis. Indian J. Anim. Sci. 49: 1.067-1.075.
- TOUGARD, C.; PICART, R.; TIXIER-VIDAL, A. 1980. Immunocytochemical localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary. J. Histochem. Cytochem. 28: 101-114.
- WANSON, J. C.; DROCHMAN, P. 1968. Epoxy technique inclusion for electron microscopy. Cell. Biol. 38: 130.
- YASHIRO, T.; NOGAMI, H.; YOSHIMURA, F. 1981. Immunohistochemical study of the postnatal development of pituitary thyrotrophs in the rat, with special reference to cluster formation. Cell Tissue Res. 216: 39-46.
- YOSHIMURA, F.; NOGAMI, H.; YASHIRO, T. 1982. Fine structural criteria for pituitary thyrotrophs in immature and mature rats. Anat. Rec. 204: 255-263.