

## HETEROGENEIDAD MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS PRL EN GANADO OVINO. INFLUENCIA DE LA EDAD Y EL SEXO

### Functional and morphological heterogeneity of PRL cells in ovine. Age and sex influences

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

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Tecnología de los Alimentos. Histología y Anatomía Patológica. Universidad de Murcia. Apdo. 4021. E-30071 Murcia, España. Telf.: 34.68.307100, ext. 2851, Fax: 34.68.364147. E-mail abernabe@fcu.um.es.

Recibido: 25 Marzo 1996  
Aceptado: 16 Septiembre 1996

#### RESUMEN

Se estudia la influencia de la edad y el sexo sobre las características morfofuncionales de las células PRL en ganado ovino de raza Segureña utilizando técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica así como con técnicas morfométricas y estereológicas. Las células PRL aumentan de número y tamaño con la edad y el sexo. Ultraestructuralmente se trata de una población celular heterogénea dependiendo del desarrollo del retículo endoplásmico granular y complejo de Golgi, así como del tamaño de los gránulos de secreción. En hembras impúberes existe una mayor actividad de síntesis hormonal, en tanto que en hembras adultas en reposo sexual se observa un 40% de células con signos evidentes de inactividad. En todos los animales predominan las células PRL tipo II.

*Palabras clave:* células PRL, inmunocitoquímica, *Pars distalis*, ganado ovino.

#### SUMMARY

Influence of age and sex about morphofunctional characteristics of PRL cells in ovine Segureña breed, is studied using immunocytochemical procedures for light and electron microscopy, and morphometric technique. PRL cells increase in number and size with age and sex. Ultrastructurally is a heterogeneous cellular population which depends of development of rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and granular size.

In prepuber females there is an increasing of hormonal synthetic activity. Forty per cent of cells of adult females have signs of inactivity. PRL type II cells predominate in all animals.

*Key words:* PRL cells, immunocytochemical, *Pars distalis*, ovine.

## INTRODUCCIÓN

Las células PRL se han identificado en diferentes especies, precisándose su localización y características estructurales y ultraestructurales en ganado ovino (PARRY *et al.*, 1978,1979; ORTAMN, 1987; GUTTE y SEEGER, 1987). La aplicación de técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica fue realizada por primera vez en esta misma especie por GÓMEZ *et al.* (1989). Sin embargo la heterogeneidad de este tipo celular sólo se ha puesto de manifiesto en la rata (NOGAMI, 1984) y ratón (HARIGAYA *et al.*, 1983; HARIGAYA y HOSHINO, 1985), mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica. En los animales domésticos la identificación de las células PRL con la técnica inmuno-oro coloidal sólo se ha realizado en ganado vacuno (INGRAM *et al.*, 1988) y caprino (SÁNCHEZ *et al.*, 1992) y ha permitido su diferenciación de otros tipos celulares con características ultraestructurales similares, como las células GH (SÁNCHEZ *et al.*, 1993) y células somatomotropas (SMT), estas últimas contienen hormona del crecimiento y prolactina (FUMAGALLI y ZANINI, 1975; HASHIMOTO *et al.*, 1987; THORPE *et al.*, 1990; SÁNCHEZ *et al.*, 1993).

Nos hemos propuesto estudiar la influencia de la edad y el sexo sobre la distribución, número, características estructurales, ultraestructurales y de almacenamiento de las células PRL en animales impúberes y adultos mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica y técnicas morfométricas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado las adenohipófisis de 12

ovinos de raza Segureña distribuidos en 2 grupos: I. 6 corderos impúberes (3 machos y 3 hembras) de 24 kg de peso y 3 meses de edad. II. 6 adultos, 3 hembras en anestro de 1 año de edad y 3 machos de 2 años de edad. Los animales fueron anestesiados con Pentotal® y se les practicó la perfusión de la cabeza por ambas carótidas a presión sistólica continua durante 15-20 min. Primero se introdujo la solución lavadora de Gonzales durante 1 min, 0.8 g de cloruro sódico + 0.4 g de dextrosa + 0.8 g de sacarosa + 1 g de nitrito sódico en tampón fosfato 0.12M, pH 7.4, y posteriormente la solución fijadora, 4% de paraformaldehído y 0.5% de glutaraldehído en tampón fosfato salino (PBS) 0.12M, pH 7.4. Una vez extraída la glándula, se seccionó en dos mitades por su plano sagital, utilizándose una para el estudio estructural y otra para el ultraestructural. Las muestras fueron obtenidas durante los meses de mayo y junio.

## Microscopía óptica

La mitad de cada glándula fue lavada durante 1 h en tampón cacodilato 0.2M, pH 7.2 con 1% de sacarosa, posteriormente refijada en líquido de Gerard e incluida en poliowax (Difco). De cada uno de los bloques se realizaron 60 cortes seriados de 3-4 µm sobre los que se realizó la técnica inmunocitoquímica avidina-biotina peroxidasa ABC (HSU y RAINE, 1981) mediante el tratamiento de las muestras con suero normal de cabra (Sigma) a una dilución 1:30 e incubación con suero anti-PRL ovina obtenida en conejo (UCB) diluido al 1:1000 en tris buffer salino (TBS), durante 60 min a 32°C. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de cerdo biotinado anti-IgG de conejo (Sigma) a una dilución 1:250. La reacción fue continuada con el

complejo ABC vectastain<sup>R</sup> (Vector) y se visualizó con diaminobencidina (Sigma).

### Microscopía electrónica

El resto de la glándula fue dividida en tres porciones: anterior, media y posterior, tomándose las muestras de las regiones central y periférica de cada una de las porciones y se fijaron por inmersión en glutaraldehído (3%) en PBS y se postfijaron en tetróxido de osmio (1%) durante 2 h a 0°C. Posteriormente se procedió a la deshidratación en una escala ascendente de alcoholes y óxido de propileno y se incluyó en Epon. De los bloques obtenidos se realizaron cortes ultrafinos de 30-40 nm montados sobre rejillas de níquel con una malla de 300 cuadrados. Para la realización de la técnica inmunocitoquímica doble del oro coloidal (ROTH, 1983) se procedió al pretratamiento de las muestras con una solución acuosa saturada de metaperiodato sódico (BENDAYAN y ZOLLINGER, 1983), incubación a 32°C de las siguientes soluciones en TBS: suero normal de cabra (Sigma), a una dilución 1:30 durante 20 min, IgG de conejo anti-GH ovina 1:1000 (UCB) durante 60 min, IgG de cabra anti-conejo unida a oro de 10 nm (1:40, Serva) durante 30 min. Las secciones ultrafinas se trataron con vapor de paraformaldehído durante 1 h a 60°C después de la primera inmunorreacción de acuerdo con la técnica de WANG y LARSSON (1985). La segunda inmunorreacción se completó utilizando como antisuero primario suero anti-PRL ovina a una dilución 1:5000 y diferente tamaño de la partícula de oro (20 nm). Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

En ambas técnicas se realizaron los siguientes controles inmunocitoquímicos de especificidad: (1) incubación con suero normal de conejo en vez del antisuero específico; (2) adsorción del antisuero específico con su correspondiente hormona homóloga, no existiendo inmunorreacción en ambos casos.

### Análisis morfométrico

La densidad numérica de las células PRL se calculó de forma manual a partir de imágenes proyectadas, de diez campos de 10.000  $\mu\text{m}^2$  por sección y cinco secciones por animal separadas una de otra 50  $\mu\text{m}$ . El área y diámetro celular, y la densidad numérica y diámetro de los gránulos de secreción se calcularon con un analizador de imágenes (IMCO 10 Kontron Bildanalyse) utilizando un software Microm Image processing (Microm, Spain). Para determinar el área y diámetro celular se emplearon 20 células inmunorreactivas elegidas al azar de cada animal de diferentes secciones, separadas unas de otras 50  $\mu\text{m}$ . Para calcular el diámetro y la densidad numérica ( $N_v$ ) de los gránulos de secreción se eligieron al azar 20 micrografías de células PRL enteras por cada animal a una magnificación final de 24.800 aumentos. La  $N_v$  fue estimada de acuerdo con el método de WEIBEL y GÓMEZ (1962). La densidad de volumen granular ( $V_v$ ) fue determinada sobre fotografías a una magnificación de 11.500 aumentos, de acuerdo con el método estereológico de análisis de área de WEIBEL (1979).

Los gránulos de secreción de cada célula se agruparon, atendiendo a su tamaño en tres clases: pequeños (<300 nm), medianos (300-400 nm) y grandes (>400 nm) que permite la clasificación de las células PRL en tipos: Tipo I. Células que contienen gránulos de secreción grandes. Tipo II. Células con mezcla de gránulos, grandes, medianos y pequeños. Tipo III. Células de gránulos pequeños.

El análisis estadístico de los diferentes parámetros se efectuó con el programa informático STATISTIX 3.5 (Analytical Software). Las diferencias entre las medias se determinó aplicando el test de Scheffe y de Tukey. El nivel de significación considerado fue  $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Animales jóvenes

#### Estudio estructural

Las células PRL de animales jóvenes se distribuyen por toda la *Pars distalis*, excepto en la zona rostral y en el rafe medio de separación de ambos lóbulos. La densidad numérica celular es superior en las hembras (Tabla 1).

Se presentan fundamentalmente en grupos (Fig. 1a), constituyendo acinos glandulares, completos o entremezclados con otras células, a modo de cordones o empalizadas y raramente aisladas (Fig. 1b).

Su forma es variable (ovalada, triangular, en copa), predominando las células alargadas (Fig. 1b). Su tamaño medio es superior en los machos que en las hembras (Tabla 1).

#### Estudio ultraestructural

El 65% de las células PRL de las hembras tienen bien desarrollado el retículo endoplásmi-

co granular (REG) y el complejo de Golgi (CG), constituido por cisternas estrechas o ligeramente dilatadas, con frecuencia comunicadas entre sí, a veces en disposición paralela (Fig. 3) o estratificación concéntrica, mientras que en el 35% es escaso. En el macho representan el 10% y 90%, respectivamente.

Los gránulos de secreción son esféricos y electrodensos (Fig. 3); el valor de Vv es menor en las hembras que en el macho, con diferencias significativas. La Nv es mayor en la hembra (Tabla 1).

En las hembras, el 80% son células medianamente granuladas (Fig. 3), mientras que el 15% y el 5% aparecen muy granuladas y poco granuladas, respectivamente. En el macho se obtienen valores similares, con el 90% medianamente granuladas y el 10% restante muy granuladas.

El diámetro medio granular es superior en los machos que en las hembras (Tabla 1). Tanto en la hembra como en el macho predominan los gránulos de mediano y gran tamaño (90.5% y 83%, respectivamente). El 90% de las células de la hembra son de tipo II y el 10% de tipo I y en el macho el 75% y 25%, respectivamente.

TABLA 1

Media aritmética  $\pm$  error estándar de los diferentes parámetros de células PRL en animales impúberes (machos y hembras) y adultos (machos y hembras en reposo sexual)

GRUPOS	IMPÚBERES		ADULTOS	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
D.C	14.25 $\pm$ 3.34	13.11 $\pm$ 2.77*/+	13.68 $\pm$ 2.40	14.12 $\pm$ 2.97**
A.C	78.67 $\pm$ 24.93***/+	68.82 $\pm$ 20.84***	83.12 $\pm$ 19.42	89.30 $\pm$ 25.43**
D.N	30.60 $\pm$ 8.20*	38.94 $\pm$ 7.77**	43.78 $\pm$ 11.93**/+	48.18 $\pm$ 9.95***/*/+
DN%	34.00 $\pm$ 9.1	43.26 $\pm$ 8.63	48.22 $\pm$ 13.25	53.42 $\pm$ 11.05
DG	422 $\pm$ 98.12*	375 $\pm$ 88.86**	368 $\pm$ 79.57**	295 $\pm$ 96.21*/***
VvG	13.00 $\pm$ 4.98***	9.05 $\pm$ 5.48*	16.50 $\pm$ 8.42***	4.54 $\pm$ 3.32*/**
VvG%	22.03 $\pm$ 8.64	14.85 $\pm$ 6.10	24.57 $\pm$ 6.53	8.70 $\pm$ 4.96
NvG	1.31 $\pm$ 0.45**/+	1.63 $\pm$ 0.49*/+	1.63 $\pm$ 0.45	1.19 $\pm$ 0.74***

\* Diferencias significativas entre sexo, \*\* diferencias significativas entre edades, \*\*\* diferencias significativas entre edad y sexo. (\* P<0.01, \* P<0.05). Parámetros (PARA): diámetro máximo celular en  $\mu\text{m}$  (D.C), área celular en  $\mu\text{m}^2$  (A.C), densidad numérica celular en 10.000  $\mu\text{m}^2$  (D.N), diámetro máximo de los gránulos de secreción en nm (DG), densidad de volumen de los gránulos de secreción en  $\mu\text{m}^3$  (VvG), densidad numérica de los gránulos de secreción en  $\mu\text{m}^3$  (NvG).

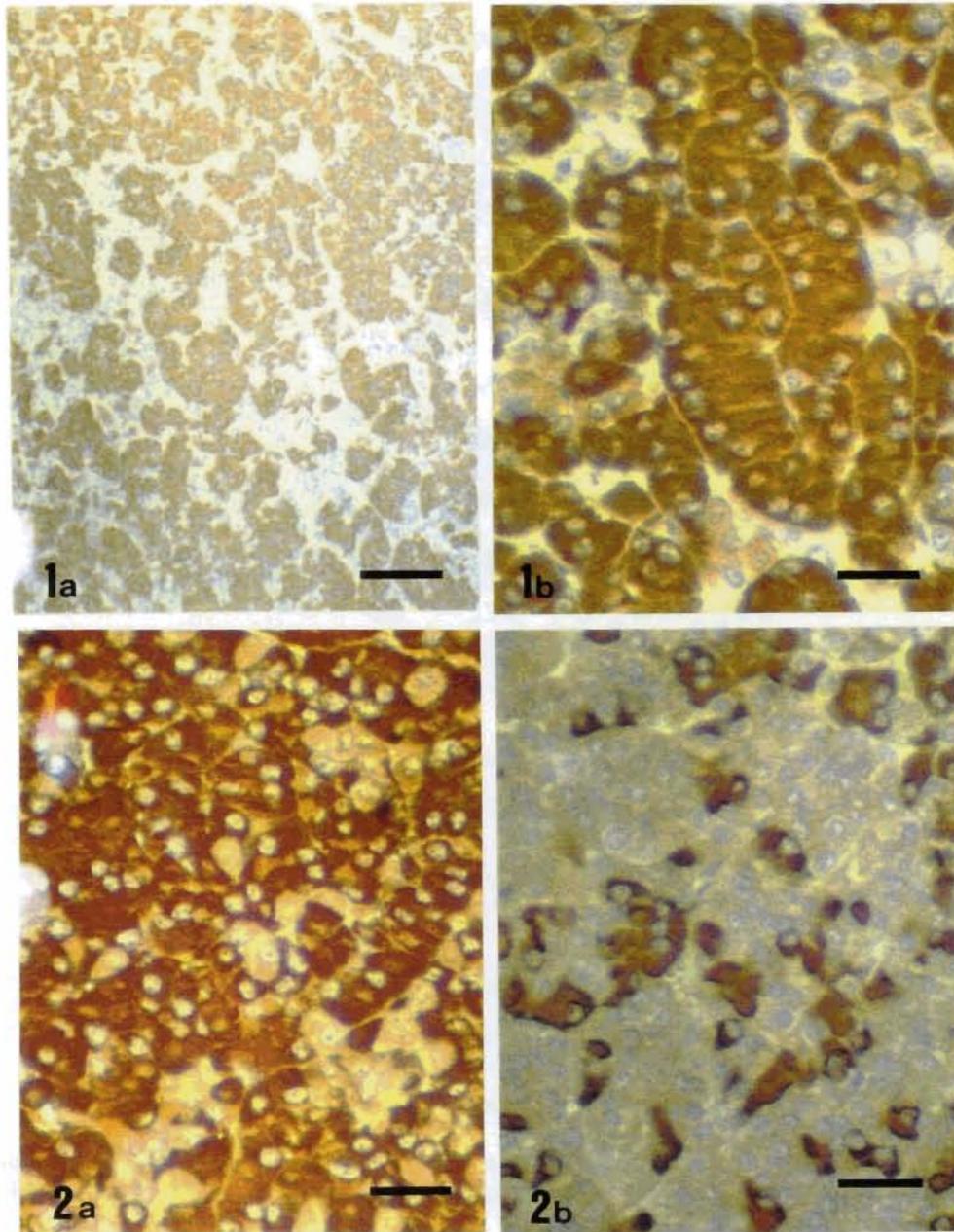


FIGURA 1. a. Hembra joven. Células PRL distribuidas homogéneamente por toda la glándula. ABC utilizando suero anti-PRL ovina. Barra= 100  $\mu$ m. b. Detalle acinos. ABC. Barra= 25  $\mu$ m.

FIGURA 2. a. Macho adulto. Células PRL irregularmente distribuidas. ABC. Barra= 25  $\mu$ m. b. Detalle. Células PRL aisladas. ABC utilizando suero anti-PRL ovina. Barra= 25  $\mu$ m.

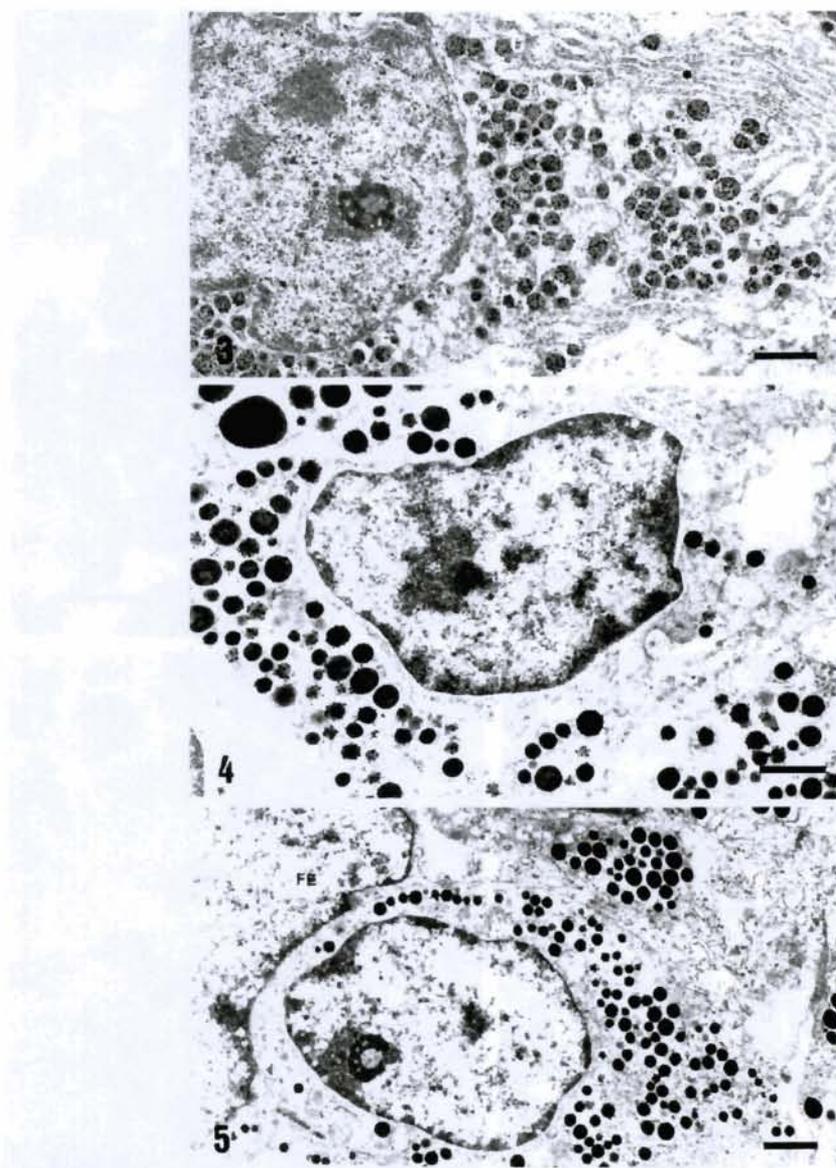


FIGURA 3. Hembra joven, célula PRL medianamente granulada y con gran desarrollo REG (\*). Inmunotinción doble utilizando suero anti-PRL ovina (partícula de oro de 20 nm) y anti-GH ovina (partícula de oro de 10 nm). Barra= 1  $\mu$ m.

FIGURA 4. Hembra adulta. Célula PRL con gránulos de secreción de tamaño medio. Célula GH, gránulos de secreción (\*). Inmunotinción doble. Barra= 1  $\mu$ m.

FIGURA 5. Hembra adulta. Célula PRL con gránulos de secreción de pequeño tamaño. Célula GH, gránulos de secreción (\*). Célula foliculoestrellada (FE). Inmunotinción doble. Barra= 1  $\mu$ m.



FIGURA 6. Célula PRL con escasos gránulos de pequeño tamaño, lisosomas (punta de flecha) y gota de lípido (asterisco). Hembra adulta. Inmunotinción doble. Barra= 1 µm.

FIGURA 7. Células PRL muy granuladas con escaso desarrollo del REG. Lisosomas (punta de flecha), figura de crinofagia (flecha). Macho adulto. Inmunotinción doble. Barra= 1 µm.

En los animales jóvenes es poco frecuente observar lisosomas, exocitosis y figuras de crinofagia.

### Animales adultos

#### Estudio estructural

En las hembras, la distribución y disposición celular es similar a la descrita en animales jóvenes, aunque los acinos y empalizadas son más grandes y están compuestos por mayor número de células. Por el contrario en el macho, si bien existe esta misma distribución y disposición, hay un predominio del número de células aisladas, quedando en sus proximidades amplias áreas libres de células no inmunoteñidas (Fig. 2a,b).

La densidad numérica de las células PRL es superior en las hembras y su tamaño medio estimado similar (Tabla 1).

#### Estudio ultraestructural

El 100% de las células PRL en machos y el 95% en las hembras presentan escaso desarrollo del REG y CG (Figs. 4-7).

La Vv de los gránulos de secreción es muy superior en los machos que en las hembras (Fig. 7) y la Nv presenta diferencias significativas (Tabla 1).

En las hembras el 30% de las células son muy granuladas, el 30% medianamente granuladas (Figs. 4, 5) y el 40% poco granuladas (Fig. 6). En los machos predominan las células muy granuladas (60%) (Fig. 7), frente a las medianamente (35%) y poco granuladas (5%).

El diámetro medio de los gránulos de secreción es inferior en las hembras que en los machos (Tabla 1). En las hembras predominan los gránulos de pequeño y mediano tamaño (85.5%) (Figs. 5, 6) y en los machos los de mediano y gran tamaño (79%) (Figs. 7).

El 45% de las células PRL en la hembra son de tipo III (Figs. 5, 6), y el 55% de tipo II (Fig.

4); en el macho el 95% son de tipo II (Fig. 7) y el 5% de tipo I.

En adultos existe mayor número de lisosomas que en jóvenes, sobre todo en las hembras, pero ocurre lo contrario con las figuras de crinofagia y exocitosis. Las gotas de lípidos son de grandes dimensiones, y escasos en ambos sexos (Fig. 5).

### DISCUSIÓN

El uso del suero anti-PRL ovina (UCB) permite la correcta identificación de las células PRL en ganado ovino tanto en microscopía óptica como electrónica, obteniendo resultados similares a los del suero anti-PRL humana en cerdos (GÓMEZ *et al.*, 1989) y marca una población celular heterogénea que presenta distinto desarrollo de su sistema vacuolar citoplasmático y tamaño de los gránulos de secreción. Así mismo es posible diferenciarlas de otros tipos celulares adenohipofisarios con características ultraestructurales semejantes.

Las células PRL se localizan homogéneamente por toda la glándula dejando libre la zona rostral y medial, disponiéndose en acinos completos o empalizadas, lo que coincide con las observaciones de GUTTE y SEEGER (1987) y GÓMEZ *et al.* (1989). No existen diferencias en su distribución en ganado ovino. A veces, aparecen entremezcladas con células GH, rara vez aisladas, como se ha descrito en ganado ovino (GÓMEZ *et al.*, 1989), caprino (GÓMEZ, 1987), vacuno (MIKAMI y DAIMON, 1968) y cerdo (SASAKI *et al.* 1992). Sin embargo en machos adultos la disposición homogénea en acinos y empalizadas descrito en hembras se pierde, y se observa un predominio de células aisladas, semejante a los campos de GH de animales jóvenes (GÓMEZ-MARÍN, 1994).

En ganado ovino las células PRL son las más numerosas de la adenohipófisis, de acuerdo con TASSELL y KENNEDY (1972), HASSAN *et al.* (1981) y GÓMEZ *et al.* (1989). Existen diferencias en el número y tamaño de las célu-

las PRL con la edad y el sexo. Se encuentran en mayor número en adultos de acuerdo con las observaciones de PUTTEN y KILIAAN (1988), y predominan en las hembras. El menor número en los animales jóvenes puede ser debido a que estos no han alcanzado la madurez sexual (OJEDA y RAMÍREZ, 1972). El menor porcentaje se presenta en machos impúberes donde su menor número está compensado por su mayor tamaño, a diferencia de lo que describen GÓMEZ *et al.* (1989) en corderos y GÓMEZ (1987) en cabritos. GÓMEZ *et al.* (1989) las encuentran en un porcentaje inferior en animales jóvenes y sin diferencias entre sexos.

Para determinar la actividad biosintética celular se cuantificó en el estudio estructural el tamaño y la densidad numérica celular y en el estudio ultraestructural el desarrollo o no del sistema vacuolar citoplasmático (REG y CG) y la cantidad de gránulos de secreción, clasificándose en: 1. células de síntesis, cuando el REG y el CG están muy desarrollados y el contenido granular es bajo. 2. células de almacenamiento cuando presentan escaso o medio desarrollo de orgánulos citoplasmáticos y alto o bajo contenido granular, y 3. células en reposo con escaso desarrollo de REG y CG y bajo contenido granular. Parámetros igualmente utilizados por SÁNCHEZ *et al.* (1992, 1993).

A pesar del menor número de células PRL en los animales impúberes, existe una mayor actividad de síntesis hormonal, puesto que esta hormona según ESQUIFINO *et al.* (1989) actúa favoreciendo la liberación de otras hormonas, GH, TSH y ACTH y por tanto en las funciones en las que estas hormonas intervienen. Hecho que se confirma ultraestructuralmente por la existencia de diferencias significativas en el desarrollo del sistema vacuolar citoplasmático (REG y CG). En las hembras el REG y CG se encuentran más desarrollados, lo que sugiere que existe una mayor actividad de síntesis hormonal, de acuerdo con SEVA (1992) en cabritos impúberes, que es requerida para el desarrollo de la glándula mamaria antes de alcanzar la

madurez sexual (TOPPER y FREEMAN, 1980).

En los animales adultos las células PRL presentan el REG y CG escasamente desarrollados, hecho significativo de que el mantenimiento de los niveles basales de prolactina en machos adultos no se traduce en cambios ultraestructurales evidentes. Si bien en las hembras existe un 40% de células poco granuladas con signos evidentes de inactividad o reposo funcional, con presencia de lisosomas y gotas de lípidos como describen SMETS *et al.* (1987) KUROSUMI (1991) y WANG *et al.* (1992).

Atendiendo al tamaño granular se han clasificado las células PRL tanto en el ganado ovino como en la rata (NOGAMI y YOSHIMURA, 1980; KUROSUMI *et al.*, 1987; KUROSUMI, 1991) y cabrito (SEVA, 1992). Sin embargo esta clasificación no siempre es indicativa del grado de actividad celular, pues en todos los grupos predomina el tipo II, independientemente del desarrollo de su sistema vacuolar citoplasmático. La variabilidad del tamaño granular alcanza su máximo en los machos y su mínimo en las hembras adultas, indicativo de la heterogeneidad de este tipo celular que parece guardar relación con la edad y el sexo del animal, similar a las observaciones de SEVA (1992) en cabritos.

Los gránulos de secreción en las hembras adultas son de menor tamaño que en los machos, alcanzando los valores mínimos en hembras en anestro por un aumento de células inactivas o en reposo. La abundancia del tipo III en la hembra en anestro pone de manifiesto que en éstas, a diferencia del macho adulto, existen estímulos que provocan grandes descargas de prolactina. Estas células permanecen en estado de inactividad en períodos de anestro en los que sólo son requeridos niveles basales de PRL. Al comenzar un nuevo período lactacional se observarían características de síntesis o almacenamiento. La ausencia de este tipo celular en el macho hace que los gránulos de secreción sean de mayor diámetro, próximo a los valores encontrados por NAVARRO (1987) e inferiores a

los descritos por SÁNCHEZ *et al.* (1992) en cabras.

### AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a J. Sánchez y C. de Jodar por su asistencia técnica en microscopía óptica. Al servicio de Microscopía Electrónica y a la Dra. M.T. Castell de la Unidad de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia.

### BIBLIOGRAFÍA

- BENDAYAN, M. y ZOLLINGER, M. 1983: Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 101-109.
- ESQUIFINO, A.I.; AGRASAL, C. y VILLANUA, M.A. 1989: Prolactina: fisiología y reproducción. En: *Fisiología Endocrina*, pp. 179-192. Ed.: FERNÁNDEZ-TRESGUERRAS, J.A. Eudema, Madrid.
- FUMAGALLI, G. y ZANINI, A. 1985: In cow anterior pituitary, growth hormone and prolactin can be packed in separate granules of the same cell. *J. Cell Biol.* 100: 2019-2024.
- GÓMEZ, M.A. 1987: *Estudio histoquímico y ultraestructural de la «Pars distalis» adenohipofisaria de cabritos de raza murciano-granadina*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- GÓMEZ, S.; BERNABÉ, A.; NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J. y GÓMEZ, M.A. 1989: Estudio estructural, inmunocitoquímico y ultraestructural de las células PRL de cordero (*Ovis aries* L.). *An. Vet. (Murcia)* 5: 59-66.
- GÓMEZ-MARÍN, J. 1994: *Estudio inmunocitoquímico estructural, ultraestructural y morfométrico de las células GH, PRL y SMT en ganado ovino prepúber, adulto y en lactación*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- GUTTE, V.G. y SEEGER, J. 1987: Zur Histologischen Differenzierung der Hypophysenvorderlappenzellen beim Schaf (*Ovis aries* L.). *Mh. Vet. Med.* 42: 465-468.
- HARIGAYA, T. y HOSHINO, K. 1985: Immunohistochemical study of postnatal development of prolactin-producing cells in C57BL mice. *Acta Histochem. Cytochem.*, 18:343-351.
- HARIGAYA, T.; KOLMOTO, K. y HOSHINO, K. 1983: Immunohistochemical identification of prolactin-producing cells in the mouse adenohipofisis. *Acta Histochem. Cytochem.* 16: 51-58.
- HASHIMOTO, S.; FUMAGALLI, G.; ZANINI, A. y MELDOLESI, J. 1987: Sorting of three secretory proteins to distinct secretory granules in acidophilic cells of cow anterior pituitary. *J. Cell. Biol.* 105: 1579-1586.
- HASSAN, A.H.S.; KAMEL, G. y EL-HOMMOSI, F.F. 1981: The effect of zeranol implantation on some endocrine glands gonads in fat-tailed lambs. 1. The pituitary gland (*Pars distalis*). *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 95: 634-646.
- HSU, S.M. y RAINE, L. 1981: Protein A, Avidin, and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29:1.349-1.353.
- INGRAM, C.D.; KEEFE, P.D.; WOODING, F.B.P. y BICKNELL, R.J. 1988: Morphological characterization of lactotrophs separated from the bovine pituitary by a rapid enrichment technique. *Cell Tissue Res.* 252: 655-659.
- KUROSUMI, K. 1991: Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohipofisis in the rat: a review. *J. Electron Micr. Tech.* 19: 42-56.
- KUROSUMI, K.; TANAKA, S. y TOSAKA, H. 1987: Changing ultrastructures in the estrous cycle and postnatal development of prolactin cells in the rat anterior pituitary is studied by immunogold electron microscopy. *Arch. Histol. Jap.* 50: 455-478.
- MIKAMI, S. y DAIMON, T. 1968: Cytological and cytochemical investigations of the adenohipofisis of the sheep. *Arch. Histol. Jap.* 29: 427-445.
- NAVARRO, J.A. 1987: *Modificaciones de la Pars distalis adenohipofisaria de cabras murciano-granadina en anestro, gestación y producción láctea: Estudio inmunocitoquímico y ultraestructural*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
- NOGAMI, H. 1984: Fine-structural heterogeneity and morphologic changes in rat pituitary prolactin cells after estrogen and testosterone treatment. *Cell Tissue Res.*, 237:195-202.
- NOGAMI, H. y YOSHIMURA, F. 1980: Prolactin immunoreactivity of acidophils of the small granule type. *Cell Tissue Res.* 211: 1-4.
- OJEDA, S.R. y RAMÍREZ, V.D. 1972: Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to

- hemigonadectomy. *Endocrinology* 90: 466-472.
- ORTMAN, H. 1987: A correlative immunocytochemical 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. y THORBURN, G.D. 1979: Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the perinatal sheep pituitary. *Cell Tissue Res.* 197: 501-514.
- PARRY, D.M.; McMILLEN, I.C. y WILLCOX, D.L. 1978: Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the ovine pituitary. *Cell Tissue Res.* 194: 327-336.
- PUTTEN, L.J.A. van y KILIANN, A.J. 1988: Immunoelectron-microscopic study of the prolactin cells in the pituitary gland of male Wistar rats during aging. *Cell Tissue Res.* 251: 353-358.
- ROTH, J. 1983: The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. En.: *Techniques in Immunocytochemistry*, pp. 262. Eds.: BULLOK, G.R., PETRUSZ, P. Academic Press, London.
- SÁNCHEZ, J.; BERNABÉ, A.; NAVARRO, J.A.; GÓMEZ, M.A. y GÓMEZ, J. 1992: Immunogold identification of prolactin cells of goats in anoestrus, pregnancy and milk production: ultrastructural variations. *Acta Anat.* 140: 118-126.
- SÁNCHEZ, J.; NAVARRO, J.A.; BERNABÉ, A.; GÓMEZ, S.; GARCÉS, B. y GÓMEZ, M.A. 1994: Identification by fluorescence and immunogold techniques of somatomammotroph cells in lactating goats (*Capra hircus*). *Acta Anat.* 149:39-45.
- SÁNCHEZ, J.; NAVARRO, J.A.; BERNABÉ, A.; SERRANO, J. y GÓMEZ, S. 1993: Immunogold identification of the GH cells of goat in different physiological conditions. *Histol. Histopath.* 8: 83-89.
- SASAKI, F.; ICHIKAWA, Y. y YAMAUCHI, S. 1992: Immunohistological analysis in the distribution of cells in the fetal porcine adenohypophysis. *Anat. Rec.* 233: 135-142.
- SEVA, J. 1992: Estudio inmunocitoquímico ultraestructural de las células PRL de cabritos (*Capra hircus*). Tesina de licenciatura, Universidad de Murcia.
- SMETS, G.; VELKENIERS, B.; FINNE, E.; BALDYS, A.; GEPTS, W. y VANHAELST, L. 1987: Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J. Histochem. Citochem.* 35: 335-341.
- TASSELL, R. y KENNEDY, J.P. 1972: Tinctorial differentiation of the cell types in the *Pars anterior* of the sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 25: 1249-1257.
- THORPE, J.R.; RAY, K.P. y WALLIS, M. 1990: Occurrence of rare somatomammotrophs in ovine anterior pituitary tissue studied by immunogold labelling and electron microscopy. *J. Endocrinol.* 124: 67-73.
- TOPPER, Y.J. y FREEMAN, C.S. 1980: Multiple hormone interactions in the development biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60: 1049-1106.
- WANG, B.L. y LARSSON, L.I. 1985: Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining. Novel light and electron microscopical double and triple staining method employing primary antibodies from the same species. *Histochemistry* 83: 47-56.
- WANG, S.M.; WU, J.C.; LUE, C.M.; TSAI, A.I.; CHEN, W.P. y LIN, H.S. 1992: Effects of light deprivation on prolactin cells in golden hamsters: an immunoelectron microscopic study. *Histol. Histopath.* 7: 307-313.
- WEIBEL, E.R. 1979: Stereological methods, I. Practical methods for biological morphometry. Academic Press, New York.
- WEIBEL, E.R. y GÓMEZ, D.M. 1962: A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.* 17: 343.