

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

Functional and morphological heterogeneity of GH 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: 4 Junio 1996

Aceptado: 11 Agosto 1996

RESUMEN

Se estudia la influencia de la edad y el sexo sobre las características morfofuncionales de las células GH de ovinos de raza Segureña (12 animales, 6 corderos impúberes —machos y hembras— y 6 adultos —3 machos y 3 hembras en anestro—) con técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica. Las células GH se distribuyen por toda la adenohipófisis, aisladamente en animales impúberes y formando grupos en adultos. El número de células GH disminuye en hembras adultas. Ultraestructuralmente existe un predominio de células GH de síntesis en animales impúberes, como consecuencia probable de una mayor demanda hormonal. Sin embargo, en animales adultos predominan las células de almacenamiento, debido posiblemente, a una menor demanda de hormona del crecimiento. La variabilidad del tamaño granular de las células GH es indicativa de la heterogeneidad de este tipo celular y no guarda relación con el grado de actividad funcional.

Palabras clave: Células GH, inmunocitoquímica, *Pars distalis*, ganado ovino.

SUMMARY

Influence of age and sex about morphofunctional characteristics of somatotroph cells in ovine Segureña breed (6 lambs —males and females—, 3 rams and 3 ewes in anoestrus) is studied using immunocytochemical procedures for light and electron microscopy. GH cells appear isolated in lambs and forming groups in adults.

The number of GH cells decreases in female adults. Ultrastructurally there is a prevalence of synthetically active cells in lambs probably due to a high need of hormone. However, storage cells are abundant in adult animals perhaps due to a lower demand of growth hormone in this life stage. Granule size of GH cells varies showing the heterogeneity of this cellular type; this characteristic does not seem to be related to functional activity.

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

INTRODUCCIÓN

El control endocrino del crecimiento es una de las actividades más importantes en el ganado ovino y depende de la secreción de la hormona del crecimiento (somatotropina) elaborada por las células somatotropas (GH). Las células GH han sido identificadas en diferentes especies, precisándose su localización y características estructurales y ultraestructurales, en la rata (NAKANE, 1970, 1975; KUROSUMI *et al.*, 1986; KUROSUMI y TOSAKA, 1988; TAKAHASHI, 1991), vacuno (DACHEUX y DUBOIS, 1976), cerdo (DACHEUX, 1980), caprino (SHIRASAWA *et al.*, 1985; GÓMEZ *et al.*, 1989; SÁNCHEZ *et al.*, 1989), ovino (PARRY *et al.*, 1978, 1979; GÓMEZ *et al.*, 1989a). Sin embargo, excepto en la rata (KUROSUMI *et al.*, 1986; KUROSUMI y TOSAKA, 1988; TAKAHASHI, 1991) la heterogeneidad ultraestructural no ha sido descrita. Por otra parte, las células GH presentan similitudes morfológicas con las células PRL que hacen difícil su diferenciación (PARRY *et al.*, 1978, 1979; ORTMAN, 1987). La dificultad que esto entraña ha sido resuelta con la aplicación de la técnica del inmuno-oro coloidal (KUROSUMI Y TOSAKA, 1988; SÁNCHEZ *et al.*, 1993).

Nos hemos propuesto estudiar la influencia de la edad y el sexo sobre la distribución, número, características estructurales y ultraestructurales y de almacenamiento hormonal de las células GH, parámetros indicativos del grado de actividad de síntesis celular en ganado ovino, animales impúberes y adultos (machos y hembras).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado las adenohipófisis de 12 ovinos de raza Segureña distribuidos en 2 lotes: I. 6 corderos impúberes (3 machos y 3 hembras) de 24 k de peso y 3 meses de edad. II. 6 adultos, 3 hembras en anestro de 1 año 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 una solución lavadora de Gonzales durante 1 min (0.8% de cloruro sódico + 0.4% de dextrosa + 0.8% de sacarosa + 1% de nitrito sódico en tampón fosfato salino (PBS) 0.12M, pH 7.4) y posteriormente la solución fijadora (4% de paraformaldehído y 0.5% de glutaraldehído en 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 poliwx (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-GH 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^R (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 anticuerpo 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 GH se calculó de forma manual a partir de imágenes proyectadas, de diez campos de 10.000 μm^2 por sección y cinco secciones por animal separadas una de otra 50 μm . 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 μm . Para calcular el diámetro y la densidad numérica (Nv) de los gránulos de secreción se eligieron al azar 20 micrografías de células GH enteras por cada animal a una magnificación final de 24.800 aumentos. La Nv fue estimada de acuerdo con el método de WEIBEL y GÓMEZ (1962). La densidad de volumen granular (Vv) 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 GH en tipos: Tipo I. Células que contienen gránulos de secreción grandes. Tipo II. Células con mezcla de gránulos, grandes, medianos y 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 $P < 0.05$.

TABLA 1

Media aritmética \pm error estándar de los diferentes parámetros de células GH en ovinos de raza Segureña. Datos de animales impúberes (machos y hembras) y adultos (machos y hembras en reposo sexual)

GRUPOS Parámetros	IMPÚBERES		ADULTOS	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
D.C	12.24 \pm 2.59	11.59 \pm 2.52	12.81 \pm 2.08	13.52 \pm 2.44**
A.C	64.41 \pm 2.10	60.98 \pm 16.67**	77.88 \pm 17.77**	90.10 \pm 23.91*
D.N	25.74 \pm 9.19	27.42 \pm 7.96**	27.70 \pm 10.10*	20.74 \pm 9.96***
DN%	30.46 \pm 10.21	28.60 \pm 8.84	30.71 \pm 11.22	23.04 \pm 11.00
DG	368.5 \pm 87.07**	368.4 \pm 81.23**/+	332.4 \pm 63.93*	421.5 \pm 84.50***
VvG	15.89 \pm 7.79	15.48 \pm 6.32	12.39 \pm 5.44	15.29 \pm 8.91
VvG%	26.94 \pm 7.44	30.50 \pm 7.41	26.25 \pm 7.73	24.68 \pm 5.57
NvG	1.85 \pm 0.35*	2.38 \pm 0.80	3.09 \pm 0.77***	1.70 \pm 0.58*

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

RESULTADOS

Animales impúberes

Estudio estructural

En los animales jóvenes las células GH se encuentran distribuidas homogéneamente por toda la *Pars distalis*, en las proximidades de los grandes vasos, quedando libre la región rostral y medial, con una densidad numérica celular similar en ambos sexos (Tabla 1).

Generalmente son células aisladas, rara vez se disponen en empalizadas o en pequeños grupos (Fig. 1). Su forma es variable, con predominio de células esféricas u ovals (Fig. 1). Sin diferencias significativas de tamaño celular entre machos y hembras (Tabla 1).

Estudio ultraestructural

El 65% de las células GH de los machos y el 50% de las hembras presentan un desarrollo

medio del retículo endoplásmico granular (REG) y complejo de Golgi (CG) (Fig. 4). El REG está constituido por estrechas cisternas, a veces sinuosas y ligeramente dilatadas, distribuidas por todo el citoplasma. En el resto de las células GH (35% en machos y 50% en hembras), tanto el REG como el CG están escasamente desarrollados. Los gránulos de secreción son esféricos y muy electrodensos. Se distribuyen por todo el citoplasma, con tendencia a acumularse en un polo (Fig. 5). No existen diferencias significativas en la densidad de volumen (Vv) de los gránulos de secreción entre sexos y la densidad numérica (Nv) es mayor en las hembras (Tabla 1).

Las células GH de los animales jóvenes presentan un contenido granular entre moderado y grande. En las hembras el 65% de las células son muy granuladas (Fig. 5) y el resto medianamente granuladas. En el macho estos valores se invierten, correspondiendo el 60% a las medianamente granuladas (Fig. 4) y el resto a las muy granuladas.

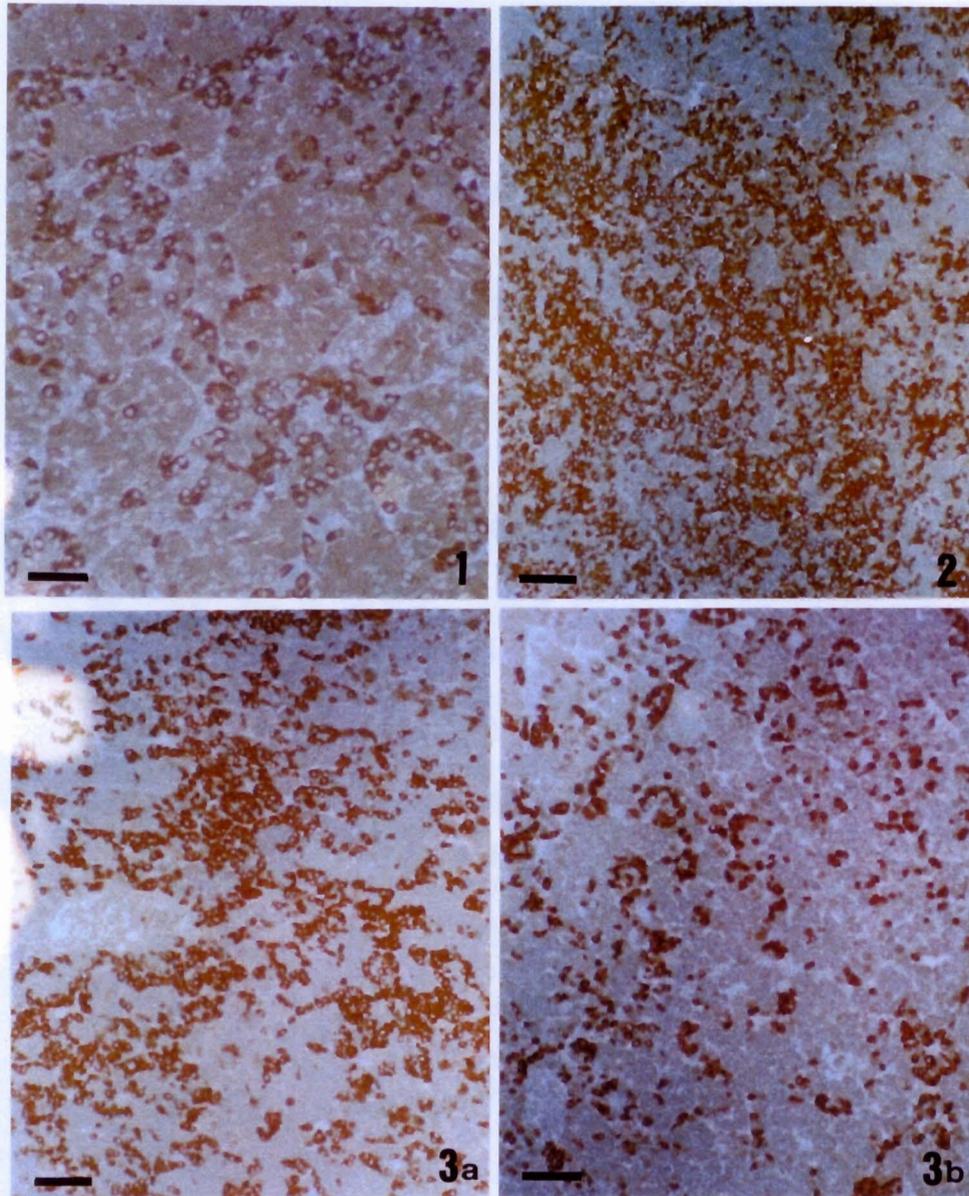


FIGURA 1. Células GH homogéneamente distribuidas por toda la glándula. Hembra impúber. ABC. Barra= 50 μ m.

FIGURA 2. Células GH distribuidas formando grupos. Macho adulto. ABC. Barra= 100 μ m.

FIGURA 3a. Grupos de células GH en la porción dorsocaudal de la *Pars distalis*. b. Células GH aisladas en la porción ventral de la *Pars distalis*. Hembra adulta. ABC. Barra= 100 μ m.

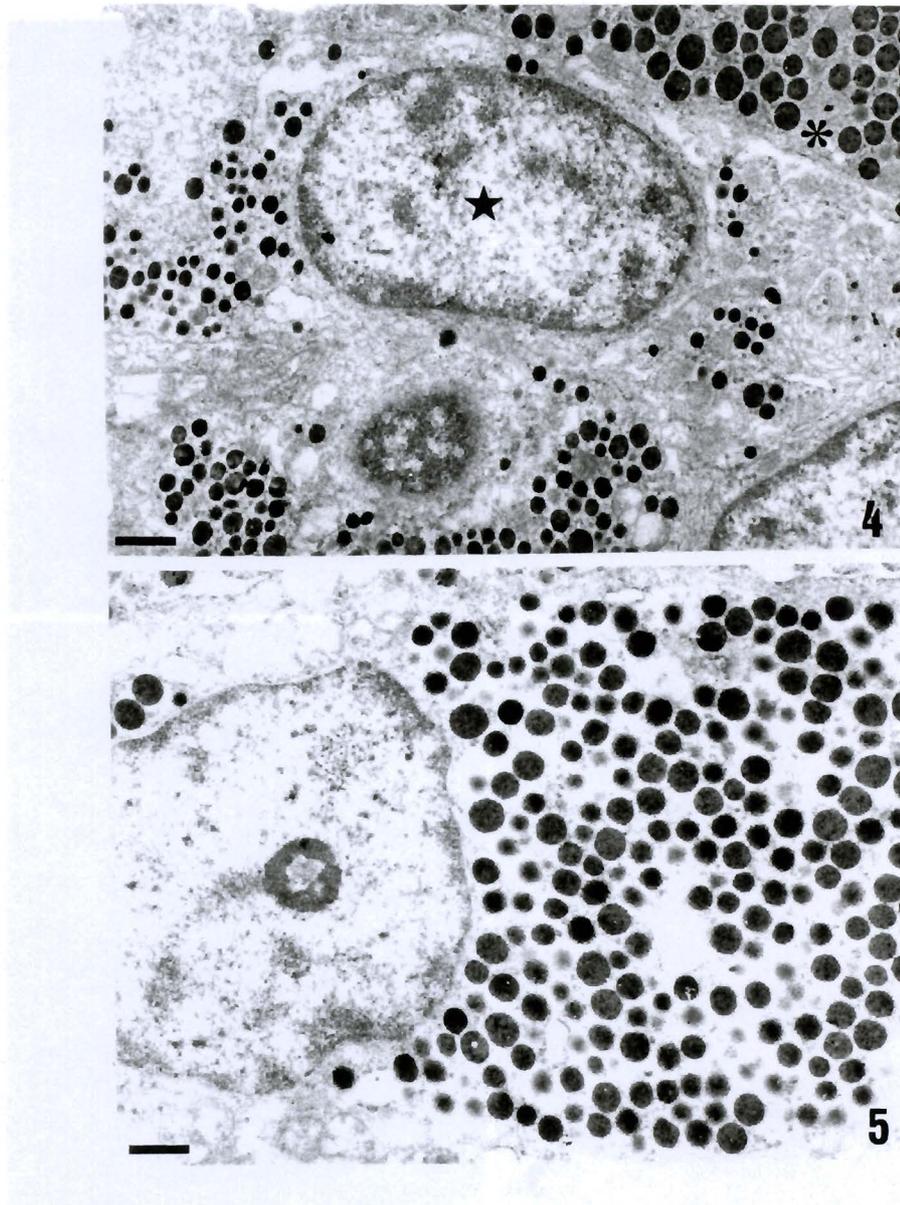


FIGURA 4. Célula GH tipo II (estrella) con contenido medio de gránulos de secreción y desarrollo moderado del REG. Célula PRL (*). Macho impúber. Inmunotinción doble utilizando suero anti-GH ovina con partículas de oro de 10 nm, y suero anti-PRL ovina con partículas de oro de 20 nm. Barra= 1 μ m.

FIGURA 5. Células GH tipo II con abundantes gránulos de secreción y moderado desarrollo del REG. Hembra impúber. Inmunotinción doble. Barra= 1 μ m.

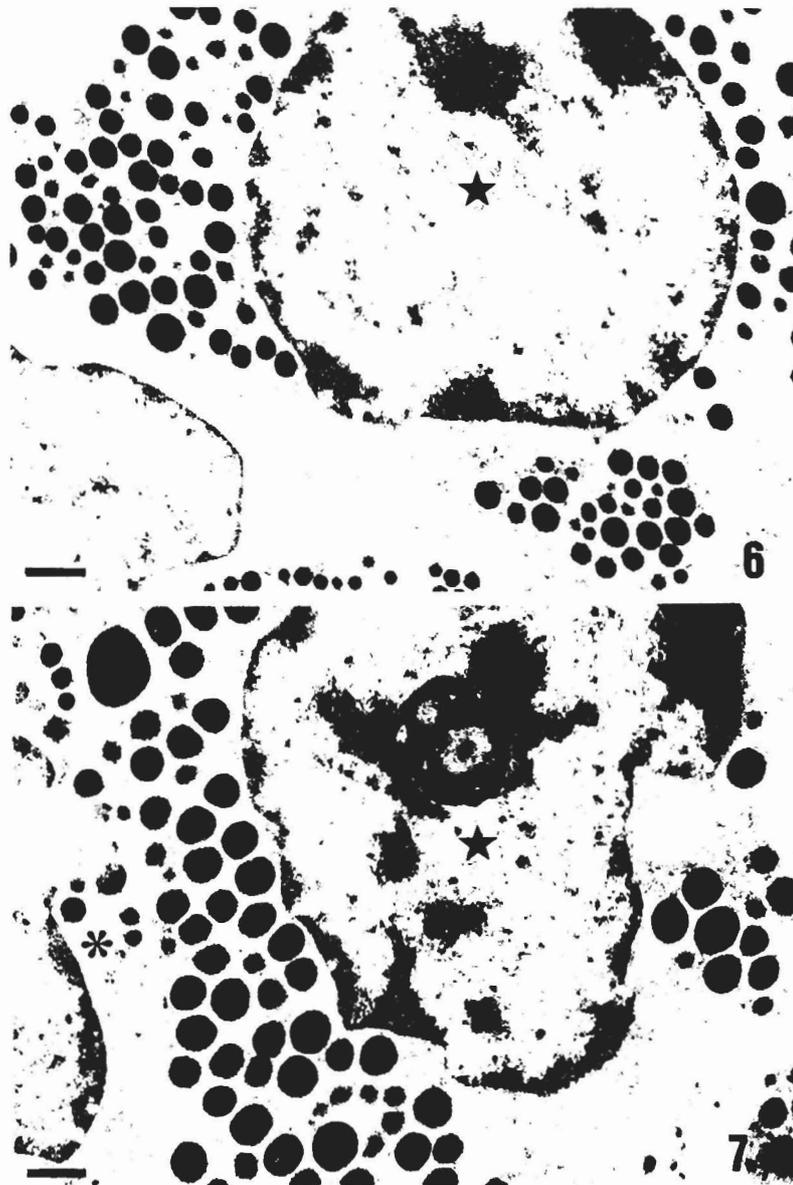


FIGURA 6. Célula GH tipo II (estrella) de gránulos de tamaño pequeño y mediano tamaño. Célula PRL (*). Hembra adulta. Inmunotinción doble. Barra= 1 μ m.

FIGURA 7. Célula GH tipo I (estrella) de gránulos de secreción de gran tamaño. Célula PRL (*). Hembra adulta. Inmunotinción doble. Barra= 1 μ m.

La población granular presenta un diámetro medio similar en las hembras y en los machos (Tabla 1), con predominio de los tamaños medianos y grandes.

En las hembras el 90% de las células son de tipo II (Fig. 5) y el resto de tipo I. En el macho el 100% son de tipo II.

Animales adultos

Estudio estructural

Las células GH de los machos se distribuyen por toda la *Pars distalis* tanto aisladas como formando grupos (Fig. 2). En la hembra predominan los grupos celulares en la porción dorso-caudal de la glándula (Fig. 3a), mientras que en la porción ventral hay una disminución del número de células (Fig. 3b). La densidad numérica celular es mayor en los machos que en las hembras (Tabla 1). Su morfología, como en animales impúberes, es esférica, ovalada, alargada (Figs. 2, 3) y su tamaño medio estimado es superior en las hembras (Tabla 1).

Estudio ultraestructural

El 90% de las células GH de las hembras y el 100% de las del macho presentan escaso desarrollo de REG y CG (Figs. 6, 7). No existen diferencias significativas entre la Vv de los gránulos de secreción. Por el contrario, la Nv es menor en la hembra que en el macho (Tabla 1). En las hembras, el 50% son células muy granuladas (Figs. 6, 7), el 30% medianamente granuladas y el 20% poco granuladas. Sin embargo, en el macho el 100% de las células están muy granuladas. El diámetro de la población granular es mayor en las hembras que en el macho (Tabla 1). En ambos sexos, predominan los gránulos medianos y grandes (Fig. 6), que en la hembra representan el 93.75% del total de la población granular y en el macho el 68%.

En las hembras el 85% de las células son de tipo II (Fig. 6) y el resto de tipo I (Fig. 7). En

los machos todas las células observadas son de tipo II.

DISCUSIÓN

La utilización del suero anti-GH ovina permite la correcta identificación de las células GH en el ganado ovino tanto en microscopía óptica como electrónica, mostrándose más eficaz que el suero anti-GH humana utilizado por GÓMEZ *et al.* (1989a) y claramente demuestra la existencia de una población celular heterogénea constituida por dos tipos celulares con gránulos de secreción de diferente tamaño.

Con la edad existen cambios en la distribución de las células GH en ganado ovino. En animales impúberes se dispone a modo de células aisladas, distribuidas por toda la *Pars distalis* similar a la descrita por GÓMEZ *et al.* (1989a) en corderos y GÓMEZ *et al.* (1989) en cabritos. En tanto que en adultos hay un aumento de las agrupaciones celulares, con predominio de éstos en las porciones dorsocaudales de la glándula, al igual que observaran TASSELL y KENNEDY (1972), ORTMAN, (1987) y GÓMEZ *et al.* (1989a) en esta misma especie. Por el contrario, en la cabra, predominan en las porciones caudoventrales (SINGH y DHINGRA, 1979; NAVARRO, 1987).

En animales impúberes, el número y tamaño celular no se modifican con el sexo, al igual que ocurre en corderos de cola grasa (HASSAN *et al.*, 1981; GUTTE y SEEGER, 1987) y cabritos (GÓMEZ *et al.*, 1989).

En los machos, ni el número ni el tamaño de las células GH experimentan cambios importantes con la edad. Sin embargo disminuyen en las hembras, quizá debido al aumento en el número de células PRL (PORTER *et al.*, 1990, 1991, GÓMEZ-MARÍN, 1994). En ciervos de cola blanca se ha descrito igualmente un descenso del número de células GH en hembras (SCHULTE *et al.*, 1980) y no sufren variación en ganado caprino (SINGH y DHINGRA, 1979). A pesar de ello los porcentajes de células GH en

las hembras son muy superiores a los encontrados por THORPE *et al.* (1990), tal vez porque este autor las cuantifica únicamente en secciones inmunomarcadas con oro coloidal.

El mayor tamaño celular se observa en las hembras adultas. Sin embargo, en otros rumiantes el mayor tamaño celular se corresponde al macho (GROSS, 1980; SCHULTE *et al.*, 1980). En otras especies el sexo no parece influir sobre estas características (BLAKE *et al.*, 1984; HORVATH y KOVACS, 1988).

El porcentaje de células de síntesis es ligeramente superior en el macho impúber que en la hembra, en contraposición con HORVATH y KOVACS (1988) en la rata, donde no encuentran cambios significativos en la actividad biosintética utilizando criterios ultraestructurales básicos. La interpretación de estos resultados hace pensar que en el macho exista un período de crecimiento mayor que en la hembra, como ocurre en la rata (HOEFFLER y FRAWLEY, 1986).

Las células de almacenamiento predominan en adultos, como consecuencia de una menor demanda de hormona del crecimiento en éstos. En cambio esta menor demanda hormonal no refleja cambios morfológicos para SMETS *et al.* (1987) y HORVATH y KOVACS (1988).

En la rata macho, la amplitud de los pulsos y los valores basales son más bajos que en la hembra (JANSSON *et al.*, 1985) estas diferencias también se han descrito en rumiantes (GLUCKMANN *et al.*, 1987). Los hallazgos derivados de estos estudios concuerdan con las ligeras variaciones morfológicas observadas en ganado ovino y que pueden ser debidas, según COPINATH y KITTS (1984) en esta misma especie y HO *et al.* (1988) y HERTZ *et al.* (1989) en la rata, a la influencia de los esteroides sexuales sobre la actividad funcional de las células GH.

La clasificación de las células GH por el tamaño granular no siempre es indicativa del grado de actividad celular, pues en todos los grupos predomina el tipo II, independientemente

del desarrollo del REG y CG y del número de gránulos de secreción (90% en hembras jóvenes, 85% en hembras adultas y el 100% de los machos). Este tipo celular está constituido por células con gránulos de secreción grandes, medianos y pequeños, en tanto que en el tipo I predominan los gránulos grandes y sólo representan un 10% y 15% en las hembras, respectivamente. MALAMED *et al.* (1988) encuentran cambios en el tamaño granular dependientes de la edad, aunque no especifican el grado de actividad celular, mientras que TAKAHASHI (1991) relaciona el aumento del tamaño granular con un incremento de la actividad de síntesis.

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. Citochem.* 31: 101-109.
- BLAKE, C.H.A.; DADA, M.O.; OLSON, D.R. y CAMPBELL, G.T. 1984: A sex difference in the gonadal control of growth hormone secretion in rat. *Neuroendocrinol. Lett.* 6: 305-310.
- DACHEUX, F. 1980: Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* 207: 277-286.
- DACHEUX, F. y DUBOIX, M.P. 1976: Ultrastructural localization of prolactin, growth hormone and luteinizing hormone by immunocytochemical techniques in the bovine pituitary. *Cell Tissue Res.* 174: 245-260.
- GLUCKMAN, P.D.; BREIER, B.H. y DAVIS, S.R. 1987: Physiology of the somatotrophic axis with

- particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.* 70: 442-466.
- GÓMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A.; CÁMARA, P.; SÁNCHEZ, J.; SIERRA, M.A. y BERNABÉ, A. 1989: Cytological, immunocytochemical and ultrastructural study of GH cells of *Pars distalis* adenohypophysaria of kids (*Capra hircus*). *Anat. Histol. Embryol.* 18: 165-176.
- GÓMEZ, S.; BERNABÉ, A.; NAVARRO, J.A.; SÁNCHEZ, J. y GÓMEZ, M.A. 1989a: Estudio estructural, inmunocitoquímico y ultraestructural de las células GH de cordero (*Ovis aries* L.). *An. Vet. (Murcia)* 5: 51-58.
- 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.
- GROSS, D.S. 1980: Role of somatostatin in the modulation of hypophysial growth hormone production by gonadal steroids. *Am. J. Anat.* 158: 507-519.
- GUTTE, V.G. y 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. 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.
- HETZ, P.; SIBERMANN, M. y EVEN, L. 1989: Effects of sex steroids on the response of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology* 125: 581-585.
- HO, KY.; THORNER, M.O.; KRIEG, R.J.; LAU, S.K.; SINHA, Y.N.; JOHNSON, M.L.; LEONG, D.A. y EVANS, W.S. 1988: Effects of gonadal steroids on somatotroph function in the rat: analysis by the reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 123: 1405-1411.
- HOEFFLER, J.P. y FRAWLEY, L.S. 1986: Capacity of individual somatotropes to release growth hormone varies according to sex: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 119: 1037-1041.
- HORVATH, E. y KOVACS, K. 1988. Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J. Electron Micr. Tech.* 8: 401-432.
- HSU, S.M. y RAINE, L. 1981. Protein A, Avidin, and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29:1.349-1.353.
- JANSSON, J.O.; EDEN, S. y ISAKSSON, M. 1985: Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 6: 128.
- KUROSUMI, K. 1991: Ultrastructural immunocytochemistry of the adenohypophysis in the rat: a review. *J. Electron Micr. Tech.* 19: 42-56.
- KUROSUMI, K.; KOYAMA, T. y 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.
- KUROSUMI, K. y TOSAKA, H. 1988: Prenatal development of growth hormone producing cells in the rat anterior pituitary as studied by immunogold electron microscopy. *Arch. Histol. Jap.* 51: 193-204.
- MALAMED, S.; GIBNEY, J.A. y SCANES, C.G. 1988: Immunogold identification of the somatotrophs of domestic fowl of different ages. *Cell Tissue Res.* 251: 581-585.
- NAKANE, P.K. 1970: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 9-20.
- NAKANE, P.K. 1975: Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. En: *The Anterior Pituitary*, pp. 45-61. Eds.: TIXIER-VIDAL, A., FARQUHAR, M.G. Academic Press, New York.
- 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.
- 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. Mikrosk. 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.
- RACADOT, J. 1963: Modifications cytologiques du lobe antérieur de l'hypophyse de la brevis au cours du post-partum. *R. C. Soc. Biol.* 157: 729-732.
- 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.; SERRANO, J. y GÓMEZ, S. 1993: Immunogold identification of the GH cells of goat in different physiological conditions. *Histol. Histopath.* 8: 83-89.
- SCHULTE, B.A.; SEAL, U.S.; PLOTKA, E.D.; VERME, L.J.; OZOGA, J.J. y PARSONS, J.A. 1980: Seasonal changes in prolactin and growth hormone cells in the hypophyses of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*) studied by light microscopic immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Am. J. Anat.* 159: 369-378.
- SHIRASAWA, N.; KIHARA, H. y YOSHIMURA, F. 1985: Fine structural and immunohistochemical studies of goats adenohypophysial cells. *Cell Tissue Res.* 240: 315-321.
- SINGH, Y. y DHINGRA, L.D. 1979. Morphogenesis of the *Hypophysis cerebri* in goats. *Pars distalis* and *Pars infundibularis* adenohypophysis. *Indian J. Anim. Sci.* 49: 1067-1075.
- 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.
- TAKAHASHI, S. 1991: Immunocytochemical and immuno-electron-microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cell Tissue Res.* 266: 275-284.
- 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.
- WANG, B.L. y LARSSON, L.I. 1985: Simultaneous demonstration of multiple antigens by indirect immunofluorescence or immunogold staining method employing primary antibodies from the same species. *Histochemistry* 83:47-56.
- WEIBEL, E.R. y GÓMEZ, D.M. 1962: A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.* 17: 343.
- WEIBEL, E.R. 1979: *Stereological methods, I. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, New York.