

Estudio inmunocitoquímico del lóbulo neural hipofisario de *Natrix maura* en deshidratación*

J. M. Mancera**, P. Fernández-Llebrez y J. M. Pérez-Figares

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
29071 Málaga (España)

(Recibido el 10 de noviembre de 1989)

J. M. MANCERA, P. FERNÁNDEZ-LLEBREZ and J. M. PÉREZ-FIGARES. *Immunocytochemical Study of the Hypophysial Neural Lobe of Natrix maura under Dehydration*. Rev. esp. Fisiol., 46 (2), 183-190, 1990.

The influence of the dehydration treatment on the hypophysial neural lobe of the water snake *Natrix maura*, has been investigated. Whereas control animals stayed in fresh water, experimental snakes were immersed in a hypertonic solution of sodium chloride (35 ‰) for 48 h. All specimens were fixed by vascular perfusion with Bouin fluid and the pituitaries embedded in paraffin. The sections were stained through histochemical procedures and immunocytochemistry by means of antisera against bovine neurophysins, vasotocin and mesotocin. The intensity of the immunoreaction was measured by microdensitometry. The osmotic stress significantly decreases the amount of stainable neurosecretory material in the neural lobe as well as the immunoreactivity to antineurophysin and antivasotocin sera. Contrariwise, there is no clear decrease in the immunoreactivity to antimesotocin serum. These results suggest that the osmotic stress in *Natrix maura* elicited an increase in the release of vasotocin.

Key words: Vasotocin, Mesotocin, Neurophysins, Neural lobe, Immunocytochemistry, Dehydration, *Natrix maura*.

La principal función biológica de la arginina-vasopresina (AVP), en mamíferos, es su actividad antidiurética, produciendo una reabsorción de agua a nivel renal con la consiguiente concentración urinaria (5). Estudios bioquímicos por radioinmuno-

ensayo (14, 31, 34), electrofisiológicos (27) e inmunocitoquímicos (6) han mostrado que la síntesis y el vertido de esta hormona aumenta bajo estímulos que incrementan la osmolaridad o disminuyen el volumen sanguíneo: privación de agua, inyección de ClNa, hemorragias, etc. (36). Estos mismos estímulos, incrementan también el vertido de oxitocina (OXI) (14, 31, 34, 36); sin embargo, no está claro el posible papel que pudiera tener la OXI en la osmorregulación.

En vertebrados no mamíferos la arginina-vasotocina (AVT), hormona análoga

* Trabajo parcialmente subvencionado por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Junta de Andalucía (BOJA 27/9/88) y por la DGICYT del Ministerio de Educación y Ciencia (PB87-710).

** A quien debe dirigirse la correspondencia. Depto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias, 29071 Málaga (España).

a la AVP de mamíferos, también posee actividad antidiurética (11, 23), incrementándose su secreción bajo condiciones de deshidratación (17, 20-22). Al igual que en el caso de la oxitocina el papel de la hormona análoga de no mamíferos, mesotocina (MST), en la omorregulación y su posible vertido frente a estímulos osmóticos no está bien establecido (5, 18). Existen pocos trabajos sobre la respuesta del sistema hipotálamo-hipofisario de reptiles ante condiciones de deshidratación (5, 26, 28). En la serpiente *Diadophis punctatus* se ha demostrado por métodos histoquímicos una marcada disminución del material neurosecretor, tanto en los lugares de producción (núcleos magnocelulares hipotálamicos) como en los de almacenamiento y vertido (neurohipófisis) (26). A pesar de existir algunos estudios inmunocitoquímicos descriptivos (2, 8, 12), no se conocen datos individuales para cada una de las hormonas hipofisarias de reptiles, AVT y MST. Trabajos previos en *Natrix maura* han demostrado la excelente inmunorreactividad del sistema hipotálamo-hipofisario ante los antisueros utilizados en este estudio (8). También en esta especie, experimentos recientes de deshidratación han mostrado una marcada disminución del material inmunoreactivo al anti-AVT en el soma de células AVT de los núcleos supraóptico y paraventricular, mientras que se produce un aumento del número de gotas coloidales, lo cual se interpreta como un incremento de la actividad celular (9, 10).

El propósito del presente trabajo es el estudio de las diferencias en la inmunorreactividad del lóbulo neural (LN) a los antisueros contra hormonas neurohipofisarias, en especímenes de *Natrix maura* sometidos a condiciones de estrés osmótico con respecto a la inmunorreactividad observada en individuos controles. Para ello se ha realizado un análisis semicuantitativo, por técnicas microdensitométricas, de las intensidades de inmunotinción del lóbulo neural. Los resultados se dis-

cuten en relación al papel fisiológico de la AVT en esta especie.

Material y Métodos

Animales. — Se han utilizado ejemplares adultos, de ambos sexos, de la serpiente de río *Natrix Maura* (peso medio 60 g), capturados en su ambiente natural y mantenidos en acuarios-terrarios apropiados, donde se alimentaron *ad libitum* con adultos y larvas de *Rana ridibunda*.

Experimento de deshidratación. — Los ejemplares se distribuyeron en dos grupos: A) Control (n = 4), mantenidos en peceras con agua dulce y sin zonas secas. B) Experimental (n = 8), sometido a deshidratación. Los animales se mantenían, durante 48 h en peceras con una solución hipertónica de ClNa (35 ‰), sin zonas secas, por lo que debían permanecer todo el tiempo sumergidos.

Estudios previos, en los cuales los ejemplares se mantenían en solución hipertónica durante 6, 24 y 48 h demostraron que a este último tiempo se obtenía la mayor respuesta del sistema hipotálamo-hipofisario (9).

Estudio histoquímico e inmunocitoquímico. — Los animales fueron anestesiados con triclaína (Sigma) (0,292 mg/g), y perfundidos con solución Ringer y con la mezcla fijadora de Bouin, durante 40 min. Los cerebros extraídos se sumergieron en el mismo fijador durante 48 h y, posteriormente, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Las secciones transversales se tiñeron con el método del ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y paraldehidofucsina (AF).

Algunas secciones fueron inmunoteñidas según el método PAP del segundo anticuerpo no marcado (32). Como primeros anticuerpos se utilizaron antisueros obtenidos contra una mezcla de neurofinsas bovinas I y II (Nfs) (1:1.000), argi-

nina-vasotocina (AVT) (1/2.500) y mesotocina (MST) (1/2.000).

Todas las secciones fueron incubadas durante 18 h a 22 °C en el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo se usó a una dilución de 1:10 durante 30 min a 22 °C, y el complejo PAP (dilución 1:75) a igual tiempo y temperatura. Todos los anticuerpos se diluyeron en Tris (pH 7,8) conteniendo 0,7 % de Carraginata (Sigma) y 0,5 % Triton X-100 (Sigma). La peroxidasa se visualizaba por incubación de las secciones en una solución conteniendo 0,2 % de 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (Sigma, DAB) en tampón Tris y 0,007 % H₂O₂, durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Microdensitometría. — Se inmunotiñeron, por cada animal estudiado, tres secciones del lóbulo neural obtenidas a diferentes niveles. Todas las secciones se procesaron juntas, bajo idénticas condiciones, en la misma sesión de inmunotinción.

El análisis microdensitométrico de los lóbulos neuronales inmunoteñidos con anti-AVT y anti-Nfs se realizó en un analizador de imagen IBAS II. Las características de las técnicas inmunocitoquímicas sólo permiten realizar estudios semicuantitativos respecto a la concentración del material en el tejido procesado. Los resultados se refieren a intensidades de inmunotinción y no a concentraciones hormonales absolutas. La intensidad media de inmunotinción obtenida en los animales controles es considerada como el 100 % de inmunotinción. Los valores medios obtenidos en animales deshidratados se expresan como % de disminución de intensidad de inmunotinción respecto a los controles. En el análisis estadístico se utilizó la *t* de Student.

Resultados

El lóbulo neural de la hipófisis de la culebra de río *Natrix maura* está constituido

por un número variable de lobulillos, separados entre sí por septos conjuntivos en los que se localizan capilares sanguíneos. Cada lobulillo consta de una región hiliar en el centro y una región en empalizada en posición periférica, que contacta con los septos conjuntivos. La región en empalizada contiene los terminales axónicos de las neuronas magnocelulares, que terminan sobre los septos conjuntivos.

Animales controles. — El lóbulo neural se tiñe intensamente con la aldehído-fucsina. El número de fibras que se tiñen con el PAS es menor. La inmunotinción con anti-Nfs revela la totalidad de los terminales, apareciendo el lóbulo neural intensamente teñido (fig. 1A); la tinción con anti-AVT revela un menor número de fibras que se encuentran, preferentemente,

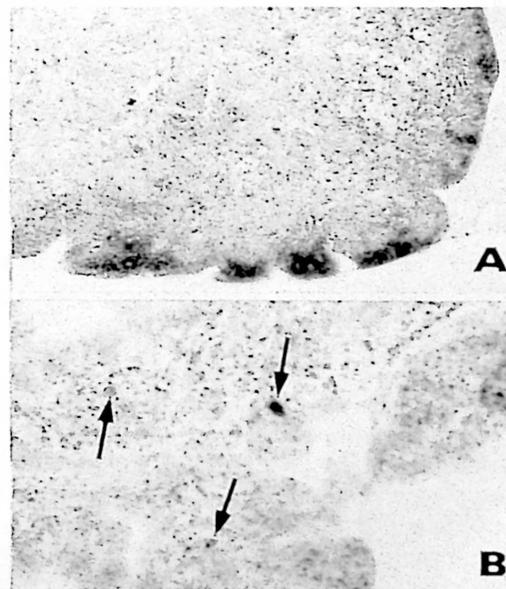


Fig. 1. Inmunotinción de secciones transversales del lóbulo neural de *Natrix maura* con anticuerpo anti-Nfs (165 ×).

A) animal control. B) animal sometido a deshidratación por inmersión en solución hipertónica de ClNa. La inmunorreactividad disminuye en los animales experimentales y se incrementa el número de cuerpos de Herring (flechas).

Tabla I. *Inmunotinción del lóbulo neural (%) de animales controles y deshidratados.*

Los valores relativos (media \pm d. t), para los animales deshidratados (n = 8) se expresan como un porcentaje del valor medio de los animales controles (n = 4) fijado como el 100 %.

Antisero	Deshidratado
Antineurofisinas	76,37 \pm 4,92*
Antivasotocina	78,96 \pm 4,19*
Antimesotocina	98,85 \pm 3,13 N.S.

* p < 0,01; N.S. = no significativo.

en la zona en empalizada. En la zona hilar de los lobulillos se localizan grandes acúmulos de material AF, PAS, anti-AVT y anti-Nfs positivos, que deben corresponderse con los cuerpos de Herring. El antisero contra la MST revela un menor número de fibras positivas que el anti-AVT. Estas se localizan, casi exclusivamente, en la región en empalizada.

Animales deshidratados. — Al utilizar las técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas, aplicando anti-AVT y anti-Nfs, se aprecia una disminución general de tinción en todo el lóbulo neural (fig. 1B). Sin embargo, se observa un incremento en el número y tamaño de las dilataciones axonales y cuerpos de Herring. Con anti-MST se aprecian pocas diferencias en la intensidad de inmunotinción, respecto a los controles.

El análisis microdensitométrico (tabla I) revela, al inmunotear con anti-Nfs, una disminución en la intensidad de tinción respecto al control. Resultados similares se obtienen al teñir con anti-AVT. Sin embargo, la inmunorreactividad al anti-MST no demuestra diferencias significativas entre los animales controles y deshidratados.

Discusión

El método de deshidratación usado en nuestro estudio es efectivo para inducir un choque osmótico en la culebra *Natrix maura*. La diferencia de presión osmótica

entre el medio interno (POs \sim 280 mOsm/ml) y el medio ambiente hipersalina (POs \sim 1.090 mOsm/ml) origina un flujo neto de agua, desde el animal hasta el exterior, con la consiguiente deshidratación del mismo (1).

Las hormonas neurohipofisarias de vertebrados son sintetizadas en los núcleos magnocelulares hipotalámicos, siendo transportadas intraaxonalmente por la zona interna de la eminencia media y el tallo hipofisario hasta el lóbulo neural. En éste se localizan los terminales axónicos, que constituyen el lugar de almacenamiento y liberación de los productos de secreción (4, 30). En mamíferos, el incremento en la osmolaridad plasmática, por deshidratación o por incorporación de sal, produce un aumento de la AVP circulante en sangre, lo que provoca antidiuresis por incremento de la reabsorción de agua en los túbulos renales (5). Este hecho se traduce en modificaciones morfológicas en el sistema hipotálamo-hipofisario tales como: disminución de la inmunorreactividad al anti-AVP en el lóbulo neural y pericarion de las neuronas AVP de los núcleos magnocelulares e incremento en los axones y dendritas (6), incremento en la cantidad de ARN mensajero para el precursor de la AVP medido por hibridación *in situ* e hiperplasia celular (13). Esta serie de acontecimientos sucede siempre, aunque existen variaciones en el tiempo de respuesta dependiendo de los diferentes animales experimentales o autores. Dichas modificaciones indican una activación de la biosíntesis del precursor de la AVP, del transporte axónico de granos neurosecretores y del vertido de la hormona en el lóbulo neural de la neurohipófisis.

Situaciones similares ocurren en otros grupos de vertebrados no mamíferos para el correspondiente péptido neurohipofisario antidiurético (5, 11, 23). En lacértidos, la deshidratación incrementa la cantidad de AVT circulante en sangre (28); lo que produce una antidiuresis por disminución del número de nefronas filtrantes

en el riñón y de la tasa de filtración glomerular por nefrona (5). También en reptiles, el incremento en la AVT circulante se traduce en modificaciones morfológicas del sistema hipotálamo-hipofisario. En ofidios sometidos a deshidratación se ha demostrado, mediante técnicas histoquímicas, una disminución del material secretorio almacenado en la neurohipófisis (7, 25, 33). Nuestros resultados histoquímicos e inmunocitoquímicos muestran que, con las condiciones experimentales utilizadas la deshidratación provoca, en *Natrix maura*, una disminución de la inmunorreactividad al anti-AVT en el lóbulo neural. Esto puede ser considerado como una consecuencia del incremento del vertido de la hormona desde la neurohipófisis a la circulación sistémica. Ejemplares sometidos a deshidratación, han mostrado una disminución de la inmunorreactividad en el soma de las neuronas secretoras de AVT. Igualmente se aprecia un incremento en el número de gotas coloidales, que representan un típico sistema de depósito de material precursor en vertebrados no mamíferos (9, 10).

En mamíferos, la hiperosmolaridad plasmática provoca también un incremento en el vertido de oxitocina en la neurohipófisis (16), y una activación de las neuronas oxitocinéricas de los núcleos magnocelulares hipotalámicos (13) del mismo nivel que los descritos para la AVP. Aunque algunos autores atribuyen a la OXI una capacidad natriurética (3), se desconoce el papel concreto que pueda jugar esta hormona en la osmorregulación en mamíferos. La mesotocina es una neurohormona de vertebrados no mamíferos cuya función no es bien conocida. Una función relacionada con la reproducción, similar a la encontrada para la OXI en mamíferos, no es evidente. Aunque en algunos casos se ha relacionado un incremento en el vertido de la MST con movimientos del oviducto (18), en gallinas la oviposición no produce una modificación en la cantidad de MST inmunorreactiva en

plasma (19). Resultados preliminares, en preparación, muestran una apreciable disminución de la inmunorreactividad del lóbulo neural al anti-MST en ejemplares hembras de *Natrix maura* recién ovadas ($n = 2$), lo cual parece indicar un incremento del vertido de la MST en esta situación fisiológica.

En cuanto a la posible relación entre la MST y la osmorregulación, los datos son contradictorios. En anfibios se ha sugerido que la MST podría actuar como diurético (oponiéndose por tanto al de la AVT), incrementando la tasa de filtración glomerular (35). En aves se incrementa la cantidad de MST plasmática tras inyección de solución hipotónica (15, 29), lo que está de acuerdo con lo mencionado en anfibios; sin embargo, también en aves se ha registrado un incremento en condiciones de deshidratación o hemorragia (19). Nuestros resultados indican que la deshidratación en *Natrix maura* no varía la cantidad de MST inmunorreactiva en el lóbulo neural, lo cual parece indicar que no existe un incremento del vertido de la hormona en sangre bajo esta condición experimental. Existe la posibilidad de que, al igual que en anfibios, otros estímulos como la hiposmolaridad provoquen un vertido de la hormona.

En animales deshidratados la región hilar del lóbulo neural muestra un incremento en el número y tamaño de los cuerpos de Herring, condición que ha sido descrita también en mamíferos (6). Dadas sus afinidades histoquímicas (AF y PAS positivas) e inmunocitoquímicas (AVT y Nfs positivas, MST negativas) (24, 25) los cuerpos de Herring son, presumiblemente, de naturaleza vasopresinérgica o vasotocinérgica. Es sorprendente el hecho de que en el lóbulo neural de animales en deshidratación disminuya el contenido de hormona antidiurética en los terminales, pero se incrementa en los cuerpos de Herring, estructuras supuestamente encargadas de la destrucción y/o regeneración de hormona envejecida (6).

Agradecimientos

Queremos agradecer a los profesores E. M. Rodríguez (Valdivia, Chile), R. M. Buijs (Amsterdam, Holanda) y S. Blähsler (Gießen, RFA) su amabilidad al proveernos los antisueros utilizados.

Resumen

Se estudia la influencia de tratamientos de deshidratación sobre el contenido del lóbulo neural hipofisario en la culebra de río, *Natrix maura*. Mientras que los animales controles permanecen en agua dulce, los ejemplares experimentales se sumergen en solución hipertónica de cloruro sódico (35 ‰) durante 48 horas. Todos los animales son fijados por perfusión vascular con líquido Bouin y los cerebros incluidos en parafina. Las secciones se tiñen mediante procedimientos histoquímicos e inmunocitoquímicos, con antisueros contra una mezcla de neurofisinas bovinas, vasotocina y mesotocina. La intensidad de la inmunorreacción se cuantifica por microdensitometría. El estrés osmótico disminuye significativamente la cantidad de material teñido en la neurohipófisis, así como el material inmunorreactivo a los antisueros contra las neurofisinas y la vasotocina. No se aprecia, por el contrario, una clara disminución en la inmunoreactividad a la antimesotocina. Estos resultados sugieren que el estrés osmótico en *Natrix maura* provoca una liberación neurohipofisaria de vasotocina, pero no de mesotocina.

Palabras clave: Vasotocina, Mesotocina, Neurofisinas, lóbulo neural, Inmunocitoquímica, Deshidratación, *Natrix maura*.

Bibliografía

- Bentley, P. J.: En: *Biology of the reptilia* (C. Gans y W. R. Dawson, eds.). Academic Press, Londres, 1976, Vol. 5, pp. 365-412.
- Bons, N.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 52, 56-66, 1983.
- Buckalew, V. M. Jr. y Gruber, K. A.: *Ann. Rev. Physiol.*, 46, 343-358, 1984.
- Castel, M., Gainer, H. y Dellmann, H. D.: *Int. Rev. Cytol.*, 88, 303-459, 1984.
- Dantzler, W. H.: *Comparative physiology of the vertebrate kidney* (D. S. Farner ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1988, pp. 157-171.
- Dellmann, H. D., Rodríguez, E. M., Peña, P. y Siegmund, I.: *Neuroendocrinology*, 47, 335-342, 1988.
- Eyeson, K. N.: *Ghana J. Sci.*, 10, 71-81, 1970.
- Fernández-Llebrez, P., Pérez, J., Nadales A. E., Cifuentes, M.; Grondona, J. M., Mancera, J. M. y Rodríguez, E. M.: *Cell Tissue Res.*, 253, 435-445, 1988.
- Fernández-Llebrez, P., Andrades, J. A. y Pérez, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 45, 385-390, 1989.
- Fernández-Llebrez, P., Lancha Bernal, A. M., Rodríguez, E. M., Pérez, J., Andrades, J. A. et al.: *Cell Tissue Res.*, 260, 69-76, 1990.
- George, J. C.: *Amer. Zool.*, 17, 787-808, 1977.
- Goossens, N., Dierickx, K. y Vandesinde, F.: *Cell. Tissue Res.*, 200, 223-227, 1979.
- Hyodo, S., Fujiwara, M., Sato, M. y Urano, A.: *Zool. Sco.*, 5, 1033-1042, 1988.
- Kasting, N. W.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 66, 22-26, 1988.
- Koike, T. I., Neldon, H. L., McKay, D. W. y Rayford, P. L.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 36, 93-103, 1986.
- Leng, G., Dyball, R. E. J. y Russell, J. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 90, 781-788, 1988.
- Levinsky, N. G. y Sawyer, W. H.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 82, 272-274, 1953.
- Norris, D. O.: *Vertebrate Endocrinology*. Lea and Febiger, Filadelfia, 1985, pp. 147-161.
- Nouwen, E. J., Decuyper, E., Khun, E. R., Michels, H., Hall, T. R. y Chadwick, A.: *J. Endocrinol.*, 102, 345-351, 1984.
- Oksche, A., Laws, D. F., Kamemoto, F. I. y Farner, D. S.: *Z. Zellforsch.*, 51, 1-42, 1959.
- Oksche, A., Farner, D. S., Serventy, D. L., Wolff, F. y Nicholls, C. A.: *Z. Zellforsch.*, 58, 846-914, 1963.
- Oksche, A., Wilson, W. O. y Farner, D. S.: *Z. Zellforsch.*, 61, 688-709, 1964.
- Pang, P. K. T., Furspan, P. B. y Sawyer, W. H.: *Amer. Zool.*, 23, 655-662, 1983.
- Pérez, J. y Fernández-Llebrez, P.: *Cell Tissue Res.*, 258, 547-554, 1989.
- Peruzzo, B., Rodríguez, E. M.: *Histochemistry*, 92, 505-513, 1989.
- Philibert, R. L. y Kamemoto, F. L.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5, 326-335, 1965.
- Poulain, D. A. y Wakerley, J. B.: *Neuroscience*, 7, 773-808, 1982.
- Rice, G. E.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 47, 1-6, 1982.

29. Robinzon, B., Koike, T. I., Neldon, H. L., Kinzler, L., Hendry, I. R. y El Halawani, M. E.: *British Poultry Sci.*, 29, 639-652, 1988.
30. Rodriguez, E. M.: En: «Peptides hormones and behaviour» (C. B. Nemeroff y A. J. Dunn eds). Spectrum Publ. Inc., Nueva York, pp. 1-35, 1984.
31. Sherman, T. G., Day, R., Civelli, O., Douglas, J., Herbert, E., Akil, H. y Watson, S. J.: *J. Neurosci.*, 8, 3785-3796, 1988.
32. Sterberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J. y Meyer, H. G.: *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315-333, 1970.
33. Sheela, R. y Pandalaj, K. R.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11, 257-261, 1968.
34. Stricker, E. M., Hosutt, J. A. y Verbalis, J. G.: *Am. J. Physiol.*, 252, 889-896, 1987.
35. Uchiyama, M., Murakami, T. y Pang, P. K. T.: *10th. Int. Symp. Comp. Endocrinol.*, Abstracts. Cooper Mountains, Colorado USA, 1985.
36. Van Wimersma Greidanus, Tj. B., Ten Haaf, J. A. y Mens, W. B. J.: En «Regulation of pituitary function» (Tj. B. van Wimersma-Greidanus y S. W. J. Lamberts, eds.), Karger, Basilea, 1985, pp. 197-212.

