

## Efecto de la salinidad ambiental sobre las células melanotrópicas de la dorada (*Sparus aurata* L.)\*

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

Departamentos de Biología Celular y Biología Animal  
Facultad de Ciencias  
29071 Málaga (España)

(Recibido el 6 de noviembre de 1992)

J. M. MANCERA, P. FERNÁNDEZ-LLEBREZ and J. M. PÉREZ-FÍGARES.  
*Influence of the Environmental Salinity on Melanotropic Cells in the Gilthead (Sparus aurata L.).* Rev. esp. Fisiol., 49 (2), 115-120, 1993.

The influence of the environmental salinity on the MSH cells of the *pars intermedia* in the euryhaline teleost *Sparus aurata* has been investigated. Control animals stayed in sea water (39 ‰ salinity), and experimental fish in brackish water (7 ‰ salinity) for two months. For light microscopy, pituitaries were fixed with Bouin fluid and embedded in paraffin. For electron microscopy they were fixed with Karnovsky and embedded in Araldite. Sections were stained with histochemical procedures and immunocytochemistry using an antiserum against human ACTH (1-24). The immunoreaction intensity was measured by microdensitometry, the nuclear area and granule size by planimetry, and the volume occupied by the ACTH cells by volumetry. Whereas the adaptation to brackish water decreased the immunoreactivity to anti-ACTH serum on the MSH cells, the volume and the nuclear area of these cells increased although without statistical significance. These results suggest that the adaptation to hypoosmotic environment elicits an increase in the synthesis and release of MSH and ACTH.

Key words: MSH, ACTH, *Pars intermedia*, Immunocytochemistry, Environmental salinity, Teleost, *Sparus aurata*.

Los teleosteos eurihalinos poseen la capacidad de adaptarse a una amplia gama de salinidades ambientales, gracias a la actividad de sus órganos osmorreguladores:

\* Trabajo parcialmente subvencionado por CICYT MAR88-0751 y la Consejería de Agricultura y Pesca, PEMARES, Junta de Andalucía.

\*\* A quien debe dirigirse la correspondencia. (Tel.: 95-213 19 62. Fax: 95-213 20 00.)

riñón, vejiga urinaria, tracto digestivo, epitelio branquial y opercular. El control neuroendocrino de los mecanismos osmorreguladores (balance hidromineral) implica a un alto número de hormonas, tanto adenohipofisarias como extrahipofisarias, que interactúan entre sí para controlar los diversos órganos osmorreguladores (5, 11, 18).

A nivel adenohipofisario las principales hormonas implicadas en dicho proceso, dependiendo de la especie estudiada, son: prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona estimulante de las glándulas adrenales (ACTH), y producto de secreción de las células PAS+ de la *pars intermedia*. El papel de la hormona melanotropa (MSH) está relacionado principalmente con procesos de melanización (4, 10, 18). Sin embargo, algunos estudios histológicos y ultraestructurales han demostrado la existencia de una moderada activación de las células MSH en *Mugil cephalus* (1, 2), *Gasterosteus aculeatus* (12) y *Boops salpa* (14), adaptados a agua salobre, sugiriéndose su participación en los procesos osmorreguladores en estas especies.

Las células MSH de diversos teleósteos marinos y de agua dulce son reconocidas por antisueros contra la ACTH (6, 7). Las células MSH y ACTH sintetizan un precursor hormonal común, la proopiomelanocortina (POMC), que se procesa de manera diferente según el tipo celular: en las células MSH origina  $\alpha$ -MSH y ACTH, o un péptido similar denominado CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide).

Los anticuerpos anti-ACTH pueden estar reconociendo el precursor POMC y/o la ACTH existente en las células MSH de teleósteos (7, 9, 13).

La dorada, *Sparus aurata*, es un teleósteo eurihalino utilizado en nuestro laboratorio para estudiar la influencia de la salinidad ambiental sobre la actividad de las distintas células adenohipofisarias. El propósito del presente trabajo es estudiar el comportamiento inmunocitoquímico y ultraestructural de las células MSH de la *pars intermedia* en doradas aclimatadas a agua de mar (39 ‰ salinidad) y a agua salobre (7 ‰ salinidad). Los resultados se discuten en relación al posible papel de las células MSH en los procesos osmorreguladores de *Sparus aurata* y de otros teleósteos eurihalinos.

## Material y Métodos

**Animales.** — Los ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) (150-200 g de peso) se separaron en dos poblaciones ( $n = 10$  cada una): aclimatados a agua de mar (AM, 39 ‰ salinidad); aclimatados a agua salobre (AS, 7 ‰ salinidad). Los ejemplares se adaptaron gradualmente a AS durante los meses de noviembre-diciembre (1989), y se mantuvieron durante dos meses más (enero-febrero, 1990). Permanecieron bajo condiciones naturales de temperatura (10-18 °C) y fotoperíodo, en tanques cilíndricos (1000 l capacidad), provistos de renovación de agua (5 l/min) y oxigenación continua. La alimentación consistió en pota (*Illex* sp.) administrada dos veces al día (9 mañana/6 tarde).

**Procesamiento de las hipófisis.** — Los animales se anestesiaron con 2-fenoxietanol (Sigma) disuelto en el agua (0,5 ml/l), y se sacrificaron por decapitación. Una vez extraídas las hipófisis de cada grupo, 7 de ellas fueron procesadas para microscopía óptica y 3 para microscopía electrónica. El material para microscopía óptica se fijó en Bouin e incluyó en parafina. Las hipófisis procesadas para microscopía electrónica de transmisión se sumergieron en mezcla fijadora de Karvosky, y posteriormente fueron post-fijadas en solución de tetróxido de osmio al 1 % e incluídas en resina Araldita 502.

**Estudio histoquímico e inmunocitoquímico.** — Las secciones sagitales de hipófisis se tiñeron con la tinción de McConnalis: ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y hematoxilina de plomo. El método inmunocitoquímico empleado ha sido descrito en trabajos anteriores (8, 16). Como primer antisuero se ha utilizado uno contra la ACTH humana (Peninsula Laboratoires Inc., Ca), a una dilución de 1:1.500. En *Sparus aurata* este antisuero reacciona con las células ACTH de la *pars distalis rostral* y con las células MSH de la *pars intermedia* (19) (fig. 1).

**Microdensitometría.** — Por cada animal se midió la densidad de inmunorreacción en diez secciones sagitales de la hipófisis obtenidas a diferentes niveles. La técnica microdensitométrica utilizada ha sido descrita anteriormente (15). En el análisis estadístico fue utilizado el test no paramétrico de Wilcoxon.

**Planimetría.** — La superficie ocupada por los núcleos celulares y por los gránulos secretores se calculó en un analizador de imagen Ibas-2000 Kontron. En el caso de los núcleos se midió a partir de microfotografías (1.100 aumentos) de secciones inmunoteñidas con el suero anti-ACTH; se midieron 50 núcleos por ejemplar (número total de núcleos por grupo experimental = 350). En el caso de los gránulos secretores se midió a partir de micrografías de secciones ultrafinas (38.000 aumentos), usándose un total de 400 gránulos por grupo experimental. En el análisis estadístico hemos utilizado la *t* de Student para comparar los valores obtenidos en los dos grupos experimentales.

**Volumetría.** — El análisis volumétrico fue realizado a partir de un estudio planimétrico según el método descrito por RUIJTER y WENDELAAR BONGA (20). El volumen ocupado por las células MSH se expresa como un porcentaje del volumen hipofisario total. En el análisis estadístico hemos usado el test de Wilcoxon como prueba no paramétrica.

## Resultados

La hipófisis de la dorada (*Sparus aurata*) muestra una organización típica de teleósteos, con los terminales axónicos neurohipofisarios en contacto directo con las distintas regiones adenohipofisarias: *pars distalis rostral*, *pars distalis proximal* y *pars intermedia*. En esta última se localizan las células MSH, células PAS+ y células gonadotropas (4, 10, 19).

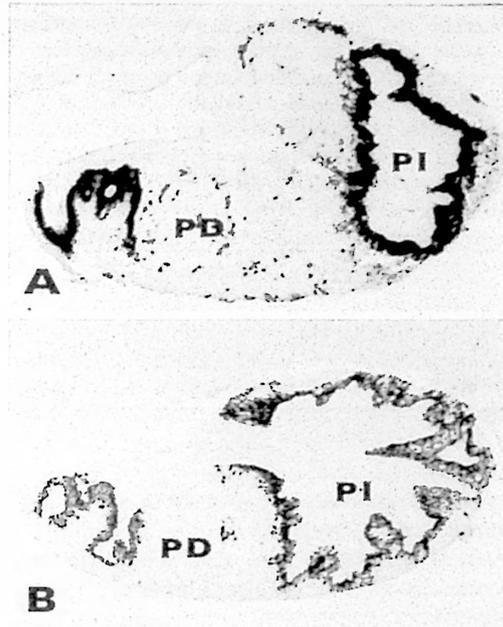


Fig. 1. Inmunotinción de secciones sagitales de la hipófisis de *Sparus aurata* con un anticuerpo anti-ACTH humana ( $\times 60$ ).

A) Animal aclimatado a agua de mar. B) Animal aclimatado a agua salobre. Apréciase la disminución de inmunorreactividad en agua salobre, tanto en las células ACTH de la *pars distalis* (PD) como en las células MSH de la *pars intermedia* (PI).

**Animales adaptados a agua de mar.** — Las células productoras de MSH se distinguen con la técnica de PAS-hematoxilina de plomo, y reaccionan con un antisuero contra la ACTH humana (fig. 1A). La inmunorreactividad a este anticuerpo es intensa y se distribuye homogéneamente por todo el citoplasma. El análisis volumétrico determinó que, en los ejemplares aclimatados a AM, estas células ocupan un 7,82 % del volumen total hipofisario.

Las células, generalmente esféricas, se localizan en contacto con regiones neurohipofisarias, o presentan una larga prolongación que, atravesando la zona de las células PAS+, contacta con los terminales neurohipofisarios. El núcleo se localiza en

Tabla I. Volumen hipofisario, superficie nuclear y diámetro de gránulos secretores en las células MSH de doradas aclimatadas a agua salobre.

El volumen hipofisario se expresa como % del volumen hipofisario total. Utilizando un test de Wilcoxon para el volumen hipofisario y una *t* de Student para la superficie nuclear y diámetro granular, las diferencias no fueron significativas.

Parámetro	Agua de mar	Agua salobre
Volumen hipofisario	7,82±1,89	8,35±1,45
Superficie nuclear (µm <sup>2</sup> )	18,09±1,84	19,09±1,72
Diámetro granular (Å)		
Tipo I	1.853±135	1.875±145
Tipo II	1.150±116	1.161±124

posición excéntrica y presenta una forma ovalada o redondeada.

A nivel ultraestructural, el núcleo presenta cromatina laxa. El retículo endoplasmático es prominente y se dispone alrededor del núcleo. Según el diámetro y la electrodensidad de su contenido, se distinguen dos tipos de gránulos de secreción: tipo I, con un diámetro de 1853 ± 135 Å; tipo II, de 1150 ± 116 Å (tabla I).

*Animales adaptados a agua salobre.* — Las células MSH muestran una distribución similar a la presentada en AM, aunque se aprecia una modificación en la intensidad de la inmunorreacción. El análisis microdensitométrico muestra una disminución de la inmunorreactividad del 5,58 % (*p* < 0,05), respecto a los valores de los ejemplares adaptados a AM (fig. 1B). La disminución en la intensidad de inmunotinción permite distinguir mejor las prolongaciones celulares que se dirigen a la neurohipófisis. Esta pérdida de inmunorreactividad va acompañada por un ligero aumento no significativo del volumen hipofisario ocupado por las células MSH y de la superficie nuclear (tabla I).

El núcleo presenta la cromatina más dispersa que la de los animales de AM y se observa una menor cantidad de gránulos de secreción. Los demás orgánulos cito-

plasmáticos no muestran grandes diferencias respecto a lo observado en AM.

## Discusión

Cuando un teleósteo eurihalino es transferido a un ambiente hipoosmótico, se activan sus mecanismos osmorreguladores, con el objeto de disminuir la pérdida de iones y eliminar el exceso de agua. A nivel hipofisario se aprecia una estimulación de las células de PRL y, según la especie, ACTH (5, 11, 18). Ejemplares de *Sparus aurata* adaptados a AS muestran, frente a los mantenidos en AM, una activación en la síntesis y secreción tanto en las células PRL como ACTH (17); estas hormonas actúan en los procesos osmorreguladores con el fin de mantener un medio interno estable.

En los presentes resultados, los ejemplares de *Sparus aurata* aclimatados a AS muestran una disminución en la intensidad de inmunotinción en las células MSH. Esto indica una menor cantidad de antígeno en las células, que puede interpretarse como una disminución de la síntesis o como un incremento del vertido. El ligero aumento observado en el porcentaje de volumen hipofisario ocupado por este tipo celular, y la existencia de un moderado incremento en la superficie nuclear podrían sugerir un incremento en la actividad de síntesis, con lo que la disminución de la inmunorreactividad podría deberse a incremento en la liberación de hormona. Los resultados de microscopía electrónica, que muestran células con cromatina más laxa y menor número de gránulos de secreción en los animales en AS, apoyan esta idea concordante con lo apreciado en *Mugil cephalus* (1, 2), *Gasterosteus aculeatus* (12), y *Boops salpa* (14).

Existen otras evidencias indirectas que apoyan la activación de las células MSH en ambientes hipoosmóticos. Se ha comprobado una disminución de la inmunorreactividad a un suero anti-CRH en los ter-

minales neurohipofisarios (resultados no publicados), lo que indicaría un incremento del vertido de CRH. Esta hormona, como ocurre en otros teleósteos (10), puede activar tanto las células ACTH como las MSH de *S. aurata*. Además, las doradas aclimatadas a AS muestran tegumentos más claros, lo que puede ser un reflejo del incremento de MSH circulante como se ha descrito en otros teleósteos (1, 2, 14).

No existen datos sobre la actividad osmorreguladora de la MSH en teleósteos. Diversos estudios farmacológicos han demostrado la existencia de una correlación entre el eje hipofisario-interrenal y las células MSH, sugiriéndose la existencia de ACTH o un péptido similar (CLIP) en la *pars intermedia* de teleósteos (9, 13). Estudios mediante radioinmunoensayo han demostrado la existencia de síntesis y liberación de ACTH en la *pars intermedia* de *Salmo gairdneri* (21). En *Boops salpa* se ha sugerido un papel de estimulación de las células MSH sobre el tejido interrenal (14). Además, *Anguilla anguilla* y *S. gairdneri*, mantenidos en condiciones ambientales de color en las cuales las células MSH estaban activadas, muestran mayores niveles de cortisol, indicándose la posibilidad de un incremento en la liberación de ACTH en la *pars intermedia* (3, 21).

Los ejemplares de *S. aurata* adaptados a AS muestran una activación del eje hipofisario-interrenal, con las células ACTH estimuladas y mayores niveles de cortisol respecto a los mantenidos en AM (17). Según lo sugerido en el presente estudio, y como ocurre en otros teleósteos, la activación de las células MSH podría incrementar el vertido plasmático de ACTH por estas células, hormona que sí tiene un efecto osmorregulador a través del cortisol.

#### Agradecimientos

Queremos agradecer al Dr. S. Cárdenas, del C.I.C.E.M. «El Toruño», PEMARES (El Puerto de Santa María, Cádiz), por suministrar los ejemplares utilizados en este estudio y a R. González, F. Re-

plido, A. Rodríguez y J. Rodríguez por el mantenimiento de los mismos.

#### Resumen

Se analiza la influencia de la salinidad ambiental sobre las células MSH de la *pars intermedia* en el teleósteo eurihalino *Sparus aurata*. Los animales controles se mantienen en agua de mar (39 ‰ salinidad), mientras que los ejemplares experimentales permanecen durante dos meses en agua salobre (7 ‰ salinidad). Para microscopía óptica las hipófisis se fijan en Bouin e incluyen en parafina; para el estudio ultraestructural se utiliza en fijador de Karnovsky y se incluyen en araldita. Las secciones de parafina se tiñen con técnicas histoquímicas e inmunocitoquímicas, utilizando un antisuero contra la ACTH humana. La intensidad de inmunotinción se cuantifica por microdensitometría. La superficie del núcleo y de los gránulos secretores se calcula por técnicas planimétricas sobre micrografías ópticas y electrónicas, respectivamente. El porcentaje ocupado por las células MSH en la hipófisis se calcula por volumetría. La adaptación a agua salobre disminuye significativamente la inmunorreactividad al antisuero contra la ACTH humana. El volumen ocupado por las células MSH, y la superficie de los núcleos aumenta ligeramente, aunque no de forma significativa, en ambientes hipoosmóticos. Estos resultados sugieren que en ambientes hipoosmóticos las células MSH activan moderadamente la síntesis y liberación de MSH y, posiblemente, ACTH. La MSH puede ser una hormona implicada en osmorregulación en teleósteos eurihalinos.

Palabras clave: MSH, ACTH, *Pars intermedia*, Inmunocitoquímica, Salinidad ambiental, Teleósteos, *Sparus aurata*.

#### Bibliografía

1. Abraham, M.: *Aquaculture*, 5, 199-204, 1975.
2. Abraham, M.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29, 511-521, 1976.

3. Baker, B. I.: *J. Endocrinol.*, 81, 166P-167P, 1978.
4. Ball, J. N. y Baker, B. I.: En «Fish Physiology», (W.S. Hoar y D. J. Randall, eds.), Academic Press, Nueva York, 1969. Vol. 2, pp. 1-205.
5. Bern, H. A.: *Amer. Zool.*, 15, 937-948, 1975.
6. Doerr-Schott, J.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 28, 487-512, 1976.
7. Follenius, E., Doerr-Schott, J. y Dubois M. P.: *Int. Rev. Cytol.*, 54, 193-223, 1978.
8. 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.
9. Fryer, J. N. y Lederis, K.: *Amer. Zool.*, 26, 1017-1026, 1986.
10. Holmes, R. L. y Ball, J. N.: En «The Pituitary Gland: A Comparative Account», Cambridge University Press, 1974, Londres, pp. 170-220.
11. Johnson, D. W.: *Amer. Zool.*, 13, 799-818, 1973.
12. Leatherland, J. F.: *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 104, 318-336, 1970.
13. Lowry, P. J. y Scott, A. P.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 26, 16-23, 1975.
14. Malo-Michele, M.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27, 1-8, 1975.
15. Mancera, J. M., Fernández-Llebrez, P. y Pérez-Figares, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 46, 183-190, 1990.
16. Mancera, J. M., López Avalos, M. D., Pérez-Figares, J. M. y Fernández-Llebrez, P.: *Cell Tiss. Res.*, 264, 539-548, 1991.
17. Mancera, J. M.: «Influencia de la salinidad ambiental sobre la adenohipófisis y parámetros plasmáticos de la dorada (*Sparus aurata L.*)». Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga, 1991.
18. Olivereau, M. y Ball, J. N.: *Mem. Soc. Endocrinol.*, 18, 57-82, 1970.
19. Quesada, J., Lozano, M. T., Ortega, A. y Agulleiro, B.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 72, 209-225, 1988.
20. Ruijter, J. M. y Wendelaar Bonga, S. E.: *Cell Tiss. Res.*, 249, 691-699, 1987.
21. Scott, A. P. y Baker, B. I.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, 27, 193-202, 1975.