

# Localización de los ARNm de los dos tipos de somatolactina, de la hormona de crecimiento y de la prolactina en hipófisis de dorada *Sparus auratus* L., 1758

M. J. Herrero-Turrión<sup>1</sup>, A. Velasco<sup>1</sup>, M. Concepción<sup>2</sup>, R. Durán<sup>2</sup>, R. Rodríguez<sup>1</sup>, J. Aijón<sup>1</sup> y J. Lara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL). Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Campus Unamuno. 37007 Salamanca, España. Correo electrónico: rororo@usal.es

<sup>2</sup> Mariscos de Estero, S. A. Finca El Tambujal. 21400 Ayamonte (Huelva), España

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

## RESUMEN

Se analizó, por hibridación in situ (HIS) no radiactiva, la expresión de ARNm de los dos tipos de somatolactina (SL1 y SL2), hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) en hipófisis de dorada *Sparus auratus* L., 1758. Las distintas oligosondas de somatolactina (SL) empleadas, marcadas en su extremo 5' con biotina o digoxigenina, presentaron una fuerte señal, fundamentalmente en la *pars intermedia* (PI) de la glándula pituitaria, detectándose, por primera vez, células que coexpresan ambas formas. Por otra parte, las oligosondas de GH y PRL mostraron señales de hibridación en la *proximal pars distalis* (PPD) y *rostral pars distalis* (RPD), respectivamente. Además, en el estudio de animales con tres edades y tallas diferentes, producidos por el crecimiento asincrónico de la dorada en cultivo industrial, no se observaron diferencias cualitativas en los niveles de expresión de estas dos formas de SL.

**Palabras clave:** Hibridación in situ, ARNm, familia GH/PRL/SL, glándula pituitaria, *Sparus auratus*.

## ABSTRACT

**Localization of mRNA of two types of somatolactin, growth hormone, and prolactin in the pituitary of gilthead seabream *Sparus auratus* L., 1758**

The mRNA expression of two types of somatolactin (SL1 and SL2), growth hormone (GH), and prolactin (PRL) were analysed by in situ non-radioactive hybridization (ISH) in the pituitary of gilthead sea bream *Sparus auratus* L., 1758. The different SL probes used, 5' end labelled with biotin or digoxigenin, showed a strong signal, mainly in the *pars intermedia* (PI) of the pituitary gland. We found, for the first time, cells that co-express both SL forms. Furthermore, the GH and PRL oligoprobes showed signs of hybridization in the proximal pars distalis (PPD) and rostral pars distalis (RPD), respectively. Moreover, the study of specimens of three ages and different sizes, produced by asynchronic growth of the *S. aurata* under commercial farming conditions, found no qualitative differences in the levels of expression of these two SL forms.

**Keywords:** In situ hybridization, mRNA, GH/PRL/SL family, pituitary gland, *Sparus auratus*.

## INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y la somatolactina (SL), esta última exclusiva de peces, son hormonas pertenecientes a la familia de proteínas GH/PRL y se cree que provienen de un gen ancestral común y desarrolladas por procesos de amplificación y divergencia (Nicoll, Mayer y Rusell, 1986). La SL fue aislada por primera vez en el bacalao atlántico *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (Rand-Weaver *et al.*, 1991), y se produce principalmente en la *pars intermedia* (PI) de la hipófisis de la

mayoría de los peces. La GH y la PRL se producen en las células somatotropas y lactotropas, respectivamente, y están localizadas principalmente en la *proximal pars distalis* (PPD) y *rostral pars distalis* (RPD) de la hipófisis.

La SL ha sido caracterizada exclusivamente en peces (tabla I) mediante el aislamiento de la proteína e identificación de su secuencia aminoacídica, clonación de su ADNc o determinación de la propia secuencia genómica. En todas las especies examinadas, a excepción de los salmónidos, la SL se puede encontrar en dos formas: glicosilada y no

Tabla I. Especies de peces osteictios en las que se han caracterizado las SL. (\*): aunque todavía no se ha publicado la secuencia aminoacídica, está accesible en las bases de datos de GenBank; (s/n): secuencia aminoacídica no incluida en las bases de datos.

		Especie		N.º acceso GenBank	Referencia
Actinopterigios					
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> (Linnaeus, 1758)	hhSL	L02117	Iraqi, Gong y Hew, 1993
"	Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i> (Temminck & Schlegel, 1846)	poSL	M33695	Ono <i>et al.</i> , 1990
"	Soleidae	<i>Solea senegalensis</i> Kaup, 1858	ssSL	U06753	Pendón <i>et al.</i> , 1994
Perciformes	Sparidae	<i>Sparus auratus</i> Linnaeus, 1758	saSL1	P54863	Astola <i>et al.</i> , 1995
"	"	<i>Sparus auratus</i> Linnaeus, 1758	saSL2	P79894	Cavari, Funkenstein y Kawauchi, 2000
"	Siganidae	<i>Siganus guttatus</i> (Bloch, 1787)	sgSL	AB026186	Ayson <i>et al.</i> , 1999
"	Sciaenidae	<i>Sciaenops ocellatus</i> (Linnaeus, 1766)	soSL	AF062520	Zhu <i>et al.</i> , 1999
"	Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	dlSL	AJ277390	Company <i>et al.</i> , 2000
Scorpaeniformes	Cyclopteridae	<i>Cyclopterus lumpus</i> Linnaeus, 1758	clSL	L02118	Iraqi, Gong y Hew, 1993
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	<i>Tetraodon miurus</i> Boulenger, 1902	tmSL	AF253066	Rand-Weaver <i>et al.</i> , 1991*
Gadiformes	Gadidae	<i>Gadus morhua</i> Linnaeus, 1758	gmSL	D10639	Takayama <i>et al.</i> , 1991a,b
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Oncorhynchus keta</i> (Walbaum, 1792)	okSL	D10640	Takayama <i>et al.</i> , 1991a,b
"	"	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	omSL	s/n	Yang, Arab y Chen, 1997
Acipenseriformes	Acipenseridae	<i>Acipenser transmontanus</i> Richardson, 1836	atSL	AB017200	Amemiya <i>et al.</i> , 1999
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	aaSL	U63884	May, Todd y Rand-Weaver, 1997
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	caSL	U72940	Cheng <i>et al.</i> , 1997
Siluriformes	Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque, 1818)	ipSL	AF267991	Tang, 1992
Sarcopterigios					
Lepidosireniformes	Protopteridae	<i>Protopterus annectens</i> (Owen, 1839)	paSL	AB017766	Amemiya <i>et al.</i> , 1999

glicosilada. Además, la alineación de las secuencias aminoacídicas de las SL caracterizadas demuestra que están muy conservadas a lo largo de la filogenia y que posee unas características comunes significativas (figura 1).

La SL ha sido implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos (ver revisión de Kaneko, 1996), como la maduración sexual o, en general, algunos aspectos de la reproducción (Mousa y Mousa, 2000), la respuesta al estrés, la regulación ácido-base y de los niveles de calcio (Kakizawa, Kaneko e Hirano, 1996), el metabolismo de los ácidos grasos y del fosfato (Lu, Swanson y Renfro, 1995; Company et al., 2000) y la adaptación a los fondos oscuros en las especies no salmónidas (Zhu et al., 1999). Las otras dos hormonas, PRL y GH, juegan un papel activo en la regulación del balance hídrico-mineral de los teleosteos eurihalinos (Sakamoto et al., 1997) e intervie-

nen en la modulación de la reproducción (LeGac et al., 1993). Por su parte, la GH regula el crecimiento somático y el metabolismo (Pérez-Sánchez y LeBail, 1999). En general, podemos considerar que la función principal que lleva a cabo la familia de hormonas GH/PRL/SL en los teleosteos es la regulación de diferentes iones.

Recientemente, Cavari, Funkenstein y Kawauchi (2000) han identificado, por primera vez en la dorada, una segunda forma de SL, denominada SL2 para su distinción de SL, única forma caracterizada en las demás especies de peces, y de SL1 en el caso de *S. auratus*. La SL2 se diferencia solamente en 11 aminoácidos de la forma SL1, clonada por Astola et al. (1995). De estos once aminoácidos, siete son sustituidos por otros aminoácidos semejantes en cuanto a su polaridad. Por tanto, dadas las semejanzas tan marcadas entre SL1 y SL2, la técni-

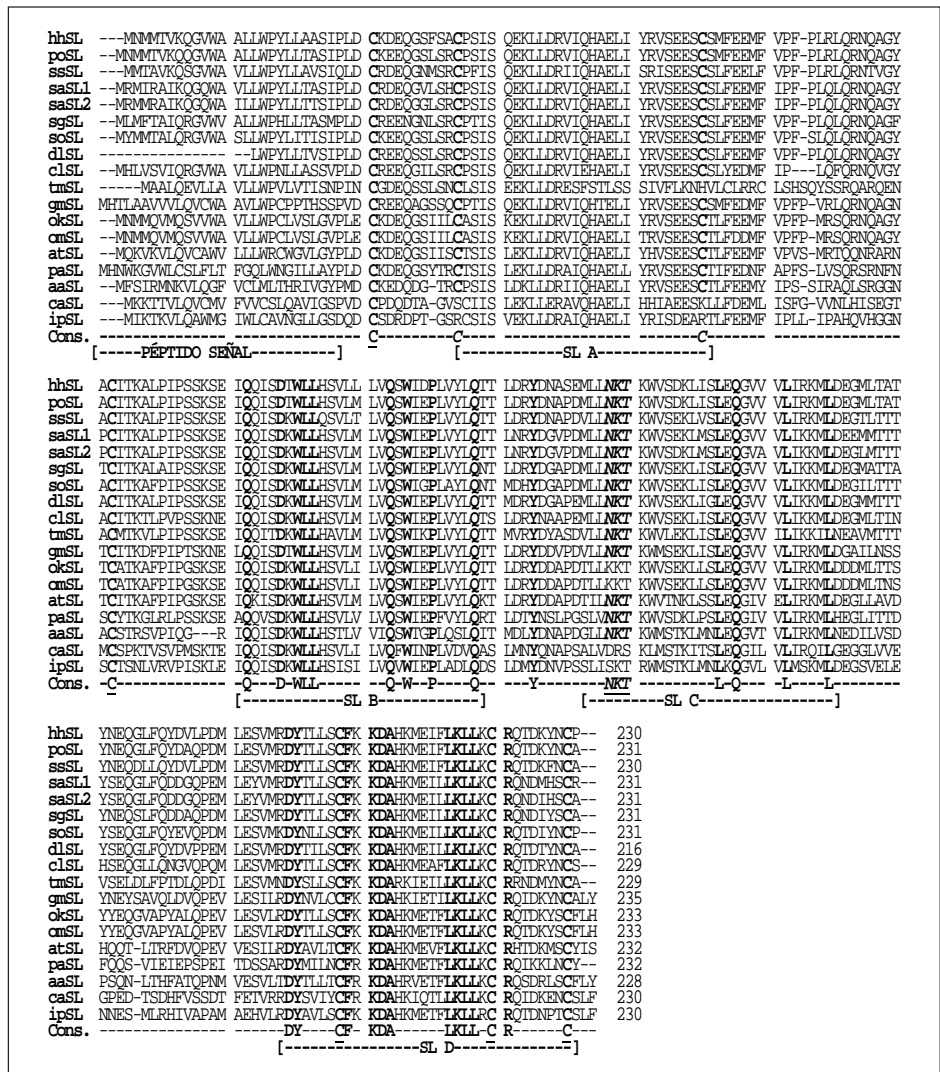


Figura 1. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las SL caracterizadas (ver tabla I) (ClustalW). Los caracteres (-) se insertan para adaptar el alineamiento. (Cons.): marca la secuencia consenso común a todas las SL, con los más importantes residuos de cisteína y el sitio de N-glicosilación subrayados. Los cuatro dominios conservados de las SL y los péptidos señal se indican bajo la secuencia consenso.

ca de HIS ofrece un instrumento ideal para estudiar la distribución de estas proteínas en la hipófisis de la dorada.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

**Preparación de la muestra**

Se utilizaron ejemplares juveniles de *S. auratus* de tres tamaños diferentes para cada edad (87, 188 y 346 días), provenientes de una misma freza (febrero de 2000) de la piscifactoría Maresa (Ayamonte, Huelva). Las soluciones empleadas fueron tratadas con dietilpicrocarbonato que previene la degradación del ARN. Al menos tres peces de cada grupo, previamente anestesiados, fueron descabezados y sus encéfalos fijados por perfusión previa o por inmersión de las muestras, según el tamaño del animal, en una solución de paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino pH 7,3 (PBS). Después de la fijación, se extrajeron las hipófisis, se lavaron varias veces en tampón fosfato pH 7,3 (PB) y se crioprotegieron en sacarosa/PBS, antes de encastrarlas en OCT (Tissue-Tek®). Secciones de criostato de 8-10 µm, transversales y sagitales, se montaron en portaobjetos de poli-L-lisina (Menzel-Glax®) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Todos los procedimientos utilizados en la manipulación de los animales cumplen la normativa de la Directiva de la Comisión Europea (86/609/EEC) y la legislación española (BOE 67/8509-12, 1998).

**Diseño de oligonucleótidos**

Como sondas se utilizaron oligonucleótidos de 24, 30 y 31 nucleótidos marcados en su extremo 5'

con digoxigenina [DIG] <sup>(1)</sup> o biotina [BIOT] <sup>(2)</sup>. El análisis de los alineamientos de secuencias nucleotídicas (datos no mostrados) y aminoacídicas (figura 2) de la familia de proteínas GH/PRL/SL de *S. auratus*, determinó un diseño de las oligosondas en las regiones proteínicas de los dominios D de estas proteínas y en sus zonas no traducidas en los extremos 3' de los ADNc. Las oligosondas antisentido utilizadas en este estudio son: SaSL1a<sup>(1)</sup> y SaSL1c<sup>(2)</sup> **5'tcgacagctgtgcatgtcattttg3'** y SaSL1d<sup>(2)</sup> **5'caggttaattagggcagttaagccactgc3'** complementarias al ADNc de SL1 (673-696 nt y 1281-1311 nt respectivamente) (Cavari, Noso y Kawauchi, 1995); SaSL2a<sup>(2)</sup> **5'tgcacagctgtgtatgtcattctg3'** y SaSL2c<sup>(1)</sup> y SaSL2d<sup>(2)</sup> **5'ggtggagagagggcaaagcattacacctac3'** complementarias al ADNc de SL2 (688-711 nt y 875-904 nt, Cavari, Funkenstein y Kawauchi, 2000); SaGHa<sup>(1)</sup> o SaGHc<sup>(2)</sup> **5'tctcagc-gactcgtcgggtgccagactttg3'** complementarias al ADNc de GH (533-562 nt) (Funkenstein *et al.*, 1991; Cavari *et al.*, 1994) y SaPRLa<sup>(2)</sup> **5'ggaa-atgtgtcctcgcggatgtcattggac3'** complementaria al ADNc de la PRL (534-564 nt) (Santos *et al.*, 1999). Como controles se utilizaron oligosondas sentido de la misma secuencia que los ADNc de *S. auratus* de SL1 (SaSL1b <sup>(1)</sup>), SL2 (SaSL2b <sup>(2)</sup>), GH (SaGHb <sup>(1)</sup>) y PRL (SaPRLb<sup>(2)</sup>).

**Hibridación in situ (HIS)**

Para la realización de las HIS se han empleado los procedimientos descritos por Henderson (1996) con ligeras modificaciones que, en síntesis, consisten en tratamientos previos a la hibridación



Figura 2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la familia de proteínas GH/PRL/SL de *Sparus auratus* (ClustalW). Los caracteres (-) se insertan para adaptar el alineamiento. (Cons.): marca la secuencia consenso común a todas las SL, con los más importantes residuos de cisteína y el sitio de N-glicosilación subrayados. Los cuatro dominios conservados se indican bajo la secuencia consenso y los péptidos señal aparecen subrayados en cada secuencia proteínica.



para evitar las uniones inespecíficas de las oligosondas, una postfijación en solución de PFA en PBS, una acetilación y deshidratación de las secciones. Una prehibridación en una mezcla de hibridación (MH) [MH: 4X citrato sódico salino (SSC), 10 % sulfato dextrano, 1X Denhardt's, 50 % formamida deionizada, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, 20 unit/ml de ARNt de levadura y PB] sin la correspondiente oligosonda, prepara las condiciones de la hibridación. Ésta se realizó durante toda la noche a 45 °C en cámara húmeda con la MH y la correspondiente oligosonda a una concentración de 15-20 ng/ml. Después, las secciones fueron lavadas en condiciones de alta astringencia: un lavado en 0,1 % dodecil sulfato sódico (SDS), 2X SSC y dos lavados en 0,1 % SDS, 0,1X SSC durante 30 minutos a 45 °C y a temperatura ambiente respectivamente. A continuación, las secciones hibridadas con oligosondas marcadas con la DIG se incubaron con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (PA) [1:500, comercial Boehringer Mannheim].

Por otra parte, las secciones con las oligosondas marcadas con BIOT se incubaron con la molécula estreptavidina conjugada con peroxidasa (P) [1 µg/ml, de Jackson-ImmunoResearch]. Ambos tipos de secciones se incluyeron en tampones de revelado. Para las que contienen PA, el procedimiento de revelado se basa en una reacción enzimática con la mezcla de sustratos NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato), produciendo precipitados de color azul oscuro. Por su parte, la enzima P utiliza como sustratos la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produciendo precipitados de color marrón. Las reacciones colorimétricas se bloquearon con varios lavados en agua destilada, y las secciones fueron montadas en una solución de glicerol. En algunos casos, para mejorar la visualización de las señales, las secciones se contratiñeron en hematoxilina ácida.

Se han realizado varios controles de las HIS. (1): secciones incubadas en la MH sin la oligosonda correspondiente; (2): secciones incubadas con la MH conteniendo el oligonucleótido sentido correspondiente; (3): secciones hibridadas con las respectivos oligosondas antisentido, pero no incubadas con el anti-digoxigenina-PA o estreptavidina-P que correspondería en cada caso. Los resultados de todos ellos fueron negativos.

## Doble hibridación *in situ*

Se llevaron a cabo dos tipos de marcaciones utilizando esta técnica. (a): una hibridación con oligosonda marcada con DIG, una posterior con la correspondiente marcada con BIOT, o viceversa, e incubaciones consecutivas con anticuerpos anti-digoxigenina-PA y estreptavidina-P; (b): empleando dos oligosondas marcadas con biotina, en orden indistinto, pero realizando primero una hibridación con una de las oligosondas y la incubación con estreptavidina-P y, posteriormente, la segunda hibridación con la otra sonda e incubación con estreptavidina-PA (1 µg/ml, de Jackson-ImmunoResearch). En ambos casos las secciones fueron procesadas con DAB, analizadas, lavadas con PBS, procesadas con NBT/BCIP y analizadas nuevamente.

## RESULTADOS

### Especificidad de las distintas oligosondas

Los oligonucleótidos empleados como sondas presentan resultados positivos en las células adenohipofisarias apropiadas. Las diferentes oligosondas de SL no reaccionan con las presumibles células somatotropas y lactotropas situadas en la *pars distalis* de la hipófisis de dorada, y, a su vez, las sondas de GH y PRL no presentan señales de hibridación en las células somatolactotropas. Además, no hemos observado marcación por señales de hibridación en las secciones incubadas únicamente con la MH o las correspondientes oligosondas sentido.

La figura 3 muestra el grado de especificidad de las distintas oligosondas de SL utilizadas. Secciones hipofisarias adyacentes incubadas con distintas oligosondas de SL presentan resultados idénticos en condiciones de alta astringencia, indicando una gran especificidad, fundamentalmente en las sondas con más alta homología. Así, comparando los resultados obtenidos con las oligosondas SaSL1a/c y la SaSL2a, con una homología del 83,3 % y específicamente complementarias al ARNm-SL1 y ARNm-SL2, respectivamente, no presentan reacción cruzada entre ellas. También los análisis de las sondas SaSL1a/c *vs.* SaSL1d y SaSL2a *vs.* SaSL2c/d demuestran que son complementarias al ARNm-SL1 y ARNm-SL2, respectivamente. Por tanto, en este trabajo se han empleado sin distinción los diferentes tipos de oli-

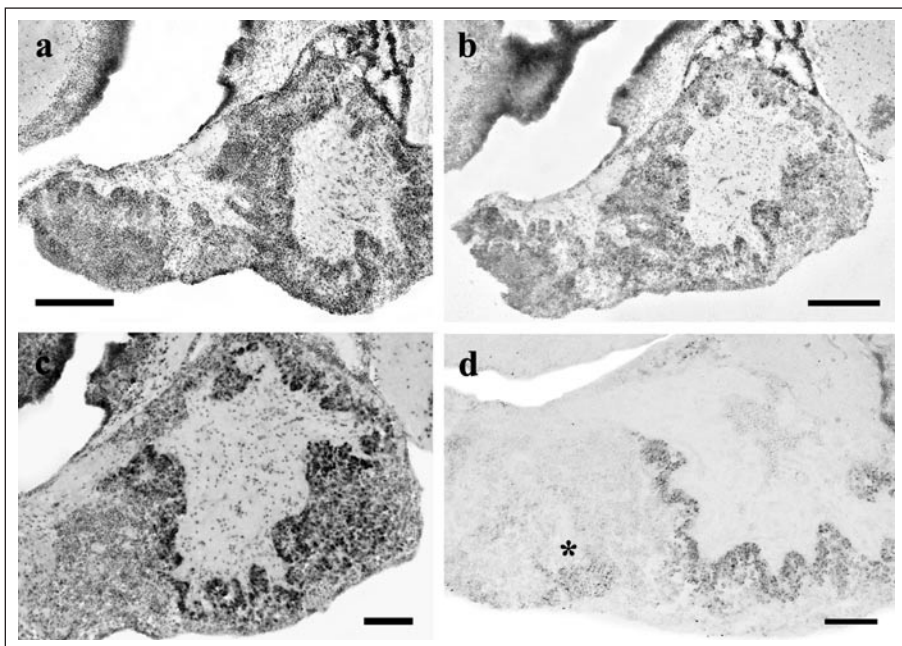


Figura 3. Secciones medio-sagitales de la hipófisis de animales juveniles de *S. auratus* de 346 días. (a): señales de HIS de oligosonda para SL1 (SaSL1a). (b): señales de HIS de oligosonda para SL1 (SaSL1d); barra de escala: 200 mm. (c): señales de HIS de oligosonda para SL2 (SaSL2c). (d): señales de HIS de oligosonda para SL2 (SaSL2d); barra de escalas: 100 mm. (\*): células de SL presentes en la PPD. a, b y c están contrateñidos con hematoxilina ácida.

gsondas de SL para la dorada, dado que las sondas diseñadas en la región proteínica producen unos resultados idénticos que las diseñadas en la zona no traducida de los ADNc (figura 3).

**Distribución de las señales de hibridación**

El análisis de las señales de hibridación empleando las oligosondas de SL en HIS dobles (figura 4) y

de las secciones adyacentes de las HIS simples (figura 3a,b) no han mostrado diferencias en el patrón de distribución de las células que expresan los dos SL. La localización de las señales de hibridación con las oligosondas SaSL1 es coincidente con las de las oligosondas SaSL2. Ambos ARNm-SL aparecen colocalizados en las mismas células de la hipófisis de la dorada (figura 4c,d). La mayoría de las células de SL se distribuyen en la PI formando un cordón alrededor de la neurohipófisis (NH) (figuras 3 y 4).

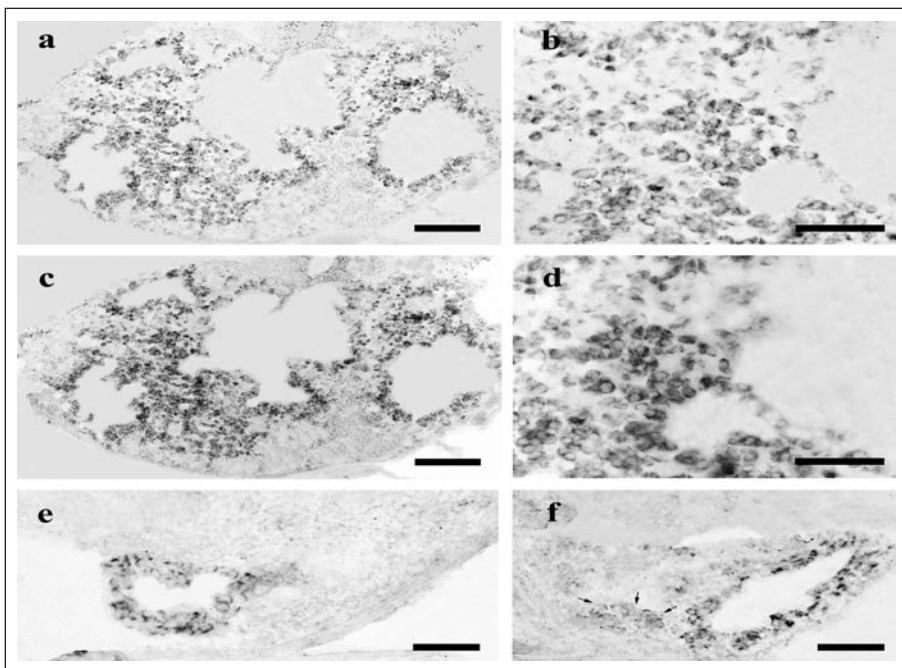


Figura 4. Sección transversal de la PI hipofisaria de animales juveniles de *S. auratus* de 188 días. (a): señales de HIS para SL2; (b): doble HIS (SL2 y SL1) de la sección mostrada en a; (c): detalle de a; (d): detalle de c; (e y f): secciones sagitales de hipófisis de talla pequeña y grande, respectivamente. Barra de escalas: (a, c, e y f): 100 mm; (b y d): 50 mm.

En secciones transversales se muestra que algunas células positivas a estas sondas están presentes en porciones más internas de la PI (figura 4). También se han observado señales de hibridación débiles en pequeños grupos de células en la región ventral de la PPD (figura 3d), mientras que no han sido detectadas en la RPD. Las señales de hibridación dentro de las células que coexpresan las SL se sitúan en el citoplasma y, fundamentalmente, en uno de sus polos celulares.

Con la oligosonda SaGHa se observan señales de hibridación en alto número de células de la PPD de la hipófisis. En esta área de la glándula pituitaria, y fundamentalmente en su zona media-dorsal, las células inmunoreactivas a GH (ir-GH) forman una capa celular a modo de collar alrededor de la NH (figura 5b,c,d,e). La marcación de células somatotropas se sitúa en el citoplasma y, principalmente, en uno de los polos celulares. Con el oligonucleótido para la PRL se observan señales de hibridación en las células adenohipofisarias que ocupan la mayor parte de la RPD (figura 5a,b,d,f). Analizando las células de PRL se aprecia que los núcleos ocupan la mayor parte del volumen celular. Para estas dos últimas sondas, las HIS dobles di-

ferencian claramente las células marcadas con el cromógeno/substrato DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las lactotropas, y las del substrato con NBT-BCIP, somatotropas (figura 5b,d), no observándose células que colocalizan ambas marcaciones, es decir, células mamomatropas que coexpresen la GH y la PRL.

Finalmente, en la figura 4e,f se muestra que no hay diferencias cualitativas significativas en la distribución de las señales de hibridación de los ARNm-SL en doradas de una misma edad y de tres tallas distintas.

## DISCUSIÓN

Hasta el momento se han realizado distintos estudios inmunohistoquímicos (IHQ) de SL, GH y PRL en dorada (Power y Canario, 1992; Villaplana *et al.*, 1997; Villaplana *et al.*, 2000) y un único estudio de HIS en células que expresan la PRL (Santos *et al.*, 1999), determinándose diferencias probablemente debidas a los distintos materiales (anticuerpos) y metodologías empleados en los estudios. Por tanto, la necesidad de la puesta a punto de una técnica experimental de alta especificidad, sensibili-

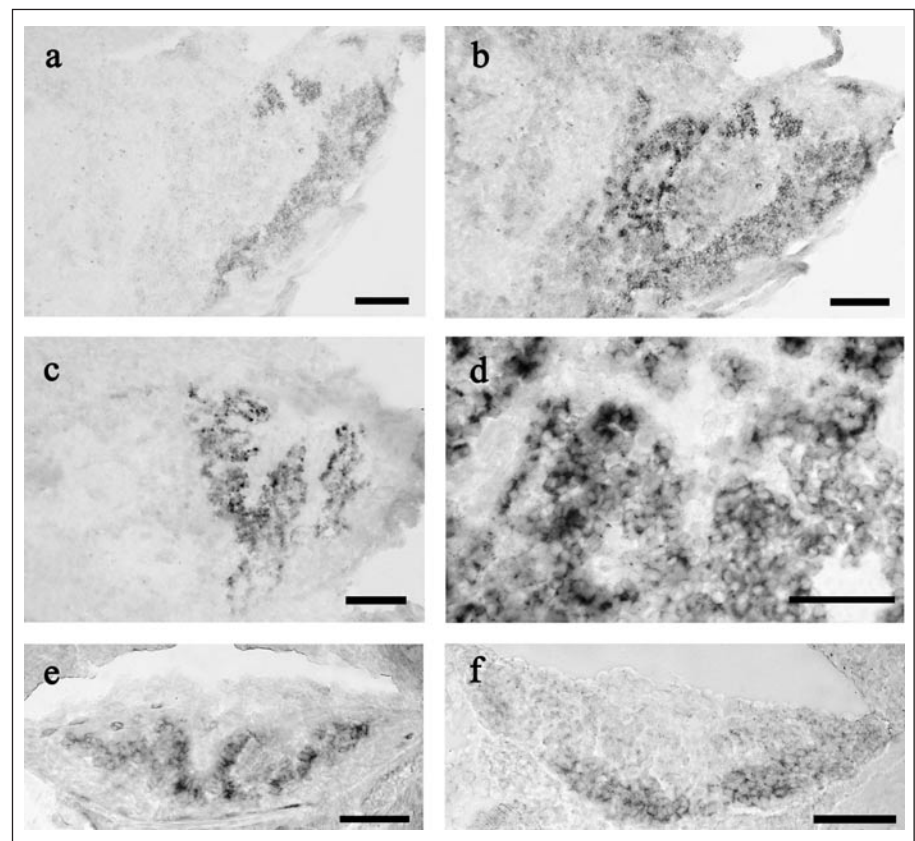


Figura 5. Secciones sagitales de hipófisis de *S. auratus* de 188 días post-eclosión (a, b, c, d) y secciones transversales de hipófisis de *S. auratus* de 87 días post-eclosión (e, f). (a): simple HIS para PRL; (b): doble HIS para PRL y GH de a; (c): simple HIS para GH; (d): detalle de doble HIS para GH y PRL; (e y f): secciones adyacentes (de 10 mm) para GH y PRL respectivamente. Barra de escalas: (a, b y c): 100 mm; (d, e, f): 50 mm.



dad y fácilmente reproducible, como las HIS no radioactivas que proponemos, se hace indispensable para el análisis de la expresión de hormonas hipofisarias.

En diferentes especies de peces la localización de células productoras de SL se ha determinado fundamentalmente por estudios IHQ (Olivereau y Rand-Weaver, 1994; Dores *et al.*, 1996; Vissio *et al.*, 1997; Villaplana *et al.*, 1997; Salam *et al.*, 2000). De este modo, las células ir-SL se han localizado principalmente en la PI de la hipófisis, bordeando el tejido neurohipofisario. La presencia de células ir-SL ha sido descrita en numerosas especies (tabla I), suponiéndose su universalidad en todos los teleosteos, aunque en *Gymnothorax meleagris* (Shaw, 1795) no se ha detectado mediante estudios IHQ esta proteína (Dores *et al.*, 1996). Por consiguiente, dadas las limitaciones de la técnica IHQ y la reciente clonación en *S. auratus* de un segundo tipo de SL, con muy pocas diferencias respecto al primero (Cavari, Funkenstein y Kawauchi, 2000), el empleo de la HIS se hace necesario para analizar los patrones de distribución de sus ARNm.

Para ello, en primer lugar se optimizaron las condiciones de la HIS para esta especie y la detección específica de sus ARNm. La utilización de oligosondas no radioactivas, marcadas en su extremo 5' con BIOT o DIG, se ha evidenciado como un método con alta especificidad y sensibilidad. También se ha demostrado una gran especificidad de las oligosondas empleadas en este estudio. Las oligosondas de SL, dos o tres oligonucleótidos que son complementarios al mismo transcrito de ARNm, tanto en su zona traducida como en la no traducida, presentan un grado de similitud muy alto, del 84 % (SaSL1a ó SaSL1c, y SaSL2a) y, a pesar de ello, y en condiciones de alta astringencia, se ha determinado que son altamente específicas (figura 3). En este aspecto, otros estudios (Sommer *et al.*, 1990), empleando oligosondas con una similitud más alta, del 92 %, demuestran que son altamente específicas en condiciones de alta astringencia. Por tanto, este trabajo puede utilizar ambos tipos de sondas de SL, complementarias a la región proteínica o a la zona no traducida de los ADNc.

Las dobles HIS (figura 4) y secciones adyacentes de simples HIS (figura 3) han demostrado que ambos tipos de SL de *S. auratus* se coexpresan en las mismas células, situándose principalmente en la PI de la hipófisis formando un cordón de células al-

rededor de la NH, como en otras especies de teleosteos (Kaneko *et al.*, 1993). Además, hay señales de hibridación en células que forman agrupaciones en porciones más internas de la propia PI (figura 4a,c), como también lo observaron por IHQ, en esta misma especie, Villaplana *et al.* (1997). También, aunque con expresión más débil, se encuentran células positivas a las SL en grupos celulares aislados, principalmente en la zona ventral de la PPD (figura 3d), como en distintas especies del género *Oncorhynchus* Suckley, 1861 y en *Seriola dumerili* (Risso, 1810) (Olivereau y Rand-Weaver, 1994), lo que sugiere diferentes actividades, según el patrón de distribución dentro de la propia hipófisis. La proximidad de las células somatotropas al tejido neural, mostrando a menudo procesos celulares que contactan con las ramas neurohipofisarias, sugiere que éstas están reguladas por sustancias neurohipotalámicas (Moons *et al.*, 1989). En relación a las células positivas a las SL en *S. auratus*, se aprecia que las señales de hibridación se sitúan en el citoplasma, y se centran, principalmente, en uno de sus polos (figura 4), al igual que en otras especies (Olivereau y Rand-Weaver, 1994). Finalmente, cabe destacar que toda la distribución de las células de SL en *S. auratus* mostrada en el presente trabajo por HIS coincide con la localización inmunohistoquímica de la única forma proteínica de SL conocida en ese momento (Villaplana *et al.*, 1997).

Las oligosondas SaGHa y SaPRLa dan intensas señales de hibridación en la PPD y RPD de la hipófisis, coincidiendo con las zonas donde, por métodos IHQ, se han detectado células somatotropas y lactotropas respectivamente, tanto en la especie que nos ocupa (Power y Canario, 1992; Villaplana *et al.*, 2000) como en otras especies de vertebrados (Frawley y Bloockfor, 1989). Además, conviene apuntar que las señales inmunoreactivas a la oligosonda para la PRL presentan pequeñas diferencias en los grados de intensidad, por lo que se deduce que distintas células lactotropas son capaces de expresar la hormona de forma desigual.

La distribución de los ARNm de GH y PRL en hipófisis de doradas que aquí se describe, no coincide exactamente con la distribución de las correspondientes proteínas (Villaplana *et al.*, 2000). En nuestro trabajo se ha mostrado que en secciones adyacentes de HIS simples (figura 5e,f) y dobles HIS de GH/PRL no se detectan células mammosomatotropas (MS), en discrepancia con lo descrito



mediante IHQ en animales de esta edad por Villaplana *et al.* (2000). Estos autores determinaron que en el rango de edades de 64 a 118 días aparecen células doblemente inmunorreactivas a GH y PRL (células MS). En cambio, en nuestro estudio, a la edad de 87 días no se han observado dobles marcaciones en las señales de hibridación de las oligosondas para la GH y PRL. Por tanto, postulamos que en el estadio de 87 días se podrían detectar las correspondientes proteínas colocalizadas y no estar presentes ambos ARNm. En los estadios tempranos de desarrollo, en este caso en forma de alevín, es crucial la rápida respuesta a las necesidades de una determinada proteína/hormona en un momento concreto, por lo que es factible la presencia de un *pool* de proteínas en espera que ya han sido traducidas de los correspondientes ARNm, los cuales ya habrán sido degradados y no habrán continuado su transcripción.

La colocalización de hormonas hipofisarias no es exclusiva de las SL de *S. auratus*, puesto que, específicamente en el caso de la SL, en dos especies de holósteos, *Lepisosteus osseus* (Linnaeus, 1758) y *Amia calva* Linnaeus, 1766, se han descrito células que coexpresan en distinto grado la SL y la hormona estimulante melanotrofa [MSH] en células de la PI (Dores *et al.*, 1996). Además, en la hipófisis de tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852), se han descrito dos formas de PRL que están colocalizadas en las mismas células lactotropas (Nishioka, De Jesús y Hyodo, 1993), por lo que postulamos que la expresión de dos tipos de SL en la dorada, como en otros miembros de la familia GH/PRL/SL que poseen dos formas proteínicas, se produjo a lo largo de la filogenia por duplicación génica, y que ésta se ha mantenido en el mismo tipo celular.

En los grupos de animales analizados en este trabajo no se han apreciado diferencias cualitativas significativas en lo referente a la distribución de la expresión génica de las SL de *S. auratus*. No obstante, la diferencia de volumen/tamaño hipofisario y, por tanto, del número de células en cada uno de estos grupos, podría sugerir una secreción cuantitativa diferente de las SL. De este modo, nuestros resultados indican que en el crecimiento asincrónico de la dorada en cultivo piscícola no hay diferencias significativas en la distribución de la población de células hipofisarias somatolactogénicas, aunque el número de componentes de dicha población pueda diferir.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León y FSE (Sa 30/99 y Sa 103/01) y Feder-CICYT (1FD97-1739).

## BIBLIOGRAFÍA

- Amemiya, Y., Y. Sogabe, M. Nozaki, A. Takahashi y H. Kawauchi. 1999. Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114: 181-190.
- Astola, A., C. Pendon, M. Ortiz y M. M. Valdivia. 1995. Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104: 330-336.
- Ayson, F. G., E. G. de Jesús, Y. Amemiya, S. Moriyama, T. Hirano y H. Kawauchi. 1999. Isolation and cDNA cloning of somatolactin in rabbitfish (*Siganus guttatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 292-300.
- Cavari, B., B. Funkenstein y H. Kawauchi. 2000. Cloning of a second variant of somatolactin-encoding cDNA from the gilthead seabream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 145-150.
- Cavari, B., P. Y. LeBail, B. Levavi-Sivan, P. Melamed, H. Kawauchi y B. Funkenstein. 1994. Isolation of the growth hormone and *in vitro* translation of the mRNA isolated from pituitaries of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 621-629.
- Cavari, B., T. Noso y H. Kawauchi. 1995. Somatolactin, a novel pituitary protein: isolation and characterization from *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4: 117-122.
- Cheng, K. W., Y. H. Chan, Y. D. Chen, K. L. Yu y K. M. Chan. 1997. Sequence of a cDNA clone encoding a novel somatolactin in goldfish, *Carassius auratus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 282-287.
- Company, R., J. A. Caldach-Giner, M. Mingarro y J. Pérez-Sánchez. 2000. cDNA cloning and sequence of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 127: 183-192.
- Dores, R. M., N. E. Hoffman, T. Chilcutt-Ruth, A. Lancha, C. Brown, L. Marra y J. Youson. 1996. A comparative analysis of somatolactin-related immunoreactivity in the pituitaries of four neopterygian fishes and one chondrosteian fish: an immunohistochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 79-87.
- Frawley, L. S. y F. R. Bloockfor. 1989. Mammototropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr. Rev.* 12: 337-355.
- Funkenstein, B., T. T. Chen, D. A. Powers y B. Cavari. 1991. Cloning and sequencing of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene* 103: 243-247.
- Henderson, Z. 1996. *In situ* hybridization techniques for the brain. *IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences* (Oxford) 17: 156 pp.

- Iraqi, F., Z. Gong y C. L. Hew. 1993. Isolation and characterization of somatolactin genes from cold water marine teleost lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and habilit (*Hippoglossus hippoglossus*). *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 2: 96-103.
- Kakizawa, S., T. Kaneko y T. Hirano. 1996. Elevation of plasma somatolactin concentrations during acidosis in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 199: 1043-1051.
- Kaneko, T. 1996. Cell biology of somatolactin. *Int. Rev. Cytol.* 169: 1-24.
- Kaneko, T., S. Kakizawa, T. Yada y T. Hirano. 1993. Gene expression and intracellular localization of somatolactin in the pituitary of rainbow trout. *Cell Tissue Res.* 272: 11-16.
- LeGac, F., O. Blaise, A. Fostier, P. Y. LeBail, M. Loir, B. Mourot y C. Weil. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11: 219-232.
- Lu, M., P. Swanson y J. L. Renfro. 1995. Effect of somatolactin and related hormones on transport by flounder renal tubule primary cultures. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 268: R577-R582.
- May, D., C. M. Todd y M. Rand-Weaver. 1997. cDNA cloning of eel (*Anguilla anguilla*) somatolactin. *Gene* 188: 63-67.
- Moons, L., M. Cambrè, F. Ollevier y F. Vandesande. 1989. Immunocytochemical demonstration of close relationships between neuropeptidergic nerve fibers and hormone-producing cell types in the adenohypophysis of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 270-283.
- Mousa, M. A. y S. A. Mousa. 2000. Implication of somatolactin in the regulation of sexual maturation and spawning of Mugil cephalus. *J. Exp. Zool.* 287: 62-73.
- Nicoll, C. S., G. L. Mayer y S. M. Rusell. 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7: 169-203.
- Nishioka, R. S., E. G. de Jesús y S. Hyodo. 1993. Localization of mRNAs for a pair of prolactins and growth hormone in the Tilapia pituitary using in situ hybridization with oligonucleotide probes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 72-81.
- Olivereau, M. y M. Rand-Weaver. 1994. Immunoreactive somatolactin cells in the pituitary young, migrating, spawning and spent chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 141-151.
- Ono, M., Y. Takayama, M. Rand-Weaver, S. Sakata, T. Yasunaga, T. Noso y H. Kawauchi. 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *P. NAS (US)* 87: 4330-4334.
- Pendón, C., J. P. Martínez-Barberá, J. Pérez-Sánchez, R. B. Rodríguez, H. Grenett y M. M. Valdivia. 1994. Cloning of the sole (*Solea senegalensis*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene* 145: 237-240.
- Pérez-Sánchez, J. y P. Y. LeBail. 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177: 117-128.
- Power, D. M. y A. V. Canario. 1992. Immunocytochemistry of somatotrophs, gonadotrophs, prolactin and adrenocorticotropin cells in larval sea bream (*Sparus auratus*) pituitaries. *Cell Tissue Res.* 269: 341-346.
- Rand-Weaver, M., T. Noso, K. Muramoto y H. Kawauchi. 1991. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry-US* 30: 1509-1515.
- Sakamoto, T., B. S. Shepherd, S. S. Madsen, R. S. Nishioka, K. Siharath, N. H. Richman, H. A. Bern y E. G. Grau. 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106: 95-101.
- Salam, M. A., H. Ando, M. Ban, H. Ueda y A. Urano. 2000. Immunocytochemical analysis of pituitary cells in pre-spawning chum salmon. *Zool. Sci.* 17: 805-819.
- Santos, C. R., L. Brinca, P. M. Ingleton y D. M. Power. 1999. Cloning, expression, and tissue localisation of prolactin in adult sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 114: 57-66.
- Sommer, B., K. Keinanen, T. A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann y P. H. Seeburg. 1990. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249: 1580-1585.
- Takayama, Y., M. Ono, M. Rand-Weaver y H. Kawauchi. 1991a. Greater conservation of somatolactin a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family than of growth hormone in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 366-374.
- Takayama, Y., M. Rand-Weaver, H. Kawauchi y M. Ono. 1991b. Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol. Endocrinol.* 5: 778-786.
- Tang, Y. 1992. *A study on the catfish (Ictalurus punctatus) growth hormone gene family: structures of growth hormone and prolactin genes and somatolactin cDNA, their evolutionary implication and expression in the pituitary gland.* Tesis doctoral. Universidad de Maryland. Citada en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list\\_uids=8745515&dopt=GenPept](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=protein&list_uids=8745515&dopt=GenPept)
- Villaplana, M., A. García Ayala, M. P. García Hernández y B. Agulleiro. 1997. Ontogeny of immunoreactive somatolactin cells in the pituitary of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei). *Anat. Embryol.* 196: 227-234.
- Villaplana, M., A. García-Ayala, E. Chaves-Pozo y B. Agulleiro. 2000. Identification of mammosomatotropes, growth hormone cells and prolactin cells in the pituitary gland of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) using light immunocytochemical methods: an ontogenic study. *Anat. Embryol.* 202: 421-429.
- Vissio, P. G., G. M. Somoza, M. Maggese, D. A. Paz y C. A. Strussmann. 1997. Structure and cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisheries Science* 63: 64-68.
- Yang, B. Y., M. Arab y T. T. Chen. 1997. Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106: 271-280.
- Zhu, Y., Y. Yoshiura, K. Kikuchi, K. Aida y P. Thomas. 1999. Cloning and phylogenetic relationship of red drum somatolactin cDNA and effects of light on pituitary somatolactin mRNA expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 69-79.