

Incremento del número de gotas coloidales en el hipotálamo de *Natrix maura* por la deshidratación*

P. Fernández-Llebrez**, J. A. Andrades y J. Pérez

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

(Recibido el 20 de marzo de 1989)

P. FERNANDEZ-LLEBREZ, J. A. ANDRADES, and J. PEREZ. *Increase in the Amount of Colloid Droplets in the Hypothalamus of Natrix maura after Dehydration Treatment*. Rev. esp. Fisiol., 45 (4), 385-390, 1989.

The influence of osmotic stress on the number of colloid droplets in the magnocellular neurosecretory nuclei of the water snake *Natrix maura*, has been studied. Five experimental groups of five specimens each, were submitted to dehydration by immersion in sea water for several periods of time (3 to 60 h). The number of colloid droplets, identified by histochemical procedures, was counted in serial sections of the retrochiasmatic nuclei. The study of the mean of each group revealed that the amount of colloids increased with the time of permanence in the hyperosmotic environment (48 h elicited the greatest response). As a conclusion, dehydration seems to activate the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of *N. maura* and, consequently, increases the production of colloid droplets.

Key words: Colloid droplets, Dehydration, Magnocellular hypothalamic nuclei, Retrochiasmatic nucleus, Snake, *Natrix maura*.

Mediante métodos de tinción inespecíficos, SCHARRER (14) mostró la existencia de una destacada actividad secretora en el núcleo preóptico de un teleosteo. Esta fue la primera evidencia de neuronas con una actividad comparable a la de células glandulares y representa el inicio histórico del concepto de neurosecreción. Este concep-

* Trabajo parcialmente subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT n° PB87 0710) y por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía (BOJA 27/9/88).

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

to quedó definitivamente asentado cuando se demostró que el material Gomori positivo que se acumulaba en la neurohipófisis provenía de grandes células secretoras hipotalámicas por transporte axónico (2). La suposición de Scharrer se basaba en la presencia en esta especie de grandes acúmulos de material en forma de grandes gotas, que se denominaron gotas coloidales. Dichas estructuras se teñían con los mismos métodos histoquímicos que demostraban los somas de las neuronas secretoras y el material de secreción acumulado en la neurohipófisis (15).

La presencia de gotas coloidales ha sido

demostrada en el núcleo preóptico de peces y anfibios y en los núcleos magno-celulares de reptiles y aves (6, 10, 11, 16); los mamíferos, en cambio, carecen de ellas. En un estudio histoquímico e inmunocitoquímico se demostró que las gotas coloidales de la lagartija eran dilataciones de cisternas de retículo endoplásmico rugoso (REr) repletas de precursores de material de secreción muy empaquetado (6).

Mientras que en mamíferos el procesamiento del material de neurosecreción es continuo, comenzando en el REr, pasando por el aparato de Golgi (AG) y terminando durante el transporte axónico hacia la neurohipófisis (1, 3, 13), en vertebrados no mamíferos la presencia de gotas coloidales supone una interrupción en el tiempo y en el espacio de este proceso. Estas estructuras constituyen, por tanto, un interesante modelo para el estudio de los procesos celulares de síntesis de hormonas neurohipofisarias.

A pesar del gran interés de estos orgánulos se desconoce cuál es su significación fisiológica. Habida cuenta de que en reptiles, como en la mayoría de los vertebrados, las hormonas neurohipofisarias están implicadas en procesos de osmorregulación (12), los experimentos de deshidratación constituyen un diseño óptimo para inducir la activación de los núcleos secretores de hormonas hipofisarias.

El propósito del presente trabajo es estudiar, en la culebra de río *Natrix maura*, la relación entre la cantidad de gotas coloidales y el grado de actividad de las células que las producen estimuladas por estrés osmótico.

Material y Métodos

Animales. Procedimiento de deshidratación. — Individuos adultos (peso medio 60 g) de ambos sexos de la culebra de río *Natrix maura*, L. capturados en primavera y verano, se trasladaron a acuarios-terra-

rios debidamente acondicionados a temperatura y luminosidad ambientales. Fueron alimentados *ad libitum* con especímenes vivos, larvas y adultos, de *Rana ridibunda*, y alevines de *Liza aurata*.

Después de algunos experimentos preliminares, para determinar el mejor método de deshidratación en esta especie, se optó por producir un estrés osmótico por inmersión de los animales en una solución salina hiperosmótica similar a la del agua de mar (CINa al 3,5 %). Al no existir zonas secas en estos acuarios, los animales permanecían en la solución hiperosmótica durante los tiempos experimentales.

El procedimiento consistió en colocar los grupos de 5 animales durante 3, 6, 24, 48, y 60 h en una pecera que contenía 10 l de la solución hiperosmótica. En la del grupo control el agua era dulce y no había zonas secas.

Procesamiento de los animales. Fijación. — Tanto los animales control como los experimentales fueron anestesiados con tricaina (Sigma; 0,292 mg/g) y perfundidos a través del ventrículo cardíaco con solución Ringer y con la mezcla fijadora de Bouin, durante 30 min. Tras la extracción, los cerebros fueron troceados y sumergidos en el mismo fijador durante 48 h más. Posteriormente se deshidrataron e incluyeron en parafina. Los cortes transversales de parafina (10 µm de grosor) fueron tratados con xileno, hidratados y teñidos.

Para poner de manifiesto las gotas coloidales en los cortes se han utilizado dos métodos histoquímicos: aldehído-fucsina (AF) (5) para la demostración de los productos de secreción proteínáceos, y ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS), para la demostración del componente glicosídico.

Contaje de coloides. — La zona elegida fue el núcleo retroquiasmático (NRQ), el cual puede considerarse como la parte más caudal del núcleo supraóptico. Estudios

preliminares han mostrado que es aquí donde se acumula una mayor cantidad de neuronas productoras de AVT en *N. maura* y donde se aprecia un número mayor de coloides (4).

De cada uno de los animales se tomaron diez secciones transversales contiguas que contienen prácticamente la totalidad de ambos NRQ. En cada una de las secciones se contó el número total de coloides presentes en ambos NRQ. El valor para cada individuo es la media del número de coloides de cada uno de los diez cortes contiguos. Este valor es bastante representativo de la abundancia de coloides y supone una simplificación útil por las siguientes razones: la zona de los NRQs es la que contiene, con diferencia, un mayor número de gotas coloidales con respecto a otras zonas del núcleo supraóptico y el núcleo paraventricular; y se evita el recuento absoluto de coloides, lo cual es bastante complicado si se tiene en cuenta que, dado su tamaño, es frecuente observar un mismo coloide en varios cortes consecutivos. La magnitud de las desviaciones típicas en cada grupo experimental demuestra que no existen grandes diferencias entre los individuos de cada grupo lo cual indica que la respuesta es bastante general en los individuos del grupo. Lo que se mide, por tanto, no es el número absoluto de coloides en cada animal sino la media por sección; es decir, la medida da una idea del número de coloides que se espera ver al observar una sección transversal del hipotálamo a nivel de los NRQ. Posteriormente, para cada grupo, se hallaba la media y desviación típica de los valores obtenidos para los diferentes individuos.

Resultados

Las gotas coloidales aparecen tanto en el núcleo supraóptico como en el paraventricular, siendo especialmente abundantes en el núcleo retroquiasmático (NRQ).

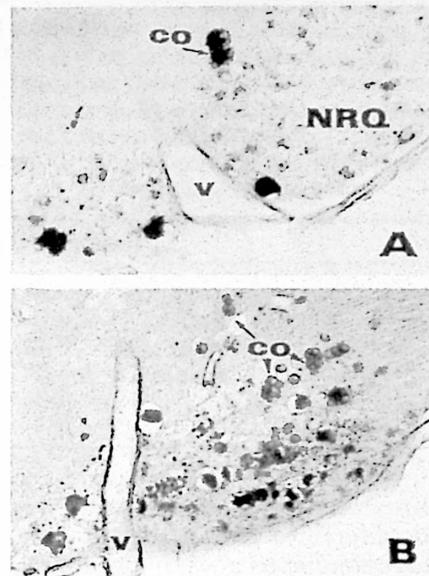


Fig. 1. Cortes transversales del núcleo retroquiasmático (NRQ) de dos culebras, una control (A) y otra sometida a deshidratación por inmersión en agua salada durante 48 horas (B) teñidos con al-dehído-fucsina y PAS, respectivamente.

Con ambos métodos las gotas coloidales (CO), más abundantes en el animal deshidratado, son evidentes. Nótese en esta zona la penetración de grandes vasos (V) desde la leptomeninge.

Miden entre 2 y 12 μm de diámetro y se observan principalmente en el neuropilo entre las células neurosecretoras o en las regiones circundantes. Las gotas coloidales se tiñen muy intensamente con los métodos empleados (AF y PAS) y son fácilmente distinguibles habida cuenta de la menor reacción de las neuronas secretoras a estos colorantes (fig. 1).

Los resultados cuantitativos obtenidos en los grupos experimentales sometidos a deshidratación indican un incremento en el número de gotas coloidales de los NRQ de animales sometidos a deshidratación (tabla I). Los animales que se mantuvieron durante más tiempo en el agua salada presentaban un mayor número de coloides.

Tabla I. Efecto de la deshidratación sobre la cantidad de gotas coloidales presentes en la zona de los núcleos retroquiasmáticos.

En la segunda columna se expresa, para cada grupo, el valor medio de las medias de los cortes medidos en cada individuo. La cantidad de gotas coloidales aumenta con el tiempo de deshidratación hasta que, en 60 h disminuye.

Tiempo (h)	Media \pm DT
Control	0,95 \pm 0,08
3	3,00 \pm 0,12
6	8,50 \pm 0,30
12	24,69 \pm 3,24
48	48,80 \pm 8,70
60	16,32 \pm 2,00

De los diferentes grupos experimentales, el correspondiente a 48 h de estrés osmótico fue el que presentó una mayor respuesta. Sin embargo, los animales sometidos a tiempos mayores (60 h) mostraban una disminución en el número de coloides.

Discusión

En lacértidos se ha demostrado que las gotas coloidales son un material de secreción que, en vez de ser transportado al AG directamente desde el RER, permanece en grandes dilataciones de este último, en forma de precursor, estrechamente empaquetado (6). Es también bastante evidente, en *N. maura* que, mediante un mecanismo citológico aún desconocido, una parte del precursor del material neurosecretor permanece empaquetado en estas estructuras durante un tiempo indeterminado. Aunque por el momento se desconoce mediante qué mecanismos se forman las gotas coloidales, algunos datos indirectos parecen indicar una posible relación con los procesos de glicosilación en el precursor (7-9).

De los resultados de nuestro trabajo se desprende que las condiciones de deshi-

dratación incrementan la cantidad de gotas coloidales en los núcleos magnocelulares hipotalámicos de *Natrix maura*.

Un incremento en el número de coloides en experimentos de deshidratación ha sido también demostrado en aves (11), mientras que en mamíferos se ha observado una acumulación de material de neurosecreción en las cisternas de RER de células neurosecretoras en estas condiciones experimentales (3). Si tenemos en cuenta que la arginina-vasotocina (AVT) está considerada como una hormona osmorreguladora encargada de incrementar la retención de agua en vertebrados no mamíferos (12), sería lógico suponer que en condiciones de deshidratación se incrementase la producción de dicha hormona. En el caso de que las gotas coloidales contuviesen AVT, su incremento sería consecuencia de la activación de las células productoras de dicha hormona. Al ser estas gotas material de neurosecreción acumulado en cisternas de RER el incremento en su número debe indicar, en definitiva, una activación de los procesos de síntesis proteica.

Tanto el destino del material acumulado en las gotas coloidales como su significado funcional son desconocidos. Según Oksche *et al.* (11), podrían ser un reflejo del balance entre síntesis y procesamiento del material neurosecretorio, en este sentido la presencia de estas estructuras indicaría que la síntesis de nuevo material es más rápida que la velocidad de procesamiento de manera que el material se iría acumulando en cisternas dilatadas del RER constituyendo las gotas coloidales. Si el material acumulado representa un material en espera de procesamiento o no, es una cuestión aún por resolver.

El hecho de que los animales deshidratados durante 60 horas presenten menos cantidad de coloide que los animales de 48 horas puede ser debido a que, en estas condiciones, se rozan los límites de tolerancia y pueden esperarse efectos patológicos. De hecho algunos animales en los

experimentos preliminares morían en tiempos de deshidratación próximos.

Resumen

Se estudia la influencia del estrés osmótico en el número de gotas coloidales en los núcleos magnocelulares neurosecretorios de la culebra de río *Natrix maura*. Los animales en cinco grupos experimentales, se someten a deshidratación por inmersión en agua de mar durante diferentes períodos de tiempo (3 a 60 h). El número de gotas coloidales, identificadas por procedimientos histoquímicos, se cuentan en secciones seriadas del núcleo retroquiasmático. El estudio de la media de cada grupo revela que la cantidad de gotas coloidales se incrementa con el tiempo de permanencia en el ambiente hiperosmótico siendo 48 horas el tiempo en el que se consigue la máxima respuesta. La conclusión final es que, al parecer, la deshidratación activa los núcleos neurosecretorios magnocelulares hipotalámicos de *N. maura* y, consecuentemente, incrementa la producción de gotas coloidales.

Palabras clave: Gotas coloidales, Deshidratación, Núcleos magnocelulares hipotalámicos, Núcleo retroquiasmático, Serpiente, *Natrix maura*.

Bibliografía

1. Acher, R.: En «Neurosecretion and the biology of neuropeptides» (H. Kobayashi, H. A. Bern y A. Urano, eds.), Japan Scientific Society Press, Tokyo & Springer-Verlag, Berlin, 1985, pp 11-25.
2. Bargmann, W.: *Z. Zellforsch.*, 34, 610-634, 1949.
3. Castel, M., Gainer, H. y Dellmann, H. D.: *Int. Rev. Cytol.*, 88, 303-459, 1984.
4. 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.
5. Gabe, M.: *Techniques histologiques*. Masson, Paris, 1968.
6. González, C. B. y Rodríguez, E. M.: *Cell. Tissue Res.*, 207, 463-477, 1980.
7. González, C. B., Swann, R. W. y Pickering, B. T.: *Cell. Tissue Res.*, 217, 199-208, 1981.
8. Gross, V., Andus, T., Tran-Thi, T. A., Schwarz, R. T., Deker, K. y Heinrich, P. C.: *J. Biol. Chem.*, 258, 12203-12209, 1983.
9. Lodish, H. F. y Kong, N.: *J. Cell Biol.* 98, 1720-1729, 1984.
10. Murakami, M.: *Z. Zellforsch.*, 59, 684-699, 1963.
11. Oksche, A., Farner, D. S., Serventy, D. L., Wolff, F. y Nichols, C. A.: *Z. Zellforsch.*, 58, 846-914, 1963.
12. Pang, P. K. T., Furspan, P. B. y Sawyer, W. H.: *Amer. Zool.*, 23, 655-662, 1983.
13. Rodríguez, E. M.: En «Peptides hormones and behaviour» (C. B. Nemeroff y A. J. Dunn, eds.). Spectrum Publ. Inc., Nueva York, 1984, pp 1-35.
14. Scharer, E.: *Z. Vergl. Physiol.*, 7, 1-38, 1928.
15. Scharer, E.: *Biol. Bull.*, 101, 106-113, 1951.
16. Scharer, E. y Scharer, B.: En «Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen» (Möllendorff, W. y Bargmann, W., eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1954, Vol 6/V, pp 953-1066.

