

Desarrollo corporal y pubertad en ratas espontáneamente hipertensas

M. L. Rodríguez-Padilla, M. de la Fuente, C. Bellido, E. Aguilar* y R. Aguilar

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
14004 Córdoba (España)

(Recibido el 15 de julio de 1987)

M. L. RODRIGUEZ-PADILLA, M. DE LA FUENTE, C. BELLIDO, E. AGUILAR and R. AGUILAR. *Body Growth and Puberty Occurrence in SHR and WKY Rats*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 63-68, 1988.

The body growth and the onset of puberty in spontaneously hypertensive rats (SHR) and in normotensive controls (WKY) have been studied. In female rats the onset of puberty was determined by both the age and the body weight at which the vaginal opening and first estrus appeared, as well as the ability of estradiol and progesterone to induce pituitary LH release. For this purpose females were injected with estradiol benzoate (0.1 mg/kg) and progesterone (1 mg/rat). Control animals received only oil vehicle. In male rats, puberty was assessed by studying the age and body weight at the time of balano-preputial separation. In another experiment, SH and WKY rats were decapitated on day 30 to determine FSH, LH, PRL, GH and testosterone plasma levels in males and FSH and LH in females. The results obtained show: a) A greater body weight, at all the ages studied (every 4 days between days 28 and 92) in SHR animals. b) A delay in vaginal opening and first estrus presentation in SHR females. c) Absence of spontaneous LH peaks in WKY females. d) Advancement in balano-preputial separation in SHR males and e) Higher plasma FSH levels in SHR males than in WKY males, without differences in other hormones.

Key words: SH rats, WKY rats, Puberty, Vaginal opening, First estrus, Balano-preputial separation.

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) presentan anomalías endocrinas como hiperprolactinemia (2, 21, 22), aumento del peso testicular e hipofisario (19), aumento en los niveles plasmáticos de FSH (2), LH y testosterona (19) y mayor secreción de TSH en respuesta al

frío (14) en relación a sus controles normotensos (WKY).

En el presente trabajo se analizan las posibles diferencias en el crecimiento corporal y en la presentación de la pubertad en ratas hembras y machos SHR y WKY.

Material y Métodos

Se han empleado ratas SHR y WKY criadas en nuestro laboratorio por cruces

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

entre hermanos. Las cepas originales fueron suministradas por Panlab (Barcelona). Durante el tiempo que duró la experimentación, los animales estuvieron sometidos a un régimen luminoso (14 h luz: 10 h oscuridad, encendido a las 6 am) y de temperatura (20° C) controlada. Las camadas fueron igualadas a 8 animales por madre y el destete se realizó el día 28, colocándose los animales en grupos de 4-5 por jaula, con acceso libre a comida (Sanders) y agua.

Experimento 1. — Cada 4 días, entre el día 28 y el 92 se pesó a los animales, anotándose en las hembras la edad y el peso en el momento de la apertura vaginal y en los machos la edad y el peso en el momento de la separación balano-prepuccial. En las hembras y tras la apertura vaginal se monitorizó diariamente la citología vaginal. Para comprobar la existencia de hipertensión en las ratas SHR, se midió la presión sistólica a los 90 días por el método pletismográfico (4), sin necesidad de anestesia. La presión sistólica se expresa como la media, al menos, de cinco determinaciones consecutivas, después de que los animales se hubiesen acostumbrado al método. La presión sistólica fue significativamente superior ($p < 0,01$) en machos SH ($212 \pm 2,45$ mm Hg) que en WKY ($135 \pm 2,67$ mm Hg). Semejantes diferencias se obtuvieron entre hembras SHR y WKY.

Experimento 2. — Ratas SHR y WKY, machos y hembras, de 30 días fueron decapitadas y la sangre del tronco fue rápidamente centrifugada durante 20 min a 4° C. Los plasmas se congelaron hasta las determinaciones hormonales.

Experimento 3. — En los días 18, 20, 22, 25 y 28 se sacrificaron, a las 17.00 horas, hembras SHR y WKY que habían sido inyectadas s.c. 72 y 5 h antes, respectivamente, con benzoato de estradiol (0,1 mg/kg) y progesterona (1 mg/rata).

Los grupos controles fueron inyectados s.c., a los mismos tiempos, con aceite de oliva. Las muestras de sangre se procesaron como en el experimento anterior.

Determinaciones hormonales. — Las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, PRL y GH se analizaron por RIAs de doble anticuerpo, Rat-LH-I-6, Rat-FSH-I-6, Rat-Prl-I-5 y Rat-GH-I-5 fueron marcadas con cloramina T y I^{125} . Los valores plasmáticos se expresaron en ng/ml, utilizando como estándares Rat-LH-RP-2, Rat-FSH-RP-2, Rat-PRL-RP-3 y Rat-GH-RP-2, respectivamente. Todas las muestras fueron medidas por duplicado, siendo la sensibilidad de 7,5, 20, 100 y 100 pg/tubo para LH, FSH, PRL y GH y los coeficientes de variación intraensayo de 6, 9, 9 y 5 % para LH, FSH, PRL y GH, respectivamente.

La determinación de testosterona se realizó según el método de GAY y KERLIAN (8) con ligeras modificaciones. Se utilizó como anticuerpo el S-250 diluido 1:40.000 en PBS con gelatina (0,1 %), EDTA (20 mmol/l) y suero de conejo (0,5 %). La testosterona tritjada (1, 2, 6, 7 3 H (Amersham) fue utilizada como trazador en un volumen de 100 μ l de PBS añadido a cada tubo. Se incubó a temperatura ambiente durante 90 min y posteriormente, tras enfriamiento en hielo, se separaron las fracciones libre y unida por centrifugación tras añadir una mezcla de dextrano-charcoal (625 mg y 62,5 mg en 100 ml de agua destilada) a 4° C. La sensibilidad del método fue 5 pg y la variación intraensayo 5 %.

Análisis estadístico. — Los resultados se expresan como media \pm SEM. Las diferencias entre los grupos se analizaron con la «t» de Student. Las diferencias entre picos espontáneos e inducidos de LH se valoraron con la G de Wolf con o sin corrección de Ku y X^2 de Pearson con corrección de Yates (20).

Resultados

Los machos y hembras SHR (figuras 1 y 2) pesan más que sus controles normotensos, entre los días 28 y 92 de vida.

Las hembras SHR presentan retraso en la apertura vaginal y en el primer estro, que se producen con más peso corporal. Por el contrario, los machos SHR presentan la separación balano-prepucial adelantada y a un mayor peso que las ratas WKY (tabla I). El 96 % de las ratas SHR y WKY presentaron ciclos regulares de una duración de 4-5 días.

A los 30 días de edad los machos SHR presentan niveles elevados de FSH sin diferencias en LH, PRL, GH o testosterona. Las hembras no presentan diferencias en los niveles de FSH y LH (tabla II).

Los niveles de LH en las hembras del experimento 3 (8-15 por grupo) se agrupan en dos subgrupos, uno con valores inferiores a 1 ng/ml y otro con valores superiores a 10 ng/ml. Se considera que

este subgrupo está constituido por animales que muestran picos, espontáneos o inducidos, de LH. La tabla III muestra cómo ninguna rata WKY presenta picos espontáneos de LH a las edades estudiadas, mientras que éstos se observan en un

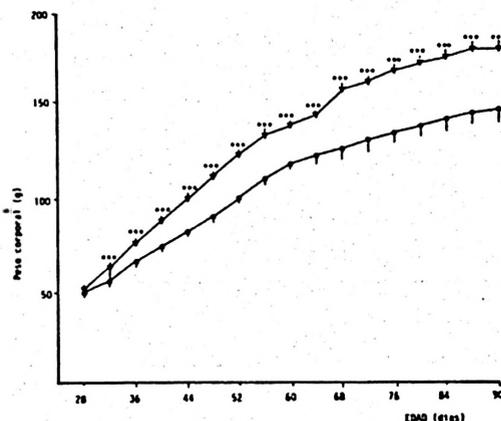


Fig. 2. Evolución del peso corporal (g) en hembras de las cepas SHR (▼) y WKY (●).

El número de animales estudiados en cada cepa y día, osciló entre 13 y 61. Condiciones y símbolos como en la figura 1.

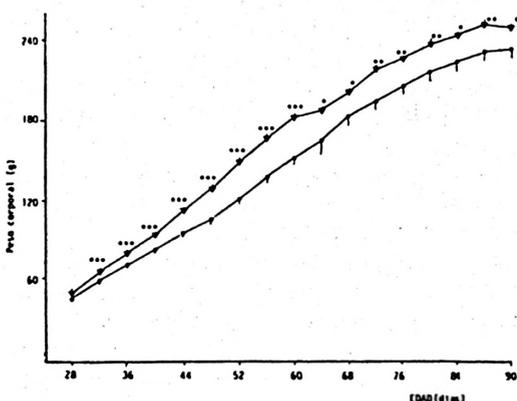


Fig. 1. Evolución del peso corporal (g) en machos de las cepas SHR (▼) y WKY (●).

El estudio se realizó pesando a los animales cada cuatro días. El número de animales estudiados en cada cepa y día, osciló entre 21 y 75. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. El análisis estadístico se realizó mediante la «t» de Student. Los resultados se expresan como media ± SEM.

Tabla I. Edad (días) y peso corporal (g) en el momento de la apertura vaginal, primer estro y separación balano-prepucial (b-p) en ratas SHR y WKY.

Entre paréntesis se indica el número de casos. * p < 0,05; *** p < 0,001 vs SHR («t» de Student).

	SHR	WKY
Apertura vaginal		
Edad	46,00±1,02 (25)	40,00±1,04 (24)***
Peso	108,20±1,85 (25)	76,30±1,43 (24)***
Primer estro		
Edad	46,00±1,04 (24)	41,00±0,96 (22)***
Peso	109,50±2,02 (24)	79,80±1,61 (22)***
Separación b-p		
Edad	47,75±0,29 (12)	49,66±0,68 (12)*
Peso	136,50±1,46 (12)	115,90±2,03 (12)***

Tabla II. Niveles plasmáticos de hormonas (ng/ml) a los 30 días de edad en ratas SHR y WKY. Entre paréntesis se indica el número de casos. T = testosterona. *** $p < 0,001$ vs SHR («t» de Student).

Hormona	SHR	WKY
<i>Machos</i>		
FSH	20,39±1,84 (9)	11,34±1,24 (8) ***
LH	0,89±0,13 (13)	1,09±0,14 (10)
PRL	8,10±1,79 (6)	10,36±1,81 (5)
GH	2,73±0,16 (9)	4,01±0,33 (6)
T	0,60±0,09 (12)	0,49±0,10 (10)
<i>Hembras</i>		
FSH	10,93±1,73 (10)	7,41±1,40 (9)
LH	0,67±0,10 (8)	0,80±0,07 (9)

Tabla III. Frecuencia (%) de presentación de picos de LH (valores superiores a 10 ng/ml) espontáneos e inducidos en ratas hembra SHR y WKY. Cada grupo experimental consta de 8-15 animales.

Edad (días)	Picos espontáneos		Picos inducidos	
	SHR	WKY	SHR	WKY
18	11	0	7	0
20	56	0 ^a	58	67 ^b
22	0	0	47 ^b	20
25	17	0	13	17
28	22	0	22	30

a) $p < 0,01$ vs SHR; b) $p < 0,01$ vs aceite.

porcentaje variable (que oscila entre el 0 % el día 22 y el 56 % el día 20) en las hembras SHR. El tratamiento con benzoato de estradiol y progesterona solamente aumenta significativamente el número de animales que presentan picos de LH en las ratas WKY a los 20 días y en las ratas SHR a los 22 días.

Discusión

Los resultados muestran un mayor peso corporal en las ratas SHR en todas las edades estudiadas. Aunque otros auto-

res han encontrado resultados similares (9), también se ha descrito ausencia de diferencias en el peso corporal (13, 15, 22) e incluso pesos superiores en las ratas WKY (11). Las causas de estas discrepancias pueden deberse a la edad en que se han realizado los estudios o a la existencia de diferentes subcepas de ratas SH. La causa del incremento corporal en ratas SH no es bien conocida, no pareciendo deberse a modificaciones en la ingesta de alimentos (9, 13), en la secreción de GH (6 y resultados presentes), en la retención de sodio (9) o en el volumen de líquidos corporales (18).

Los datos relativos a la presentación de la pubertad muestran una clara diferencia sexual. En las hembras SHR hay retraso en la apertura vaginal y en el primer estro, mientras que en los machos hay un adelantamiento de la separación balanoprepucial. Las diferencias entre ambas cepas no parecen atribuibles al diferente peso corporal, porque aunque algunos autores han establecido la relación entre ambos parámetros (10), otros (1, 17) han señalado que la pubertad no está condicionada por pequeños cambios en el peso corporal.

El retraso en la presentación de la pubertad en hembras SHR (en relación a hembras WKY) no parece debido a una menor secreción de estrógenos ováricos, ya que los niveles plasmáticos de FSH y LH son semejantes en ambas cepas. Recientemente se ha señalado (16) que la apertura vaginal puede ser debida a secreción de testosterona por los ovarios y su posterior conversión en estrógenos, ya que en vagina se ha detectado la existencia de aromatización. Es posible que alteraciones en este mecanismo sean la causa del retraso en la apertura vaginal en hembras SHR.

Las hembras SHR presentan picos espontáneos de LH (valores superiores a 10 ng/ml) en una frecuencia variable entre el día 18 y el 20, en que no son detectables. Por el contrario, ninguna de las ratas

WKY estudiadas los presentó. Estas diferencias y la misma función de los picos espontáneos, son difícilmente explicables, aunque se cree que son debidos a la acción de estrógenos ováricos sobre el sistema nervioso central (5) o a que la inmunización pasiva contra estrógenos no los anula (7). El tratamiento combinado de estradiol y progesterona incrementa significativamente la aparición de picos de LH en las ratas SHR en el día 22 y en las WKY en el día 20. Aunque no existe un estudio cronológico que correlacione presentación de picos inducidos con apertura vaginal y primer estro, estos tres parámetros están retrasados en las ratas SHR en relación a las WKY. ANDREWS *et al.* (3) encuentran, en ratas Holtzmann, picos inducidos de LH a partir del día 16 y hasta el día 34. Las diferencias con los resultados aquí presentados, pueden deberse a las diferentes cepas de ratas empleadas y/o a la diferente metodología.

La separación balano-prepucial, introducido como índice de pubertad en los machos (12), depende de la secreción de andrógenos testiculares. La ausencia de diferencias en los niveles de testosterona entre ambas cepas, hace difícilmente explicables las diferencias en la separación balano-prepucial descritas en este trabajo, aunque es posible que a edades previas a la pubertad, se detecten diferencias en la secreción de andrógenos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias a una ayuda del fondo de Investigaciones Sanitarias. Agradecemos a Dña. Teresa Recio su ayuda técnica, al NIH la donación de los kits para la medida de las hormonas proteicas y al Dr. Niswender la del anticuerpo S-250.

Resumen

En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en sus controles normotensos (WKY) se ha estudiado el desarrollo ponderal y la presentación de la puber-

tad. En las hembras se ha analizado la edad y el peso corporal en el momento de la apertura vaginal y primer estro y la capacidad de inducir picos de LH tras la administración de benzoato de estradiol (0,1 mg/kg) y progesterona (1 mg/rata). Los animales, de ambas cepas, utilizados como controles, fueron tratados con aceite de oliva. En los machos se ha analizado la edad y el peso en el momento de la separación balano-prepucial. Igualmente se han determinado, a los 30 días de edad, los niveles plasmáticos de FSH, LH, PRL, GH y testosterona en los machos y de FSH y LH en las hembras. Los resultados muestran: a) Mayor crecimiento corporal en machos y hembras SHR que en WKY (entre el día 28 y el día 92). b) Retraso en la edad de apertura vaginal y primer estro en las ratas SH. c) Ausencia de picos espontáneos de LH en las hembras WKY. d) Adelanto de la separación balano-prepucial en los machos SH y e) Niveles de FSH superiores en los machos SH sin diferencias en el resto de las hormonas medidas.

Palabras clave: Ratat SH, Ratat WKY, Pubertad, Apertura vaginal, Primer estro, Separación balano-prepucial.

Bibliografía

1. Aguilar, E., Pinilla, L., Guisado, R., González, D. y López, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 40, 83-86, 1984.
2. Amador, A., Steger, R. W., Bartke, A., Johns, A., Hayashi, R. H. y Stallings, M. H.: *J. Androl.*, 4, 67-70, 1983.
3. Andrews, W. W., Mizejewski, G. J. y Ojeda, S. R.: *Endocrinology*, 109, 1404-1413, 1981.
4. Bunag, R. D.: *J. Appl. Physiol.*, 18, 323-327, 1973.
5. Döhler, K. D. y Wutke, W.: *Endocrinology*, 97, 898-907, 1975.
6. Eriksson, E., Dellborg, M., Söderpalm, B., Carlsson, M. y Nilsson, C.: *Life Sci.*, 39, 2103-2109, 1986.
7. Frawley, L. S. y Henricks, D. M.: *Endocrinology*, 105, 1064-1072, 1979.
8. Gay, V. L. y Kerlan, J. T.: *Arch. Androl.*, 1, 257-266, 1978.
9. Herlitz, H., Lundin, J., Henning, M., Aurell, M., Bengt, E., Karlbe, R. G. y Berglund, G.: *Clin. Exper. Hyper. Theory Pract.*, A4, 915-935, 1982.
10. Kennedy, G. C. y Mitra, J.: *J. Physiol.*, 106, 408-418, 1963.

11. Kojima, A., Kubota, T., Sato, A., Yamada, T., Harada, A., Utsumi, M., Sakoda, M., Baba, S., Yamori, Y. y Okamoto, K.: *Endocrinology*, 98, 1109-1115, 1976.
12. Korenbrodt, C. C., Huhtaniemi, I. T., y Weiner, R. I.: *Biol. Reprod.*, 17, 298-303, 1972.
13. Kraly, F. S., Coogan, L. A., Specht, S. M., Tratnner, M. S., Zayfert, C., Cohen, A. y Goldstein, J. A.: *Am. J. Physiol.*, 248, 464-470, 1985.
14. Matilla, J., Mannistö, P. T. y Tuominen, R. K.: *Experientia*, 39, 423-424, 1983.
15. McMurtry, J. P. y Wexler, B. C.: *Endocrinology*, 108, 1730-1736, 1981.
16. Ojeda, S. R., Urbanski, H. F. y Ahmed, C. E.: *Rec. Progr. Horm. Res.*, 42, 385-442, 1986.
17. Ramaley, J. A., y Phares, C. K.: *Endocrinology*, 106, 1989-1993, 1980.
18. Rippe, B., Lundin, S. y Folkow, B.: *Clin. Exp. Hyper.*, 1, 39-50, 1978.
19. Rodríguez Padilla, M. L., Bellido, C., Pinilla, L. y Aguilar, E.: *J. Endocr.*, 113, 255-260, 1987.
20. Sokol, R. R. y Rohlf, F.: *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H. Blume, Madrid, 1969.
21. Sowers, J. R.: *Hypertension*, 3, 544-550, 1981.
22. Steger, R. W., Avila-Jiménez, R., Amador, A. y Johns, A.: *Life Sci.*, 34, 1691-1697, 1984.