

## Efecto de extractos hipotalámicos y de la hormona liberadora de la luteinizante (LH-RH) sobre la síntesis proteica por hipófisis de rata *in vitro*

B. N. Díaz-Chico y J. C. Díaz-Chico

Colegio Universitario de Las Palmas  
División de Medicina  
Departamento de Fisiología y Bioquímica  
Las Palmas de Gran Canaria

(Recibido el 27 de enero de 1977)

B. N. DIAZ-CHICO and J. C. DIAZ-CHICO. *Effect of Hypothalamic Extracts and Synthetic LH-RH on Proteic Synthesis by Rat Hypothalamus in vitro*. Rev. esp. Fisiol., 33, 291-296. 1977.

The incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Leucine in pituitary proteins of rats, *in vitro*, has been studied.

In absence of stimulation, the pituitaries of adult female rats have shown approximately twice the capacity of protein biosynthesis *in vitro* than the pituitaries of prepuberal female rats (21 days old).

For the stimulation *in vitro* of the pituitaries, synthetic LH-RH or hypothalamic extracts from adult or prepuberal female rats were used.

The pituitaries of adult female rats did not respond to any of the stimulation tests employed.

The pituitaries of prepuberal female rats increased their biosynthetic activity significantly, when synthetic LH-RH or adult female rat hypothalamic extract was added to the culture medium. The addition of prepuberal female rat hypothalamic extract did not alter the basic response.

The female prepuberal rats injected during 5 consecutive days with FSH and LH, have shown a greater sensibility to LH-RH *in vitro* than the ones injected with estradiol and progesterone, or with synthetic LH-RH.

Desde el descubrimiento del control hipotalámico sobre la función adenohipofisaria los avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la secreción de gonadotrofinas han sido muy importantes (7, 14, 23). No obstante, los procesos relacionados con el control de la síntesis de la hormona foliculoestimulante

(FSH) y de la hormona luteinizante (LH) no son bien comprendidos.

Los estudios para determinar el efecto de las hormonas hipotalámicas liberadoras de las hipofisarias foliculoestimulante y luteinizante (FSH-RH y LH-RH) sobre la síntesis de FSH y LH en la hipófisis dan resultados contradictorios, habiéndose

se descrito efectos estimuladores de la LH-RH y de los extractos hipotalámicos sobre la síntesis de gonadotrofinas en cultivos de tejido hipofisario (6, 10, 11, 20) o en incubaciones de hemipituitarias (2, 8, 9) así como su carencia de efecto (18, 21, 22, 25, 26).

Las variaciones en la intensidad de secreción de LH y FSH que se producen a lo largo de la vida del animal y la forma en que el hipotálamo las regula han sido bastante estudiadas (1, 3-5, 15, 17, 19). Sin embargo, son muy escasos los datos disponibles en torno al control de la biosíntesis de FSH y LH en la etapa prepúber y las posibles modificaciones que puedan producirse en dicho proceso cuando el animal llega a la edad adulta (19).

Los experimentos aquí presentados fueron diseñados con una triple intención: investigar las capacidades de biosíntesis proteica de las hipófisis de hembras prepúberes y adultas; observar los efectos de los extractos hipotalámicos de ratas hembras prepúberes y adultas sobre la biosíntesis proteica hipofisaria, y analizar las modificaciones en la respuesta hipofisaria a la LH-RH *in vitro* que se puedan producir tras inocular a ratas hembras prepúberes con hormonas hipotalámicas, hipofisarias u ováricas, durante cinco días consecutivos.

### Material y métodos

Se utilizaron ratas Wistar hembras, mantenidas en 14 horas de luz y 10 de oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. En el experimento 1 se emplearon ratas hembras adultas, de pesos comprendidos entre 180 y 250 g como donantes de hipófisis y/o hipotálamos. En el experimento 2 se utilizaron ratas hembras de 21 días, que hasta entonces habían sido amamantadas por sus madres. En el experimento 3 se emplearon ratas de 21 días, que fueron inyectadas subcutáneamente durante los cinco días previos al experimento con uno de los siguientes preparados:

grupos 1 y 2, suero salino (0,25 ml); grupo 3, LH-RH sintético (Beckman) 5  $\mu$ g; grupo 4, FSH 3,5 U.I. y LH 4 U.I. (pergonal, Farma-Lepori); grupo 5, benzoato de estradiol, 50  $\mu$ g (Schering) y progesterona 10 mg (Schering).

En las incubaciones de las hipófisis se utilizó la técnica de MITTLER y MEITES (16) con algunas modificaciones. Los animales eran decapitados en grupos de 3 y rápidamente las hipófisis disecadas y divididas en mitades. Una vez pesadas se transferían a tubos que contenían 0,5 ml de medio Tc 199. En todos los casos se procuró que las dos hemipituitarias que procedían del mismo animal recibieran estímulos diferentes. Después de 10 minutos de preincubación, las hemipituitarias se transferían a otro tubo que contenía 0,5 ml de medio Tc 199 y 0,5  $\mu$ Ci de Leucina- $C^{14}$  (actividad específica 270 mCi/nmol), y el siguiente estímulo:

*Experimentos 1 y 2:* en los grupos 1, 0,1 ml de suero salino (control); en los grupos 2, LH-RH sintética, 10 nmoles (8), y en los grupos 3 y 4 extracto hipotalámico de rata obtenido con HCl 0,1 M según el método de MCCANN *et al.* (13) y neutralizado con bicarbonato de sodio (27). El grupo 3 recibió el equivalente a medio hipotálamo de rata adulta (16) y el grupo 4 el equivalente a un hipotálamo de rata prepúber, siendo en ambos casos idéntica la cantidad de tejido.

*Experimento 3:* El grupo 1 recibió 0,1 ml de suero salino (control). Los grupos restantes 10 nmoles de LH-RH sintética.

Los tubos conteniendo las hemipituitarias con sus correspondientes medios de incubación fueron mantenidos durante 1 hora a 37° C, con agitación continua y bajo una atmósfera de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, fueron rápidamente enfriados a 2° C y lavados con suero salino frío. Se homogeneizaron en 1 ml de suero salino y a cada preparación se adicionó 1 ml de TCA al 20 %.

centrifugando a continuación. Los precipitados se lavaron con 1 ml de TCA al 10 % dos veces, seguidas de centrifugación. El último precipitado fue disuelto en 0,5 ml de solvente 300 (Packcard) y se le añadió 10 ml de PPO al 5 % y dimetil-POPOP al 0,1 % en tolueno. El conteo de la radioactividad de las muestras se efectuó, después de dejarlas toda la noche en la oscuridad a 4° C, en un contador de centelleo líquido Packard (modelo 3390).

### Resultados

La incubación de las hipófisis de ratas adultas con LH-RH sintética, extractos de hipotálamos de hembras adultas o extractos de hipotálamos de hembras prepúberes (experimento 1) no incrementa significativamente la incorporación de leucina- $C^{14}$  en las proteínas hipofisarias (tabla I).

La incubación de las hipófisis de ratas prepúberes en condiciones basales revela una incorporación de leucina- $C^{14}$  significativamente inferior a la encontrada para las hipófisis de las hembras adultas

en las mismas condiciones ( $p < 0,001$ ). Cuando se incubaron en presencia de LH-RH sintética o de extractos de hipotálamos de hembras adultas (experimento 2) se encontraron aumentos significativos de la síntesis proteica hipofisaria. En cambio, la presencia de extractos de hipotálamo de ratas prepúberes (21 días de edad) en el medio de incubación no modifica la respuesta basal de las hipófisis de hembras prepúberes.

Los resultados obtenidos al incubar en presencia de LH-RH sintética las hipófisis de ratas prepúberes que previamente habían sido tratadas con hormonas hipotalámicas, hipofisarias o gonadales (experimento 3), muestran cómo el tratamiento durante 5 días consecutivos con LH-RH sintética o estradiol y progesterona no modifica significativamente la síntesis proteica hipofisaria, obtenida a partir de las hipófisis de los animales control (tabla II). En cambio, un tratamiento previo de las hembras prepúberes con LH y FSH conjuntamente, hace que la síntesis proteica hipofisaria en presencia de LH-RH aumente significativamente respecto de los controles.

Tabla I. Incorporación de leucina- $C^{14}$  a proteínas hipofisarias de rata hembra in vitro en presencia de preparados hormonales hipotalámicos.

E.H.R. = Extracto hipotalámico de rata. N.S. = No significativo. Entre paréntesis, número de incubaciones. Los resultados se expresan en  $\bar{x} \pm S.E.$  Las comparaciones con los testigos (grupos 1) se efectuaron mediante el test «t de Student».

| Grupo                                  | Estímulo            | Peso de tejido hipofisario (mg) | Incorporación (DPM/mg hipófisis) | Comparación vs. grupo 1 |
|----------------------------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <b>EXPERIMENTO 1: Ratas adultas</b>    |                     |                                 |                                  |                         |
| 1                                      | Suero salino (10)   | $7,6 \pm 0,5$                   | $226 \pm 30$                     | —                       |
| 2                                      | LH-RH (7)           | $8,1 \pm 0,7$                   | $318 \pm 18$                     | N.S.                    |
| 3                                      | E.H.R. adulta (6)   | $8,3 \pm 0,5$                   | $223 \pm 26$                     | N.S.                    |
| 4                                      | E.H.R. prepúber (8) | $7,9 \pm 0,3$                   | $269 \pm 31$                     | N.S.                    |
| <b>EXPERIMENTO 2: Ratas prepúberes</b> |                     |                                 |                                  |                         |
| 1                                      | Suero salino (9)    | $3,5 \pm 0,3$                   | $130 \pm 11$                     | —                       |
| 2                                      | LH-RH (11)          | $2,8 \pm 0,4$                   | $280 \pm 23$                     | $< 0,001$               |
| 3                                      | E.H.R. adulta (6)   | $2,9 \pm 0,4$                   | $179 \pm 22$                     | $< 0,05$                |
| 4                                      | E.H.R. prepúber (8) | $3,3 \pm 0,2$                   | $141 \pm 14$                     | N.S.                    |

Tabla II. Incorporación de leucina- $C^{14}$  a proteínas hipofisarias de ratas hembras prepúberes, previamente tratadas con hormonas hipotalámicas, hipofisarias o gonadales, incubadas en presencia de LH-RH *in vitro* (experimento 3).

Todas las incubaciones se realizaron con 10 nM de LH-RH excepto en el grupo 1 que se incubó suero salino. E.H.R. = Extracto hipotalámico de rata. N.S. = No significativo. Entre paréntesis, número de incubaciones. Los resultados se expresan en  $\bar{x} \pm S.E.$  Las comparaciones con los testigos (grupos 2) se efectuaron mediante el test «t de Student».

| Grupo | Tratamiento previo | Peso de tejido hipofisario (mg) | Incorporación (DPM/mg hipófisis) | Comparación vs. grupo 2 p |
|-------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1     | Suero salino (8)   | $3,6 \pm 0,2$                   | $127 \pm 9$                      | —                         |
| 2     | Suero salino (7)   | $2,9 \pm 0,1$                   | $167 \pm 13$                     | —                         |
| 3     | LH-RH (8)          | $3,1 \pm 0,2$                   | $195 \pm 13$                     | N.S.                      |
| 4     | FHS + LH (8)       | $3,6 \pm 0,4$                   | $285 \pm 49$                     | < 0,05                    |
| 5     | Est. + Prog. (8)   | $3,3 \pm 0,2$                   | $228 \pm 32$                     | N.S.                      |

### Discusión

La incorporación de leucina- $C^{14}$  a proteínas hipofisarias de rata en las diferentes situaciones experimentales ensayadas representa sólo una primera aproximación a lo que en realidad ocurre con la FSH y la LH. En presencia de un material tan heterogéneo como un extracto hipotalámico, deben estar sintetizándose y liberándose al medio de incubación varias hormonas simultáneamente. Por ello, la visión que los extractos puede aportar sobre el problema debe quedar reducida a los efectos comparativos entre los que proceden de ratas adultas y aquellos en que las donantes fueron ratas prepúberes. En el mismo sentido, la aportación de la LH-RH sintética puede considerarse más precisa, pues sus efectos se reducirían a las acciones que produzcan en las células gonadotropas hipofisarias, al menos en teoría, y los datos obtenidos más directamente imputables a las gonadotrofinas. En condiciones basales los resultados muestran que la capacidad de biosíntesis proteica de la hipófisis de rata hembra prepúber está en un orden de actividad significativamente inferior al de las ratas adultas. También se comportan de un modo diferente a los estímulos.

Varios autores (18, 21, 22, 25, 26) han

descrito que la presencia de LH-RH de diversas procedencias en el medio de incubación de hemipituitarias o células hipofisarias dispersadas no estimulan la síntesis de FSH ni de LH en períodos de tiempo de hasta tres horas, lo que coincide con nuestros resultados.

En cambio, las hipófisis que proceden de ratas hembras prepúberes doblan su actividad biosintética en presencia de LH-RH sintética, resultado que coincide con el obtenido por Liu *et al.* (12) empleando machos de la misma edad.

Resulta interesante el hecho de que el extracto hipotalámico de ratas hembras prepúberes sea incapaz de estimular la síntesis proteica *in vitro* en las hipófisis de los animales de la misma edad, en contraste con el efecto estimulador que tiene el extracto hipotalámico de ratas adultas sobre la hipófisis de las prepúberes, lo cual parece atribuible a una baja concentración de hormonas liberadoras de gonadotrofinas en el hipotálamo de la rata hembra prepúber.

Desde este punto de vista, la inoculación de hormonas hipotalámicas, hipofisarias o gonadales a ratas hembras de 21 días provocarían efectos de retroalimentación (*feed-back*) que de alguna forma inducirían cambios en el hipotálamo y la hipófisis, lo cual podría traducirse en una

modificación de la respuesta a la LH-RH *in vitro*. No obstante, los resultados obtenidos (experimento 3) muestran que no ha habido alteraciones hipofisarias significativas, por lo que la respuesta a la LH-RH *in vitro* se refiere, tras el tratamiento con cinco dosis de LH-RH sintética. Se observa, en cambio, una importante evolución en los animales que recibieron FSH y LH; sus hipófisis *in vitro* responden mejor a la estimulación por la LH-RH, alcanzando los niveles de biosíntesis proteica de las hipófisis de las adultas. Esta influencia de las gonadotrofinas sobre las hipófisis sólo podría tener lugar a través de fenómenos *feed-back* de signo positivo (24).

Si se tiene en cuenta además que las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, a las dosis ensayadas, tienen una escasa capacidad de modificación de la respuesta hipofisaria a la LH-RH *in vitro* (19), cabría suponer que el *feed-back* se produce por acción directa de la FSH y la LH sobre el hipotálamo (24), y no a través de las hormonas ováricas.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Patronato del Colegio Universitario de Las Palmas y al Cabildo Insular de Gran Canaria, las facilidades dadas para la realización del presente trabajo. Asimismo, quieren dejar constancia de la colaboración brindada por los Dres. Schiaffini, Freire y Díaz-Díaz, en la elaboración del mismo, y de la ayuda prestada por J. Rivero y S. Ruiz.

#### Resumen

Se estudia la incorporación de leucina- $C^{14}$  en proteínas hipofisarias de rata hembra *in vitro*.

La hipófisis de ratas adultas, en ausencia de estímulos, mostró una capacidad de biosíntesis proteica *in vitro* aproximadamente doble de las hipófisis de las prepúberes.

Para la estimulación *in vitro* de las hipófisis se utilizó LH-RH sintética o extractos hipotalámicos de ratas adultas o prepúberes. Las hipófisis de ratas adultas no respondieron a nin-

guno de los estímulos ensayados, mientras que la de las prepúberes aumentaron significativamente su actividad biosintética cuando se añadió al medio de incubación LH-RH sintética o extracto hipotalámico de rata adulta. La adición de extracto hipotalámico de rata prepúber no alteró la respuesta basal.

Las ratas prepúberes (21 días de edad) inyectadas durante 5 días consecutivos con FSH y LH mostraron una mayor sensibilidad a la LH-RA *in vitro* que las inyectadas con estradiol y progesterona o con LH-RH sintética.

#### Bibliografía

1. BAKER, F. D. y KRAGT, C. L.: *Endocrinology*, **85**, 522-527, 1969.
2. DAVIS, J. C. y HYMER, W. C.: *J. Endocr.*, **64**, 229-236, 1975.
3. DEBELJUK, L., ARIMURA, A. y SCHALLY, A. V.: *Endocrinology*, **90**, 1499-1502, 1972.
4. DEBELJUK, L., ARIMURA, A. y SCHALLY, A. V.: *Endocrinology*, **90**, 1578-1581, 1972.
5. EGUCHI, Y., SAKAMOTO, Y., ARISHIMA, K., MORIKAWA, Y. y HASHIMOTO, Y.: *Endocrinology*, **96**, 504-507, 1975.
6. ISHIKAWA, H. y NAGAYAMA, T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **55**, 492-497, 1973.
7. JUSTISZ, M.: En «*Mechanismes d'action intracellulaires des hormones*» (R. Vokaer, ed.), Masson. Paris, 1970, pp 93-103.
8. JUSTISZ, M., BÉRAULT, A., NOVILLA, A. y RIBOT, C.: *Acta Endocrinol.* (Kbh), **55**, 481-488, 1973.
9. JUSTISZ, M.: *Acta Neurol. belga*, **69**, 491-500, 1969.
10. LABRIE, F., BÉRAUD, G., GAUTIER, M. y LEMAY, A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1902-1908, 1971.
11. LABRIE, F., PELLETIER, G., LEMAY, A., BORGEAT, P., BARDEN, N., DUPONT, A., SAVARAY, M., CÔTE, J. y BOUCHER, R.: En «*Karoliska symposia on research methods in reproductive endocrinologie*» (E. Diczfalussy, ed.), Copenhagen, 1973, pp. 301-340.
12. LIU, T. C., JACKSON, G. L. y GORSKY, J.: *Endocrinology*, **98**, 151-157, 1976.
13. McCANN, S. M., TALEISNIK, S. y FRIEDMAN, H. M.: *Proc. Soc. expt. Biol. Med.*, **104**, 432-434, 1960.
14. McCANN, S. M. y PORTER, J. C.: *Physiol. Rev.*, **49**, 240-284, 1969.

15. MEIJS-ROELOFS, H. M. A., UILENBROECK, TH. J., DE JONGS, F. H. y WELSCHEN, R.: *J. Endocr.*, 29, 295-304, 1973.
16. MITTLER, J. C. y MEITES, J.: *Endocrinology*, 78, 500-504, 1966.
17. MIYACHI, Y., NIELSCHLAY, E. y LIPSETT, M. B.: *Endocrinology*, 92, 1-5, 1973.
18. NAKANO, H., FAWCETT, C. P. y McCANN, S. M.: *Endocrinology*, 98, 278-288, 1976.
19. RAMÍREZ, D.: En «Neuroendocrinología» (O. Schiaffini, A. Oriol Bosch, L. Martini, M. Motta, eds.), Toray, Barcelona, 1975, pp. 203-259.
20. REDDING, T. W., SCHALLY, A. V., ARIMURA, A. y MATSUO, H.: *Endocrinology*, 90, 764-772, 1972.
21. SAMLI, M. H. y GESCHWIND, J. J.: *Endocrinology*, 81, 835-844, 1967.
22. SAMLI, M. H. y GESCHWIND, J. J.: *Endocrinology*, 82, 225-231, 1968.
23. SCHALLY, A. V., ARIMURA, A. J., KASTIN, A. J., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T. W., NAIR, R. M. G., DEBELJUK, L. y WHITE, W. F.: *Science*, 173, 1036-1038, 1971.
24. SCHIAFFINI, O., MOTTA, M. y MARTINI, L.: En «Neuroendocrinología» (O. Schiaffini, A. Oriol Bosch, L. Martini, M. Motta, eds.), Toray, Barcelona, 1975, pp. 165-202.
25. WAKABAYASHI, K., ASAI, T., HIGUCHI, T., TAMAOKI, B. y McCANN, S. M.: En «Gonadotropin and Gonadal Function» (W. Mondgal, ed.), Academic Press, Nueva York, 1974, pp. 312-336.
26. WATANABE, S., DHARIWAL, A. P. S. y McCANN, S. M.: *Endocrinology*, 82, 674-684, 1968.
27. YORK, D. H., BAKER, F. L. y KRAISER, J.: *Neuroendocrinology*, 11, 212-228, 1973.