

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

B. N. Díaz-Chico y M. E. Díaz-Díaz

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

(Recibido el 12 de julio de 1977)

B. N. DIAZ-CHICO and M. E. DIAZ-DIAZ. *Effect of Synthetic LH-RH and Hypothalamic Extracts on RNA Synthesis by Rat Pituitaries in vitro*. Rev. esp. Fisiol., 34, 127-130. 1978.

Incorporation of <sup>14</sup>C-Uridine in pituitary RNA from adults or prepuberal female rats *in vitro*, incubated with synthetic LH-RH or hypothalamic extracts, was studied in this work.

RNA synthesis was not increased by any of the assayed stimuli in adult female rat pituitaries.

The <sup>14</sup>C-Uridine incorporation in pituitary prepuberal female rats increased in presence of synthetic LH-RH or adult female hypothalamic extracts, but not in presence of prepuberal female hypothalamic extracts.

The differences found in the *in vitro* behaviour between pituitaries from prepuberal and adult female rats, and between their respective hypothalamic extracts, are attributable to the evolution of these organs along the sexual maturing process.

En los últimos años se ha intensificado notablemente el estudio de los fenómenos fisiológicos que conducen a la aparición de la pubertad en los mamíferos. La evolución de las concentraciones séricas de gonadotrofinas, el contenido hipotalámico de hormonas liberadoras y los cambios de respuesta que se van produciendo a lo largo de dicho proceso han sido los aspectos del problema más estudiados (1, 3-7, 12). En cambio, los datos disponibles en torno al control de la síntesis de gonadotrofinas en la hipófisis y las posi-

bles modificaciones que se pudieran producir en el mismo son poco conocidas (3, 18).

La naturaleza glicoproteica de la FSH y la LH requiere que su biosíntesis vaya precedida de síntesis de RNA. Varios autores (3, 9-14) han descrito que los extractos hipotalámicos y la LH-RH estimulan la síntesis de proteínas y/o gonadotrofinas en hipófisis de rata *in vitro*, así como una acción diferente de estos productos según que las hipófisis procedan de hembras prepúberes o de adultas (3).

Con respecto al RNA los datos son menos abundantes; no obstante, JUSTISZ *et al.* (11) han obtenido evidencia de que el RNA participa en la acción de la LH-RH sobre la hipófisis, puesto que sus efectos quedan suprimidos usando un inhibidor de la síntesis de RNA (actinomicina D).

El trabajo presente se diseñó con un triple objetivo: analizar la capacidad de biosíntesis de RNA de las hipófisis de ratas hembras prepúberes y adultas; estudiar el efecto que sobre dicho proceso tienen los extractos de hipotálamo, comparando los de hembra adulta con los de prepúber; y observar el comportamiento de las hipófisis adultas y prepúberes frente a la LH-RH sintética *in vitro*, en cuanto a síntesis de RNA.

### Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras, mantenidas con ciclos de 14 h de luz y 10 de oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Las ratas adultas utilizadas como donadoras de hipófisis o hipotálamos pesan entre 180 y 250 g. Las ratas prepúberes utilizadas a los 21 días de edad permanecen con sus madres hasta el día del sacrificio.

En las incubaciones de hipófisis se utiliza la técnica de MITTLER y MEITES (17), con algunas modificaciones. Los animales se decapitan en grupos de tres y las hipófisis disecadas, divididas en mitades, pesadas y transferidas rápidamente a un tubo conteniendo 0,5 ml de medio TC199. Después de 10 min de preincubación las tres hemipituitarias se transfieren a un tubo conteniendo 0,5 ml de medio TC199 y 1  $\mu$ Ci de uridina- $C^{14}$  (Radiochemical Center, Amersham, actividad específica 405 mCi/mmol), y se le adiciona 0,1 ml de la solución que contiene el producto usado como estímulo. Se procura que las hemipituitarias hermanas reciban estímulo.

Como estímulos se han utilizado la LH-RH sintética (Beckman) y los extractos los diferentes.

hipotalámicos de ratas adultas o prepúberes, obtenidos por el método MCCANN *et al.* (15, 16), con HCl 0,1 M y neutralizados con bicarbonato sódico (21). Las dosis empleadas equivalen a medio hipotálamo de rata adulta, un hipotálamo de rata prepúber o 10 nmoles de LH-RH sintética por tubo de incubación. Los controles se incuban con 0,1 ml de suero salino.

Los tubos con las tres hemipituitarias y sus respectivos medios de incubación se mantienen durante 60 min a 37° C con agitación y oxigenación continuas. Al final del proceso de incubación las hipófisis eran rápidamente enfriadas a 2° C, lavadas con solución salina, homogeneizadas y precipitadas con TCA al 10 %. Los precipitados lavados dos veces con TCA al 10 %, seguidos de centrifugación. El último precipitado se resuspende en TCA al 5 % y se calienta a 90° C durante 30 minutos para extraer los ácidos nucleicos. El sobrenadante se añade a 10 ml de líquido de centelleo, compuesto por PPO al 0,5 % y Dimetil POPOP al 0,01 % en tolueno, conteniendo además 15% de Tritón X-100. El conteo de las muestras se efectúa en un contador de centelleo Packard 3390.

### Resultados

Las hipófisis de ratas hembras prepúberes tienen una capacidad basal de síntesis de RNA significativamente superior al de las adultas ( $p < 0,005$ ).

Las hipófisis de hembras adultas no muestran alteraciones en la incorporación de uridina- $C^{14}$  después de una hora de incubación en presencia de extractos hipotalámicos de hembras adultas o prepúberes, ni en presencia de LH-RH sintética (tabla I).

El extracto hipotalámico de hembras adultas y la LH-RH sintética aumentan la incorporación de uridina- $C^{14}$  en las hipófisis de hembras prepúberes *in vitro*. La incubación de estas hipófisis con extracto hipotalámico de hembras prepú-

bères no alteró significativamente la síntesis de RNA (tabla II).

Tabla I. Incorporación de uridina-C<sup>14</sup> en RNA de hipófisis de rata adulta incubadas con extractos hipotalámicos y LH-RH in vitro.

Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm S.E.$  Las comparaciones con los controles se efectuaron mediante el test t de Student. Entre paréntesis el número de incubaciones por grupo. E.H.R.= Extracto hipotalámico de rata. N.S.=No significativo.

Estímulo	Peso de tejido hipofisario (mg)	Incorporación DPM/mg Tejido	Comparación vs. control
Control (s. salino) (9)	8,6 ± 0,5	169 ± 15	—
E.H.R. prepúber (8)	7,9 ± 0,3	172 ± 30	N.S.
E.H.R. adulta (7)	8,2 ± 0,4	253 ± 38	N.S.
LH-RH (7)	8,9 ± 0,7	182 ± 29	N.S.

Tabla II. Incorporación de uridina-C<sup>14</sup> en RNA de hipófisis de rata hembra prepúber incubadas con extractos hipotalámicos y LH-RH in vitro.

Los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm S.E.$  Las comparaciones con los controles se efectuaron mediante el test t de Student. Entre paréntesis el número de incubaciones por grupo. E.H.R.= Extracto hipotalámico de rata. N.S.=No significativo.

Estímulo	Peso de tejido hipofisario (mg)	Incorporación DPM/mg Tejido	Comparación vs. control
Control (s. salino) (9)	2,9 ± 0,5	236 ± 45	—
E.H.R. prepúber (9)	3,6 ± 0,7	313 ± 17	N.S.
E.H.R. adulta (10)	3,2 ± 0,6	453 ± 52	p < 0,01
LH-RH (11)	3,5 ± 0,3	392 ± 33	p < 0,05

### Discusión

Los resultados obtenidos en cuanto a incorporación de uridina-C<sup>14</sup> en hipófisis, en presencia de extractos hipotalámicos o de LH-RH, deben considerarse como una aproximación a los efectos que pudieran tener sobre la síntesis de RNA específico

de las gonadotropinas, ya que al mismo tiempo se ensayan productos heterogéneos, como los extractos, sobre un tejido (hipófisis) que contiene varios tipos de células además de los gonadotrofos y que deben sintetizar tipos muy distintos de RNA. Así, de los resultados obtenidos con los extractos hipotalámicos sólo será deducido el efecto comparativo de los que proceden de ratas adultas y de prepúberes. Los efectos de la LH-RH, en cambio, pueden considerarse más específicos.

De los datos obtenidos puede deducirse que la fisiología de hipófisis e hipotálamos de hembras prepúberes y adultas es muy distinta.

La mayoría de los autores coinciden en que existe algún control hipotalámico sobre la hipófisis desde antes del nacimiento, el cual va sufriendo alteraciones a lo largo de la vida (2, 8, 10, 12, 18). En el hipotálamo ha sido detectada actividad FSH-RH y LH-RH, al menos desde los 10 días de vida, en las ratas hembras (10). Este hecho está en aparente contradicción con la ineficacia del hipotálamo de 21 días para estimular la síntesis de RNA, y de proteínas (3), ya que el hipotálamo de las hembras adultas produce incrementos significativos en ambos procesos en las hipófisis de prepúberes.

DÖHLER *et al.* (7) describen que la concentración de FSH y de LH en hipófisis es máxima a los 21 días en la rata hembra, superando los niveles precedentes y posteriores, incluida la edad adulta. Estos datos podrían explicar que la síntesis basal de RNA sea mayor en las hipófisis de prepúberes que en las de adultas, ya que la biosíntesis hormonal es mayor. Por otra parte, este proceso necesita de una estimulación proporcionalmente alta por parte del hipotálamo, que debe incrementar la liberación de FSH-RH y/o LH-RH. Esto puede haber conducido a que la concentración hormonal hipotalámica sea mínima, y en consecuencia, el extracto sea pobre en estos productos. Dicha circunstancia podría explicar la

ineficacia del extracto de prepúberes frente al de adultas y la LH-RH, al estimular la síntesis de RNA.

La ausencia de estimulación de la síntesis de RNA obtenida en la incubación de las hipófisis de rata adulta con LH-RH y extractos hipotalámicos coincide con los resultados descritos previamente (3) en cuanto a síntesis proteica en experimentos similares, y también por YOSHIDA *et al.* (20), que utilizando hembras castradas bloqueadas con estradiol y progesterona encuentra que a los 60 minutos de incubación no hay síntesis neta de RNA.

### Resumen

Se estudia la incorporación de uridina-C<sup>14</sup> en RNA de hipófisis de ratas adultas o prepúberes *in vitro*, incubadas en presencia de extractos hipotalámicos o LH-RH.

Las hipófisis de las hembras adultas no incrementan su síntesis de RNA con ninguno de los estímulos ensayados. Las de las hembras prepúberes incrementan la incorporación de uridina-C<sup>14</sup> en presencia de extractos hipotalámicos procedentes de ratas adultas y en presencia de LH-RH sintética; no se observa alteración alguna al incubarlas con extractos hipotalámicos procedentes de hembras prepúberes.

Las diferencias de comportamiento encontradas entre las hipófisis de hembras adultas y de prepúberes, así como entre los extractos procedentes de sus respectivos hipotálamos, son atribuidos a la evolución que tiene lugar a lo largo de la maduración sexual en dichos órganos.

### Bibliografía

1. CHOWDHURY, H. y STEINBERGER, E.: *J. Endocr.*, **69**, 381-384, 1976.
2. DEBELJUK, L., ARIMURA, A. y SCHALLY, A. V.: *Endocrinology*, **90**, 1578-1585, 1972.
3. DÍAZ-CHICO, B. N. y DÍAZ-CHICO, J. C.: *Rev. esp. Fisiol.*, **33**, 291-296, 1977.
4. DÍAZ-DÍAZ, M. E., DÍAZ-CHICO, J. C., DÍAZ-CHICO, B. N. y MORELL, M.: II Congreso Nacional de Endocrinología. Las Palmas, 1976, n.º 47.
5. DÖLHER, K. D. y WUTTKE, W.: *Endocrinology*, **94**, 1003-1008, 1974.
6. DÖLHER, K. D. y WUTTKE, W.: *Endocrinology*, **97**, 898-907, 1975.
7. DÖLHER, K. D., VON ZUR MÜLHEN, A. y DÖHLER, U.: *Acta Endocrinologica (Kbh)*, **85**, 718-728, 1977.
8. EGUCHI, Y., SAKAMOTO, Y., ARISHIMA, K., MORIKAWA, Y., y HASIMOTO, Y.: *Endocrinology*, **96**, 504-506, 1975.
9. JUSTISZ, M., BÉRAULT, A., NOVELLE, A. y RIBOT, G.: *Acta Endocrinologica (Kbh)*, **55**, 481-488, 1973.
10. JUSTISZ, M.: *Acta Neurol. Belga*, **69**, 491-500, 1969.
11. JUSTISZ, M.: En «Mechanismes d'actions intracellulaires des hormones» (R. Vokaer, ed.), Masson, París, 1970, págs. 93-103.
12. KRAGT, C. L. y DAHLGREEN, J.: *Neuroendocrinology*, **9**, 30-40, 1972.
13. LABRIE, F., PELLETIER, G., LEMAY, A., BORGAT, P., BARDEN, N., DUPONT, A., SAVARAY, M., CÔTÉ, J. y BOUCHER, R.: En «Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinologie» (E. Diczfalussy, ed.), Periodica, Copenhagen, 1973, 301-340.
14. LABRIE, F., BÉRAUD, G., GAUTIER, M. y LEMAY, A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1902-1908, 1971.
15. McCANN, S. M., TALEISNIK, S. y FRIEDMAN, H. M.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **104**, 432-434, 1960.
16. McCANN, S. M. y PORTER, J. C.: *Physiol. Rev.*, **49**, 240-284, 1969.
17. MITTLER, J. C. y MEITES, J.: *Endocrinology*, **78**, 500-504, 1966.
18. NEGRO-VILAR, A., OJEDA, S. R. y McCANN, S. M.: *Endocrinology*, **93**, 729-735, 1973.
19. RAMÍREZ, D.: En «Neuroendocrinología» (O. Schiaffini, A. Oriol-Bosch, L. Martini, M. Motta, eds.), Toray, Barcelona, 203-259, 1975.
20. YOSHIDA, T., HATTORI, Y., HOSHIAI, H., HIRANO, M., TAKAHASHI, K., y SUZUKI, M.: *Acta Endocrinologica (Kbh)*, **79**, 658-662, 1975.
21. YORK, D. H., BAKER, F. L. y KRAISER, J.: *Neuroendocrinology*, **11**, 212-228, 1973.