

- 11) GUYONNET, F., y PLOMMET, M. (1970).—Haemolysine gamma de *S. aureus*: purification et propriétés. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **118**: 19-33.
- 12) HAJEK, V. (1976).—*S. intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**: 401-408.
- 13) HAJEK, V., y MARSIALEK, E. (1971).—The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A*, **217**: 176-182.
- 14) HAJEK, V., y MARSIALEK, E. (1976).—Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*. J. JELJASZEWICZ (ed.). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Suppl.*, **5**: 11-21.
- 15) HAQUE, R., y BALDWIN, J. N. (1964).—Types of hemolysins produced by *S. aureus*, as determined by the replica plating technique. *J. Bacteriol.*, **88**: 1.442-1.447.
- 16) HENTSCHEL, S.; KUSCH, D., y SINELL, H. J. (1979).—*S. aureus* in poultry. Biochemical characteristics, antibiotic resistance and phage pattern. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.*, **B 168**: 546-561.
- 17) KLECK, J. L., y DONAHUE, J. A. (1968).—Production of thermostable hemolysin by cultures of *S. epidermidis*. *J. Infect. Dis.*, **181**: 317-323.
- 18) KLOSS, W. E., y SCHLEIFER, K. H. (1975).—Isolation and characterization of staphylococci from human skin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**: 62-79.
- 19) NAKAGAWA, M. (1958).—Studies on staphylococci from the bovine udder. I. Biological characteristics of staphylococci and some observations on the pathogenic strains. *Jap. J. Vet. Res.*, **6**: 19-34.
- 20) RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ, R.; MERINO, C., y DEL VALLE, M. (1974).—Estudio de los caracteres biológicos de estafilococos aislados de manipuladores de alimentos. *Rev. San. Hig. Pub.*, **43**: 1.139-1.160.
- 21) ROGOLSKY, M. (1979).—Nonenteric toxins of *S. aureus*. *Microbiol. Rev.*, **43**: 320-360.
- 22) SCHLEIFER, K. H., y KLOOS, W. E. (1975).—Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* and descriptions of three new species: *S. cohnii*, *S. haemolyticus* and *S. xylosum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**: 50-61.
- 23) SMITH, M. L., y PRICE, S. A. (1938).—*Staphylococcus gamma* haemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.*, **47**: 379-393.
- 24) TURNER, W. H., y PICKARD, D. J. (1979).—Immunological relationship between delta-hemolysins of *S. aureus* and coagulase-negative strains of staphylococci. *Infect. Immun.*, **20**: 485-494.
- 25) WADSTRÖM, T.; KJELLGREN, M.; LJUNGH, A. (1976).—Extracellular proteins from different *Staphylococcus* species: a preliminary study. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*. J. JELJASZEWICZ (ed.). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Suppl.* **5**: 623-624.
- 26) WISEMAN, G. M. (1975).—The hemolysins of *S. aureus*. *Bacteriol. Rev.*, **39**: 317-344.

SINTESIS DE PROTEINA EN EL HIPOTALAMO DE RATA DE UN DIA DE EDAD TRAS LA ADMINISTRACION DE PROPIONATO DE TESTOSTERONA*

Por J. Ventanas Barroso
A. López Pérez
J. Burgos

INTRODUCCION

Son numerosos los experimentos que apoyan la idea de que las hormonas esteroideas regulan las funciones celulares influyendo sobre la síntesis de proteína en los órganos blanco^{1, 2}.

En el útero inmaduro de rata, que constituye el modelo experimental más ampliamente utilizado para el estudio de la síntesis de macromoléculas tras la inyección de estradiol, la secuencia de fenómenos incluye, en primer lugar, la aparición de una proteína (o un grupo de proteínas) denominada Proteína inducida (IP, Induced protein) o Proteína intermediaria clave (KIP, Key Intermediate Protein) por Barnea y Gorski³. La vida media de la IP es corta, desapareciendo antes de que se haya iniciado la síntesis generalizada de proteína y el crecimiento tisular en respuesta al esteroide.

Baulieu *et. al.*⁴ sugieren que el estradiol, ligado al receptor, se transloca al núcleo, donde un número limitado de complejos estradiol-receptor se unen de manera específica a los aceptores de la cromatina. Este pequeño número de moléculas activa o desactiva un único gen (o un número muy limitado de genes), y como resultado se inicia la síntesis del RNAm de la IP. La IP estimula la RNA polimerasa I (insensible a la α -amanitina), que cataliza la síntesis de los RNA, y en último extremo, de las proteínas implicadas en el crecimiento uterino.

El papel central que desempeña el hipotálamo en la diferenciación sexual ha sido bien documentado por numerosos estudios^{5, 6, 7}, cuyos resultados sugieren que la diferenciación sexual es mediada a través del genoma. El estradiol (derivado de la testosterona por aromatización) se une a su receptor citoplasmático, atraviesa la

* Este trabajo ha sido realizado con fondos procedentes del proyecto n.º 4467 de la CAICYT. *An. Fac. Vet. León*, 1982, 28, 209-217.

membrana nuclear, con lo que accede al material cromosómico disparando los cambios cuantitativos, y/o cualitativos, en la síntesis de RNA y proteína que conducen a la diferenciación irreversible de los circuitos nerviosos que gobiernan el comportamiento sexual y la secreción de gonadotrofinas.

Aunque existe una diferencia bien clara e importante entre el hipotálamo y útero —en el útero los cambios provocados por la inyección de estradiol son reversibles y en el hipotálamo son permanentes— el papel positivo de la síntesis de RNA y proteína en la diferenciación sexual del hipotálamo ha sido claramente demostrado por Salaman⁸, quien, usando inhibidores de la síntesis proteica y de RNA, bloquea la androgeneización de las hembras tratadas con propionato de testosterona.

En este trabajo se describen las investigaciones realizadas sobre la síntesis de proteína en el hipotálamo de ratas Sprague-Dawley tras la administración de testosterona durante el "período crítico" para la diferenciación sexual (días 18-27 post concepción).

MATERIAL Y METODOS

Reactivos químicos

Los aminoácidos marcados ³H-L-Leucina y ¹⁴C-L-Leucina, fueron suministrados por New England Nuclear, Boston, Massachusetts (U.S.A.). El propionato de testosterona (TP) por Sigma. Los restantes productos utilizados eran reactivo procedentes de BDH, LKB, etc.

Material biológico

Se emplearon ratas Sprague-Dawley, que fueron inyectadas s/c (subcutáneamente) el día en que nacieron con 1 mg de propionato de testosterona en aceite de cacahuete o con vehículo solamente (controles) y se sacrificaron a diferentes tiempos tras la administración de andrógeno. La ³H-L-Leucina (10 μ Ci/animal) se inyectó i/p (intraperitonealmente) 90 minutos antes del sacrificio.

En los experimentos de doble marca isotópica (¹⁴C/³H) los animales tratados con propionato de testosterona se inyectaron con ¹⁴C-L-Leucina y los controles con ³H-L-Leucina.

Cuantificación de la incorporación de ³H-L-Leucina en la proteína soluble total

Los animales se sacrificaron por decapitación cervical y el hipotálamo, resto del cerebro (masa encefálica menos hipotálamo), hígado y suero fueron homogeneizados en una disolución de EDTA al 0,05 %, se centrifugó a 15.000 xg., 10 minutos, y el sobrenadante se mantuvo congelado hasta su utilización.

La proteína soluble presente en el sobrenadante se precipitó con ácido tricloroacético al 5% (tres veces), etanol y éter (dos veces) y, finalmente, se deshidrató bajo N₂.

El residuo seco fue redissuelto con NaOH 0,1 N, para la determinación de proteína (Método de Lowry)⁹. El resto se empleó para el recuento de la radiactividad, que se efectuó tras la adición de 12 ml. de Insta-Gel en cada vial. Los resultados se expresaron con C.P.M./mg. de proteína.

Medida de la incorporación de la L-Leucina a proteínas específicas

Las ratas tratadas con TP o controles (vehículo solo) fueron inyectadas con ¹⁴C-L-Leucina (tratadas) y ³H-L-Leucina (controles). Tras el sacrificio, se extrajo el hipotálamo de ambos grupos y los tejidos se procesaron conjuntamente en las operaciones siguientes. Los hipotálamos se homogeneizaron en una disolución de EDTA al 0,05 % en agua destilada, el homogeneizado se filtró y se centrifugó a 15.000Xg. 10 minutos y se recogió el sobrenadante libre del material lipídico de la parte superior del tubo. Alícuotas de este sobrenadante se procesaron para su electroforesis en gel de acrilamida (5 % de acrilamida) en presencia de SDS según el método de Weber y Osborn¹⁰. Una vez concluida la electroforesis, los geles se cortaron en fracciones de 1-2 mm. de longitud, que fueron depositadas en viales de cuarzo. Se añadió 1 ml. de NCS en cada vial y se digirió a 50°C durante una noche. Los viales se enfriaron, introduciéndolos 1 hora en una cámara refrigerada; se añadió ácido acético glacial (0,034 μ l/ml. NCS) y 12 mls. de Ista-Gel, procediéndose entonces a su recuento. La relación ¹⁴C/³H se obtuvo calculando las cuentas pertenecientes a cada isótopo por el método del doble canal.

RESULTADOS

Incorporación de ³H-L-Leucina en la proteína total tras la inyección de TP

Tanto en los machos como en las hembras tratados con testosterona, aumenta el ritmo de incorporación de ³H-L-Leucina en la proteína soluble entre las 6 y 12 horas después de la administración del andrógeno con respecto a los controles. Sin embargo, el incremento en la tasa de síntesis proteica es inespecífica, ya que, además del hipotálamo, el cerebro, hígado y suero muestran una respuesta similar. Por consiguiente, debe el aumento registrado atribuirse a la acción anabólica del esteroide más que a su acción androgeneizante.

Síntesis de proteínas específicas en el hipotálamo de las hembras androgeneizadas

En principio, tratamos de identificar las proteínas sintetizadas «de novo» por acción de la testosterona, comparando los electroforegramas de las proteínas

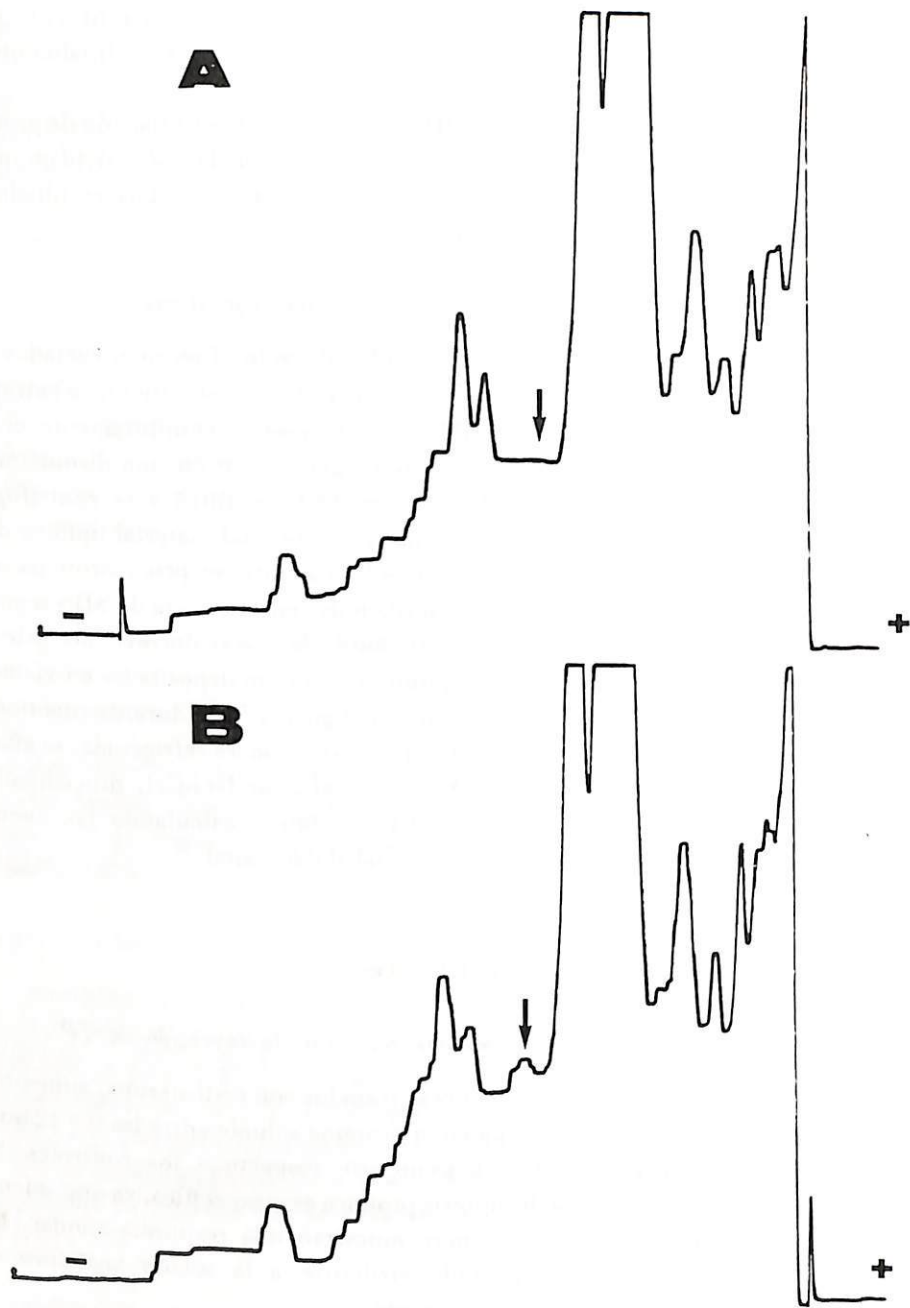


Figura 1.—Electroforesis en gel de acrilamida (5% de acrilamida) en presencia de SDS de los sobrenadantes obtenidos por homogeneización y centrifugación de hipotálamos procedentes de hembras controles (A) y hembras tratadas con TP (B). La flecha indica la localización de la proteína cuya síntesis resulta estimulada por la administración de TP. Los geles se tiñeron con Coomassie Blue.

citoplasmáticas del hipotálamo de ratas hembras de 1 día de edad tratadas y controles. El análisis electroforético de dichas proteínas siguiendo el método de Weber y Osborn¹⁰ demuestra la presencia de un pico correspondiente a una proteína de PM 43.000-45.000 daltons en los registros gráficos obtenidos a partir de los geles en los que se había aplicado citosol de hembras androgeneizadas, que no aparece en los pertenecientes a las hembras control (Fig. 1, A y B). Sin embargo, los resultados no eran muy reproducibles, en gran medida debido a la insensibilidad del método empleado.

Por ello decidimos poner a punto un método mucho más sensible, empleado por Gorski *et. al.*^{3, 11}, para el estudio de la síntesis de la IP en el útero de rata tras la administración de estradiol. Es el método del doble marcado isotópico (¹⁴C/³H), donde los animales tratados fueron inyectados con el aminoácido (Leucina), marcado con ¹⁴C y los controles con ³H. Para ello, los animales se sacrificaron a las 2,5 horas de la inyección del andrógeno o vehículo y los tejidos de ambos grupos fueron homogeneizados y procesados conjuntamente. Tras la electroforesis, los geles se cortaron en fracciones de 1-2 mm. de longitud y se procedió al recuento de la radiactividad.

En la figura 2 se muestra el resultado del recuento de la radiactividad para ³H y ¹⁴C de un gel de acrilamida al que se había aplicado muestra de tejido hipotalámico de

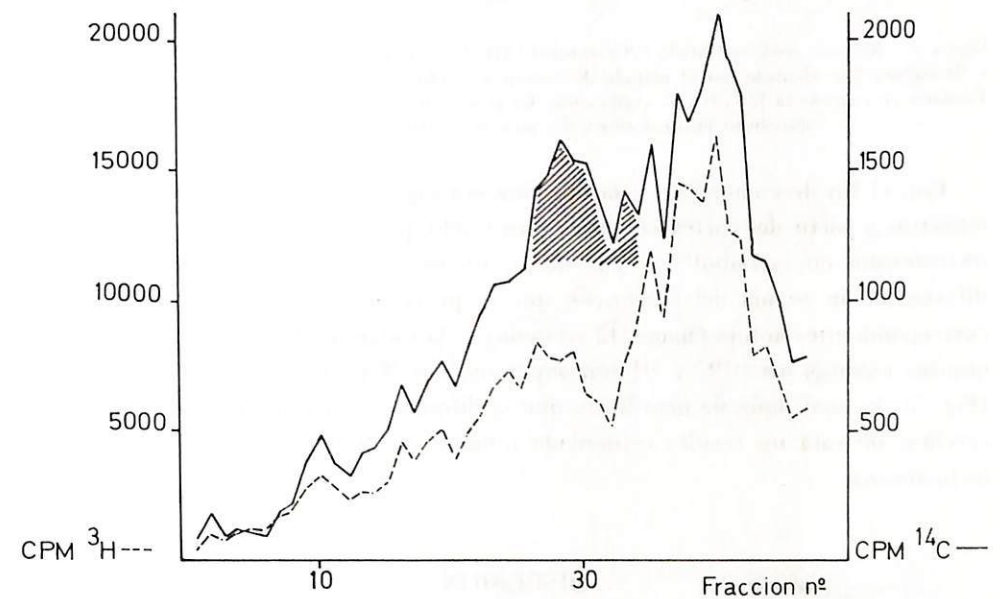


Figura 2.—Recuento de la radiactividad de las fracciones obtenidas por corte de gel al que se había aplicado muestra de hipotálamo de animales tratados (¹⁴C)-Leucina y controles (³H)-Leucina. El área rayada corresponde a las fracciones donde el cociente ¹⁴C/³H se eleva (ver figura 3).

hembras tratadas y control. Como puede observarse, existe una zona (área rayada) donde las CPM de ^{14}C se disocian de las correspondientes a ^3H . Al calcular la relación $^{14}\text{C}/^3\text{H}$, que equivale a decir tratado/control, aparece un pico que corresponde a una proteína recién sintetizada —o un grupo de proteínas de peso molecular semejante— en la zona de PM 40.000-45.000 daltons (Fig. 3).

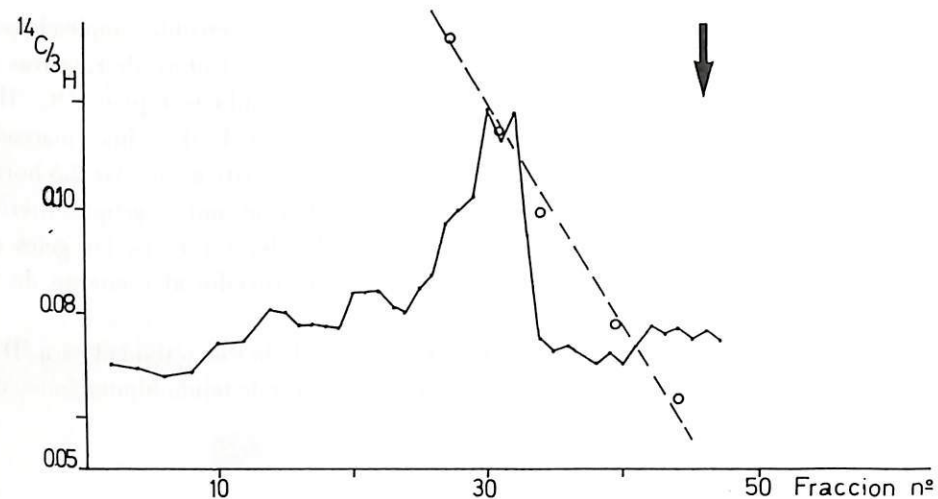


Figura 3.—Relación isotópica tratado (^{14}C)/control (^3H) obtenida a partir de la radiactividad debida a ^{14}C y a ^3H (figura 2), calculada por el método de conteo en doble canal. También se representa la curva de calibración del peso molecular. La proteína patrón con la misma movilidad electroforética del pico es ovoalbúmina (pm 43.000).

Con el fin de comprobar si la proteína era específica del hipotálamo, tomamos muestras a partir del cortex cerebral —un tejido que no es capaz de transformar la testosterona en estradiol¹² y, por tanto, no está directamente implicado en la diferenciación sexual del cerebro—, que se procesaron del mismo modo que las correspondientes al hipotálamo. El recuento de la radiactividad de estos geles revela que las cuentas para ^{14}C y ^3H son superponibles (Fig. 4), y su relación es lineal (Fig. 5), lo cual pone de manifiesto que, a diferencia del hipotálamo, en el cortex cerebral de rata no resulta estimulada ninguna proteína por el tratamiento con testosterona.

DISCUSION

La administración de propionato de testosterona a ratas recién nacidas induce la síntesis de una proteína específica en el hipotálamo. Sus propiedades electroforéticas son semejantes a las de la IP elaborada por el útero tras la administración de

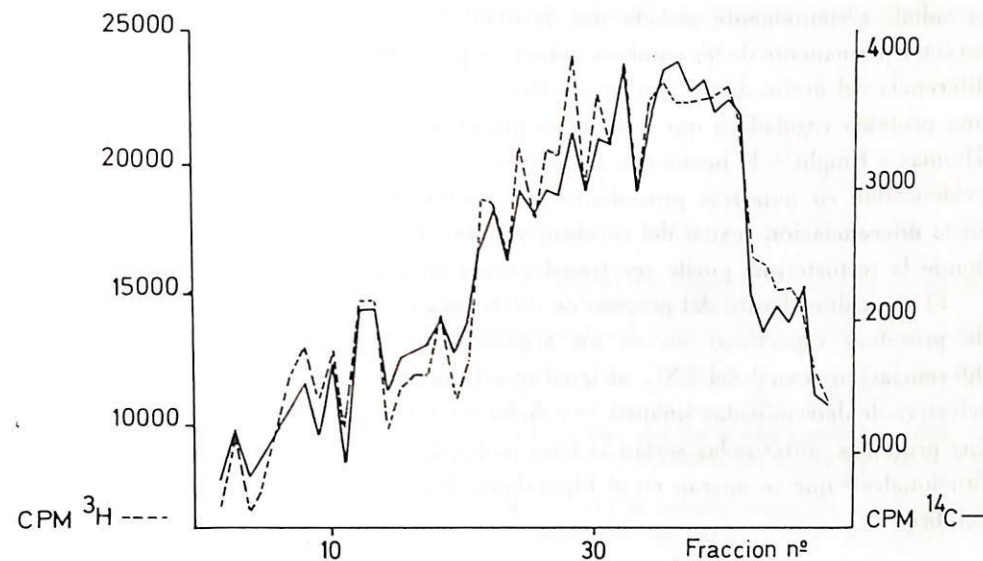


Figura 4.—Recuento de la radiactividad de las fracciones que se obtuvieron a partir del gel donde se añadió sobrenadante de 15.000 μg . de cortex cerebral. Los animales tratados fueron inyectados con ^{14}C -L-Leucina y los controles con ^3H -L-Leucina antes del sacrificio.

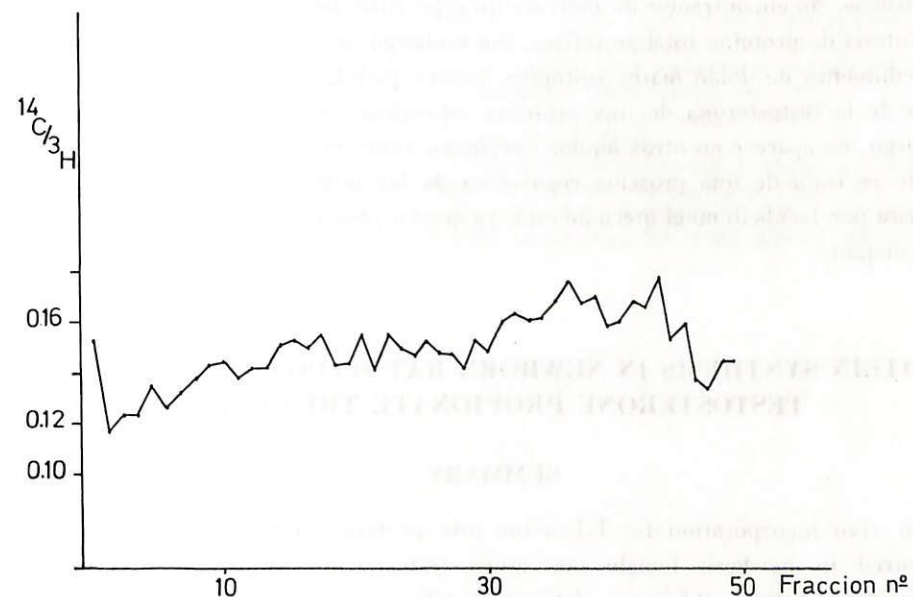


Figura 5.—Relación isotópica tratados (^{14}C)-Leucina/controles (^3H)-Leucina obtenida a partir de los datos de la figura 4.

estradiol, recientemente aislada por Jacobelli¹³, pero probablemente, y dado el carácter permanente de los cambios inducidos por la testosterona en el hipotálamo, a diferencia del útero, donde son reversibles, la proteína sintetizada actúa más como una proteína reguladora que como una proteína intermediaria, tal como sugieren Thomas y Knight¹⁴. El hecho que sea sintetizada por el hipotálamo, pero que no sea evidenciable en muestras procedentes del cortex cerebral apoya su participación en la diferenciación sexual del cerebro, ya que su presencia se restringe a un área donde la testosterona puede ser transformada en estradiol.

El encuadrar dentro del proceso de diferenciación sexual del cerebro la síntesis de proteínas específicas no es un argumento difícil de sostener, ya que la diferenciación sexual del SNC, al igual que la memoria¹⁵, implica la estabilización selectiva de determinadas sinapsis —y dicha estabilización tiene lugar por el uso—. Las proteínas sintetizadas serían la base molecular de los cambios morfológicos y funcionales¹⁶ que se operan en el hipotálamo durante la diferenciación sexual del cerebro.

RESUMEN

Se ha investigado la síntesis de proteína en el hipotálamo de ratas de un día tras la administración de propionato de testosterona, es decir, tras la androgeneización de las mismas. No encontramos un incremento específico del hipotálamo en cuanto a la síntesis de proteína total se refiere. Sin embargo, mediante la utilización de un procedimiento de doble marca isotópica, hemos podido detectar la inducción por parte de la testosterona de una proteína específica en el hipotálamo y que, sin embargo, no aparece en otros tejidos nerviosos, como el cortex cerebral. Probablemente se trata de una proteína reguladora de las mismas características que la descrita por Jacobelli en el útero de rata, ya que su peso molecular (43.000 daltons) es semejante.

PROTEIN SYNTHESIS IN NEWBORN RAT HYPOTHALAMUS AFTER TESTOSTERONE PROPIONATE TREATMENT

SUMMARY

In vivo incorporation for L-Leucine into proteins of the hypothalamus was measured in newborn female rats given testosterone. A single injection of testosterone induces 2.5 hours later a specific protein, detectable by dodecyl-sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and double labeling (¹⁴C/³H) experiments.

The protein was not detected in cerebral cortex. Thus, its synthesis is stimulated

only in areas critical to masculinization, found that is consistent with its role as a regulator.

BIBLIOGRAFIA

- 1) O'MALLEY, B. W., y MEANS, A. R. (1974).—Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, **183**: 610.
- 2) COHEN, M. E., y HAMILTON, T. H. (1975).—Sequential stimulation of two specific cytoplasmic proteins in early estrogen action. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **64**: 633.
- 3) BARNEA, A., y GORSKI, J. (1970).—Estrogen-induced protein. Time course of synthesis. *Biochemistry*, **9**: 1.899.
- 4) BAULIEU, E. E.; ALBERGA, A.; RAYNAUD-JAMMET, C., y VIRA, C. R. (1972).—New look at the very early steps of oestrogen action in uterus. *Nature new biology*, **236**: 236.
- 5) McEWEN, B. (1976).—Interactions between hormones and nerve tissue. *Sci. Am.*, **235**: 48.
- 6) McLUSKY, N. J., y NAFTOLIN, F. (1981).—Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, **211**: 1.294.
- 7) SHERIDAN, P. J.; SAR, M., y STUMPF, W. E. (1974).—Autoradiographic localization of ³H-estradiol or its metabolites in the central nervous system of the developing rat. *Endocrinology*, **94**: 1.386.
- 8) SALAMAN, D. F., y BIRKETT, S. (1974).—Androgen-induced sexual differentiation of the brain is blocked by inhibitors of DNA, RNA and protein synthesis. *Nature*, **247**: 109.
- 9) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. Y.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. (1951).—Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- 10) WEBER, K., y OSBORN, M. (1969).—The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4.406.
- 11) DE ANGELO, A. B., y GORSKI, J. (1970).—Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific interine protein. *Proc. National Acad. Sci.*, **66**: 693.
- 12) REDDY, V. V. R.; NAFTOLIN, F., y RYAN, K. J. (1974).—Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues of foetal and neonatal rats. *Endocrinology*, **94**: 117.
- 13) JACOBELLI, S.; PAPANATTI, L., y BOMPIANI, A. (1973).—Oestrogen-induced-protein (IP) of rat uterus. Isolation and preliminary characterization. *FEBS Letters*, **32**: 199.
- 14) THOMAS, P. J., y KNIGHT, A. (1978).—Sexual differentiation of the brain. En «Current Studies of Hypothalamic Function», vol. 1, p. 192. Karger (Basel).
- 15) CHANGEUX, J. P., y DANCHIN, A. (1976).—Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neurone networks. *Nature, Lond.*, **264**: 705.
- 16) TORAN-ALLERAND, C. D. (1976).—Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Research*, **106**: 407.