

## Producción *in vitro* de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de D-glucosa-1- $\text{C}^{14}$ y D-glucosa-6- $\text{C}^{14}$ por distintas áreas del hipotálamo, sistema límbico e hipófisis de rata hembra en diferentes etapas del ciclo sexual \*

O. Schiaffini \*\*, E. Herrera y A. Gallego

Cátedra I. de Fisiología Humana. Facultad de Medicina. Instituto «Gregorio Marañón». C.S.I.C. Madrid

(Recibido el 28 de julio de 1969)

O. SCHIAFFINI, E. HERRERA and A. GALLEGO. *In vitro* Production of Labeled  $\text{CO}_2$  in Different Areas of Hypothalamus, Limbic System and Pituitary During the Estrus Cycle of Female Rats. R. esp. Fisiol., 26, 27-30, 1970.

*In vitro* formation of  $^{14}\text{CO}_2$  was determined in slices of anterior, middle, posterior hypothalamic areas, amygdala, hippocampus and pituitary of rats during oestrus and dioestrus. Glucose-1- $\text{C}^{14}$  and glucose-6- $\text{C}^{14}$  were used as substrates.

The result show that formation of  $^{14}\text{CO}_2$  from glucose-6- $\text{C}^{14}$  by anterior and posterior hypothalamic areas increase in rats during oestrus as compared with animal in dioestrus. The results are statistically significant ( $p < 0.02$  anterior hypothalamus;  $p < 0.05$  posterior hypothalamus).

When glucose-1- $\text{C}^{14}$  was used as a substrate no significant differences were observed.

The quotient  $\text{CO}_2$  formation from glucose-1- $\text{C}^{14}$  and  $\text{CO}_2$  formation from glucose-6- $\text{C}^{14}$  decreases in the different hypothalamic areas and amygdala from rats in oestrus as compared with animals in dioestrus.

La participación del hipotálamo en la regulación de la anterohipófisis y, por tanto, en la del ciclo sexual femenino, se conoce desde hace varios años (2, 5, 9).

El hipotálamo, la amígdala cerebral y el hipocampo han mostrado variaciones en el consumo de oxígeno que fueron oportunamente vinculadas a los distintos niveles de gonadotrofinas hipofisarias a lo largo del ciclo estroal de la rata, estableciéndose una relación directa entre estas hormonas y esos ritmos metabólicos (4, 6, 7, 8).

Todos estos hechos nos han inducido a

estudiar desde un punto de vista más bioquímico las interrelaciones entre hipotálamo anterior, medio, posterior, amígdala cerebral, hipocampo e hipófisis de ratas hembras en diestro y estro. Los datos que aquí se presentan se refieren a la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y

\* Trabajo realizado mediante una subvención de la Fundación Marqués de Urquijo.

\*\* Investigador del Instituto de Fisiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, Argentina. Becado por la Fundación Marqués de Urquijo.

la glucosa-6-C<sup>14</sup>, como índices de la actividad glicolítica y del *shunt* de las hexosas monofosfato de dichas estructuras.

### Material y métodos

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 150 y 180 g, alimentadas *ad libitum* con la dieta habitual de la 1.ª Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Madrid.

Las técnicas de localización de las fases del ciclo sexual en la rata y de disección de los tejidos estudiados han sido descritas en trabajos anteriores (7, 8).

Los tejidos fueron introducidos en microrrecipientes conteniendo 250  $\mu$ l de solución tampón Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,4 (10), suplementada con glucosa (1 mg/ml), y la correspondiente glucosa radioactiva (1-C<sup>14</sup> ó 6-C<sup>14</sup>), (1  $\mu$ C/ml). Los microrrecipientes se introdujeron en viales de vidrio herméticamente cerrados con tapones de goma, de los que suspendía una pequeña cápsula de plástico. Tras un

gaseo de 5 minutos con oxígeno-anhidrido carbónico (95/5), los viales se incubaron en un agitador modelo Dubnoff (100 ciclos/minuto), a 37° C durante 90 minutos.

Al finalizar la incubación se inyectó a través del tapón de goma 0,2 ml de hidróxido de hiamina en la cápsula de plástico y 0,2 ml de ácido sulfúrico 0,25 N al microrrecipiente conteniendo el tejido y medio de incubación. El desarrollo de CO<sub>2</sub> se realizó mediante una segunda incubación de 90 minutos, a la temperatura ambiente, al final de la cual se introducía la cápsula conteniendo el hidróxido de hiamina en viales de radioactividad con 5 ml de mezcla de centelleo (1 g de 2,5 difeniloxazol y 10 mg de 1,4 bis-2(4 metil 5 feniloxazol), 16 g de naftaleno en 200 ml de xileno/dioxano/etanol al 95 % en la proporción de 5:5:3). La determinación de la radioactividad se llevó a cabo en un contador de centelleo Packard.

A las cuentas de radioactividad obtenidas de los viales experimentales se le restó las cuentas correspondientes a viales pro-

Tabla I. Producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de D-Glucosa-1-C<sup>14</sup> y D-Glucosa-6-C<sup>14</sup>. Tejidos incubados en Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,4, durante 90 minutos. Entre paréntesis se indica el número de casos estudiados.

TEJIDO	% de radioactividad por 10 mg de tejido: valores medios $\pm$ error estándar					
	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> a partir de D-Glucosa-1-C <sup>14</sup>			<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> a partir de D-Glucosa-6-C <sup>14</sup>		
	Diestro	Estro	P	Diestro	Estro	P
NEOTALAMO ANTERIOR	2,38 $\pm$ 0,19 (8)	2,17 $\pm$ 0,23 (6)	N.S.	1,75 $\pm$ 0,15 (12)	2,28 $\pm$ 0,14 (11)	< 0,02
NEOTALAMO MEDIO	2,00 $\pm$ 0,27 (7)	1,58 $\pm$ 0,22 (5)	N.S.	1,61 $\pm$ 0,19 (13)	1,52 $\pm$ 0,19 (13)	N.S.
NEOTALAMO POSTERIOR	2,96 $\pm$ 0,33 (8)	2,88 $\pm$ 0,41 (5)	N.S.	2,34 $\pm$ 0,15 (13)	2,95 $\pm$ 0,21 (13)	< 0,05
GÍNGULA CEREBRAL	1,72 $\pm$ 0,12 (8)	1,68 $\pm$ 0,10 (6)	N.S.	1,24 $\pm$ 0,12 (9)	1,65 $\pm$ 0,12 (11)	N.S.
HIPOCAMPO	1,18 $\pm$ 0,12 (8)	0,98 $\pm$ 0,18 (6)	N.S.	1,30 $\pm$ 0,17 (10)	1,13 $\pm$ 0,12 (13)	N.S.
HIPOFISIS	1,68 $\pm$ 0,11 (8)	1,84 $\pm$ 0,25 (6)	N.S.	1,38 $\pm$ 0,10 (12)	1,41 $\pm$ 0,08 (14)	N.S.

Tabla II. Coeficiente del  $^{14}\text{CO}_2$  producido a partir de D-Glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y de D-Glucosa-6- $\text{C}^{14}$ 

Tejidos	$\text{CO}_2$ de Glucosa-1- $\text{C}^{14}$ / $\text{CO}_2$ de Glucosa-6- $\text{C}^{14}$		Estro vs. Diestro %
	Diestro	Estro	
HIPOTALAMO ANTERIOR	1,06	0,95	69,9
HIPOTALAMO MEDIO	1,24	1,04	83,9
HIPOTALAMO POSTERIOR	1,26	0,98	77,8
AMIGDALA CEREBRAL	1,39	1,02	73,4
HIPOCAMPO	0,91	0,87	95,6
HIPOFISIS	1,20	1,30	108,3

cesados en idénticas condiciones, pero sin la adición del tejido (standards).

Los resultados se expresaron en tanto por ciento de la radioactividad total inicial en el medio de incubación por 10 mg de tejido fresco. Los datos fueron sometidos al análisis estadístico mediante el test *t* de Student, de acuerdo con las tablas de FISHER y YATES (3).

### Resultados

En la tabla I se resumen los resultados obtenidos en tejidos incubados con glucosa marcada en el carbono 1. De todos los tejidos estudiados la máxima incorporación de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  en  $\text{CO}_2$  apareció en el hipotálamo anterior y posterior, tanto en animales en estro como en diestro. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente apreciables en la utilización de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  para formar  $\text{CO}_2$  por los distintos tejidos estudiados entre las ratas en diestro y en estro.

Cuando se utilizó glucosa-6- $\text{C}^{14}$  como sustrato, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  fue también superior en las áreas hipotalámicas anterior y posterior que en el resto de los tejidos estudiados (tabla I), mostrando la gran actividad metabólica de estos tejidos. Se observó un aumento significativo en la formación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa-6- $\text{C}^{14}$  por el hipotálamo anterior y posterior de rata en estro con relación a la en diestro. El hipotálamo medio, la amígdala,

el hipocampo y la hipófisis no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla II se indica la relación existente entre el  $^{14}\text{CO}_2$  producido por glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y glucosa-6- $\text{C}^{14}$  en un mismo grupo de tejidos. Aunque la utilización de distintos tejidos para cada determinación no permite los cálculos estadísticos en esta forma de expresión, puede observarse cómo esta relación aparece disminuida en hipotálamo anterior, medio, posterior y amígdala de los animales en estro con relación a los en diestro.

### Discusión

Aunque la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y glucosa-6- $\text{C}^{14}$  no permite conclusiones cuantitativas relacionadas con las vías degradativas de Emden-Meyerhof y del *shunt* de las hexosas monofosfato, estos parámetros se han utilizado como índices indirectos de estos metabolismos (1).

Los resultados presentados aquí muestran una mayor producción de  $\text{CO}_2$  a partir de glucosa-6- $\text{C}^{14}$  en las áreas hipotalámicas anterior y posterior de los animales en estro. Al no haber sido alterada la producción de  $\text{CO}_2$  a partir de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  por estos tejidos, la relación del  $\text{CO}_2$  de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  al  $\text{CO}_2$  de glucosa-6- $\text{C}^{14}$  aparece disminuida en las distintas áreas del hipotálamo de estos animales en relación a los en diestro. También aparece

disminuida esta relación en la amígdala cerebral de los animales en estro, no apareciendo diferencias entre los grupos experimentales en lo que se refiere a hipocampo e hipófisis.

Una disminución en esta relación, como la que aparece en las áreas hipotalámicas anterior, media, posterior y en la amígdala de las ratas en estro sugiere una mayor utilización de glucosa por la vía metabólica de Embjen-Meyerhof y ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Estos datos confirman y amplían trabajos anteriores en los que se apreciaba un mayor consumo de oxígeno en las mismas áreas de animales en estro (6, 8), así como un aumento en la actividad de enzimas del ciclo del ácido cítrico, tales como la succinodihidrogenasa (5).

El hecho de no haber hallado variaciones en la producción y relación de  $\text{CO}_2$  por ambos sustratos en hipocampo, amígdala e hipófisis no concuerda con las alteraciones del consumo de oxígeno encontradas en el sistema límbico (8) y en la actividad de la succinodihidrogenasa en la hipófisis (5) de ratas durante el ciclo sexual. Esta aparente discrepancia podría explicarse por la utilización de diferentes sistemas experimentales en estas determinaciones, aunque la realidad es que una modificación global del consumo de oxígeno e incluso una alteración en la actividad total de una enzima del ciclo de Krebs no tiene necesariamente que ir acompañada de cambios apreciables en la producción de  $\text{CO}_2$  por glucosa-1- $\text{C}^{14}$  o glucosa-6- $\text{C}^{14}$  y/o su relación.

### Resumen

Se determinó la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  *in vitro* por las áreas hipotalámicas anterior, media,

posterior, amígdala cerebral, hipocampo e hipófisis de ratas en diestro y estro, a partir de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y glucosa-6- $\text{C}^{14}$  como sustratos.

Los resultados mostraron una mayor producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de glucosa-6- $\text{C}^{14}$  en las áreas hipotalámicas anterior y posterior de las ratas en estro respecto de las en diestro, siendo estas diferencias estadísticamente significativas, con una probabilidad de  $p < 0.02$  para el hipotálamo anterior y de  $p < 0.05$  para el posterior.

Cuando se utilizó glucosa-1- $\text{C}^{14}$  no se observaron diferencias de significación estadística en ninguno de los tejidos estudiados durante el ciclo sexual de estos animales. La relación  $^{14}\text{CO}_2$  proveniente de glucosa-1- $\text{C}^{14}$  y  $^{14}\text{CO}_2$  proveniente de glucosa-6- $\text{C}^{14}$ , aparece disminuida en las distintas áreas hipotalámicas y en la amígdala cerebral de las ratas en estro respecto a las en diestro.

### Bibliografía

1. DUNCAN, H. J.: *Canad. J. Biochem.*, **46**, 1321, 1968.
2. EVERET, J. W.: *Physiol. Rev.*, **44**, 373, 1964.
3. FISHER, R. A. y YATES, F.: *Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research*, 5.<sup>a</sup> ed., Hafner, Nueva York, 1957.
4. LIBERTUN, C., MOGULEVSKY, J. A., SCHIAFFINI, O. y FOGLIA, V. G.: *Experientia*, **25**, 196, 1969.
5. MOGULEVSKY, J. A., DAHL, V. y GÓMEZ, C. I.: *Acta Physiol. Latinoamer.*, **14**, 304, 1964.
6. MOGULEVSKY, J. A. y MALINOW, M. R.: *Amer. J. Physiol.*, **206**, 855, 1964.
7. MOGULEVSKY, J. A., SCHIAFFINI, O. y FOGLIA, V. G.: *Life Sci.*, **5**, 447, 1966.
8. SCHIAFFINI, O., MARÍN, B. y GALLEGO, A.: *Experientia*, **25**, 1255, 1969.
9. TERASAWA, E. y TIMIRAS, P. S.: *Endocrinology*, **83**, 207, 1968.
10. UMBRETT, M. N., BURRIS, R. H. y STAUFFER, J. F.: *Manometric Techniques*, Third Edition, Burgess, Minneapolis, 1959.