

ACCION DE LA TRH SOBRE HIPOFISIS DE RATA EN CULTIVOS ORGANOTIPICOS: II. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y ESTEREOLOGICO DE LAS CELULAS MAMOTROPAS.

(EFFECT OF TRH ON THE RAT HYPOPHYSIS IN ORGANOTYPIC CULTURES. II. A ULTRASTRUCTURAL STEREOLOGICAL STUDY OF MAMMOTROPE CELLS).

por

Jiménez Reina, L.\*, J. García García\*, A. Blanco Rodríguez\*\* y G. Bernal Valls\*

\* Departamento de Anatomía Humana. Facultad de Medicina. Córdoba (España).

\*\* Departamento de Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria. Córdoba (España).

Palabras clave: Animales de laboratorio. Fisiología. Hormonas. PRL. TSH. Citología. Estereología.

Keywords: Laboratory animals. Physiology. Hormones. PRL. TSH. Citology. Stereology.

Summary

We have made an ultrastructural study of mamotropes cells, in organotypical cultures of the hypophysis, in the presence of TRH, at different doses and cultivation times. The data obtained permit us to conclude that in our experimental conditions the TRH stimulates the liberation and synthesis of PRL in mamotropes cells. This increase appears to be dose-time and intensity related. Stereologic data confirm the increase in the liberation and synthesis of PRL by the action of TRH.

Resumen

En nuestras condiciones experimentales la TRH estimula la liberación y síntesis de las mamotropas. Este incremento parece tener una relación dosis-tiempo e intensidad de la respuesta. Los datos estereológicos confirman el incremento en la liberación y síntesis de PRL por acción de la TRH.

Recibido para publicación el 9-1-1985.

REINA ET AL.: ACCION DE LA TRH SOBRE HIPOFISIS. II. CELULAS MAMOTROPAS.

Los efectos farmacológicos de la hormona liberadora de la tireotropina (TRH), sobre la liberación de prolactina (PRL) están aceptados<sup>1,5</sup> y, así, la administración por distintas vías produce aumentos séricos de PRL, que alcanza su máximo valor a los 20 minutos<sup>2</sup>. La cuestión radica en saber si la TRH juega un papel fisiológico en la regulación de la secreción de PRL. La evidencia más directa deriva de la demostración de que la administración de anti-suero para la TRH, en ratas, lleva a una disminución del 50 % y 70 % de la PRL y TSH séricas, respectivamente<sup>3</sup>.

In vitro la TRH provoca una marcada estimulación de la síntesis y secreción de PRL<sup>1,4,5</sup>. A su vez, la TRH es capaz de autorregular la cantidad de sus receptores en clones celulares que producen PRL, como son las células GH<sub>3</sub><sup>6</sup>. En otro clon celular (SD1) se ha observado la internalización endocítica de los receptores y su degradación por enzimas lisosomiales.

La liberación de PRL por acción de la TRH se traduce por la descarga de la hormona almacenada<sup>8,9</sup>. Se observan, por tanto, figuras de exocitosis de los gránulos maduros en los primeros minutos de actuación de la TRH<sup>7,10,11,12</sup>. Ultraestructuralmente, además, existen modificaciones en el complejo de Golgi, concomitantes con la formación de nuevos gránulos secretorios<sup>7,10</sup>. La superficie del RER alcanza su máximo a los 20 minutos<sup>13</sup>. La TRH origina que las cisternas del RER y los sáculos del Golgi se presenten llenos de PRL inmunoreactiva, tras una hora de tratamiento; en consecuencia, la TRH induce una pérdida inicial de PRL, seguida por un progresivo incremento de la hormona intracelular<sup>14</sup>. Otros datos ultraestructurales son el aumento en la formación de cuerpos multivesiculares, de microvesículas ex novo y de aceleración de la renovación de las vesículas de pinocitosis<sup>7</sup>. Existe también un aumento del número de lisosomas tras la exposición a la TRH<sup>15</sup>, lo que sugiere la posibilidad de que durante la liberación de PRL, inducida por la TRH, exista una concomitante retención y subsiguiente degradación de la hormona, por los lisosomas. Es posible que la acción de la TRH sobre la célula se produzca a varios niveles<sup>16</sup>. En resumen, parece que la TRH in vitro induce la liberación de PRL a través de una aceleración en el transporte de la hormona.

Pretendemos con este trabajo realizar el estudio ultraestructural y estereológico de las células mamotropas de hipófisis cultivadas ante distintos tiempos de cultivo y distintas dosis de TRH, con objeto de

encontrar datos que puedan aportar nuevos conocimientos sobre las relaciones morfológico-funcionales.

### Material y métodos

Se usan hipófisis de ratas Wistar de ambos sexos, cuyos pesos oscilan entre los 200 y 250 g. El procedimiento fue el descrito previamente<sup>17</sup>. Tras una hora de precultivo en medio 199, las hemihipófisis se colocan de forma tal que cada una de ellas tenga como control su correspondiente mitad. Las dosis de TRH utilizadas son de 100, 250 y 500 ng de TRH por ml de medio de cultivo; y los tiempos de observación, de 15, 30, 45, 60 y 75 minutos.

Las piezas se fijan en glutaraldehído al 2% y se postfijan en tetróxido de osmio al 1%. Se deshidrataron en acetona y se embebieron en araldita. Los cortes ultrafinos se tiñeron por la doble coloración de Reynolds. Además del estudio ultraestructural de las mamotropas, hemos realizado su estudio estereológico siguiendo el procedimiento de Weibal y Bolender<sup>18</sup>. Para ello usamos micrografías aumentadas a 8883x y 15837x, para cuantificar distintos parámetros, como son las densidades de volumen de la célula, del núcleo, del RER, del complejo de Golgi y las densidades de superficie del RER y del complejo de Golgi.

### Resultados

#### Respuesta a la TRH: datos ultraestructurales.

a) Con 100 ng de TRH por ml de medio observamos una ligera depleción granular, que atribuimos a exocitosis previa. Vemos estas imágenes a los 15 minutos de cultivo (fig. 1). Ni el complejo de Golgi ni el RER presentan modificaciones con respecto a los controles.

b) Con 250 ng de TRH se observan imágenes de exocitosis durante más tiempo, incluso hasta los 45 minutos (fig. 2). Hacia los 30 minutos existe ya un aumento de las formas granulares inmaduras, en la región del complejo de Golgi (fig. 3), que ya está dilatado. El RER aparece extenso, de aspecto vesiculoso y con contenido escasamente denso (fig.4).

c) Con 500 ng de TRH la dotación granular está disminuida, por exocitosis previa, y se observa cómo las formas granulares maduras se sitúan en la periferia celular (fig. 5). Al mismo tiempo las formas granulares

inmaduras son las más abundantes en la región del complejo de Golgi (figs. 5 y 6), que se encuentra dilatado, con abundantes cisternas de contenido denso (fig. 6). Hacia los 75 minutos, los datos ultraestructurales se muestran semejantes a los de los controles.

Respuesta a la TRH: datos estereológicos.

a) Volumen celular. En la fig. 7 vemos cómo los máximos incrementos se presentan con 500 ng de TRH por ml de medio, con cifras de  $207.5 \pm 60.5 \mu^3$ , a los 45 minutos de cultivo. Estos incrementos suponen una elevación del 130 % con relación a los controles. Con 100 y 250 ng de TRH los incrementos llegan al 102 y 110 % de los controles. El volumen citoplasmático sufre en todos los casos las mismas modificaciones que el volumen celular.

b) Volumen nuclear. Los aumentos del volumen nuclear (fig. 8) llegan a  $58.9 \pm 21 \mu^3$ , con la dosis de 500 ng, lo que supone aumentos del 112% en relación a los controles.

c) Volumen y superficie del RER. Los aumentos del volumen del RER (fig. 9) son estadísticamente significativos con 250 y 500 ng de TRH, pero no con 100 ng. Los picos máximos, con estas dosis, se producen a los 60 y 45 minutos, respectivamente, con valores de  $66.7 \pm 8.0$  y  $81.5 \pm 11.7 \mu^3$  en cada caso.

La superficie del RER sólo presenta aumentos significativos (fig. 10) con la mayor dosis utilizada. El pico es máximo a los 45 minutos de cultivo, con cifras de  $1060 \pm 107.9 \mu^2$ .

d) Volumen y superficie del complejo de Golgi. El volumen del complejo de Golgi aumenta paulatinamente a medida que la dosis de TRH usada aumenta (fig. 11). Los picos se presentan a los 45 minutos de cultivo, con 500 ng de TRH y cifras de  $32.8 \pm 10.4 \mu^3$ .

La superficie del Golgi (fig. 12) sólo aumenta significativamente con 500 ng de TRH y tiene su pico con  $382 \pm 69.0 \mu^2$ , a los 45 minutos de cultivo.

Discusión

En nuestras condiciones experimentales la TRH provoca, sobre las células mamotropas de hipófisis de rata, una liberación e incremento

de la síntesis de PRL. La liberación del material secretorio por parte de las células mamotropas se realiza a través de sus gránulos maduros, como se observa en las imágenes de exocitosis y como se ha indicado anteriormente <sup>8,9</sup>. Esta acción se ve ya con la dosis mínima empleada, pero no se evidencian signos de aumento en la actividad secretora, como ocurre con las células TSH a esta dosis <sup>19</sup>.

Las dosis de 250 y 500 ng de TRH/ml de medio producen sobre las mamotropas no sólo una degranulación por exocitosis <sup>7, 10, 11, 12</sup>, sino también un aumento de la actividad secretora, que se traduce por modificaciones evidentes en las características del RER y del complejo de Golgi. El RER aparece en estos casos dilatado, extenso y con contenido denso a los electrones, lo que lleva a pensar que existe un progresivo aumento en la producción de hormona intracelular <sup>14</sup>. La superficie del RER alcanza su máximo valor a los 45 minutos de cultivo, con la mayor dosis que hemos empleado, a diferencia de los 20 minutos que señala Okino <sup>13</sup>. El volumen del RER alcanza su máximo valor a los 45 minutos, con la mayor de las dosis; y a los 60 minutos, con 250 ng de TRH. El complejo de Golgi muestra dilataciones y aumento del número de sus sáculos, así como incremento de las formas granulares inmaduras en relación a su cara CIS <sup>7, 10</sup>. Tanto el volumen como la superficie del complejo de Golgi alcanzan sus máximos valores a los 45 minutos de cultivo, con la dosis de 500 ng.

El hecho de que la actividad celular disminuya hasta el nivel de los controles puede apoyar la idea de la autorregulación que la PRL determina sobre su propia secreción y que ha sido señalada tanto in vivo <sup>20</sup> como in vitro <sup>21</sup>.

En suma, la TRH produce sobre las células monotropas de hipófisis de rata, en cultivos organotípicos, un aumento de la liberación y síntesis de PRL que parece guardar una relación dosis-tiempo e intensidad de la respuesta.

#### Bibliografía

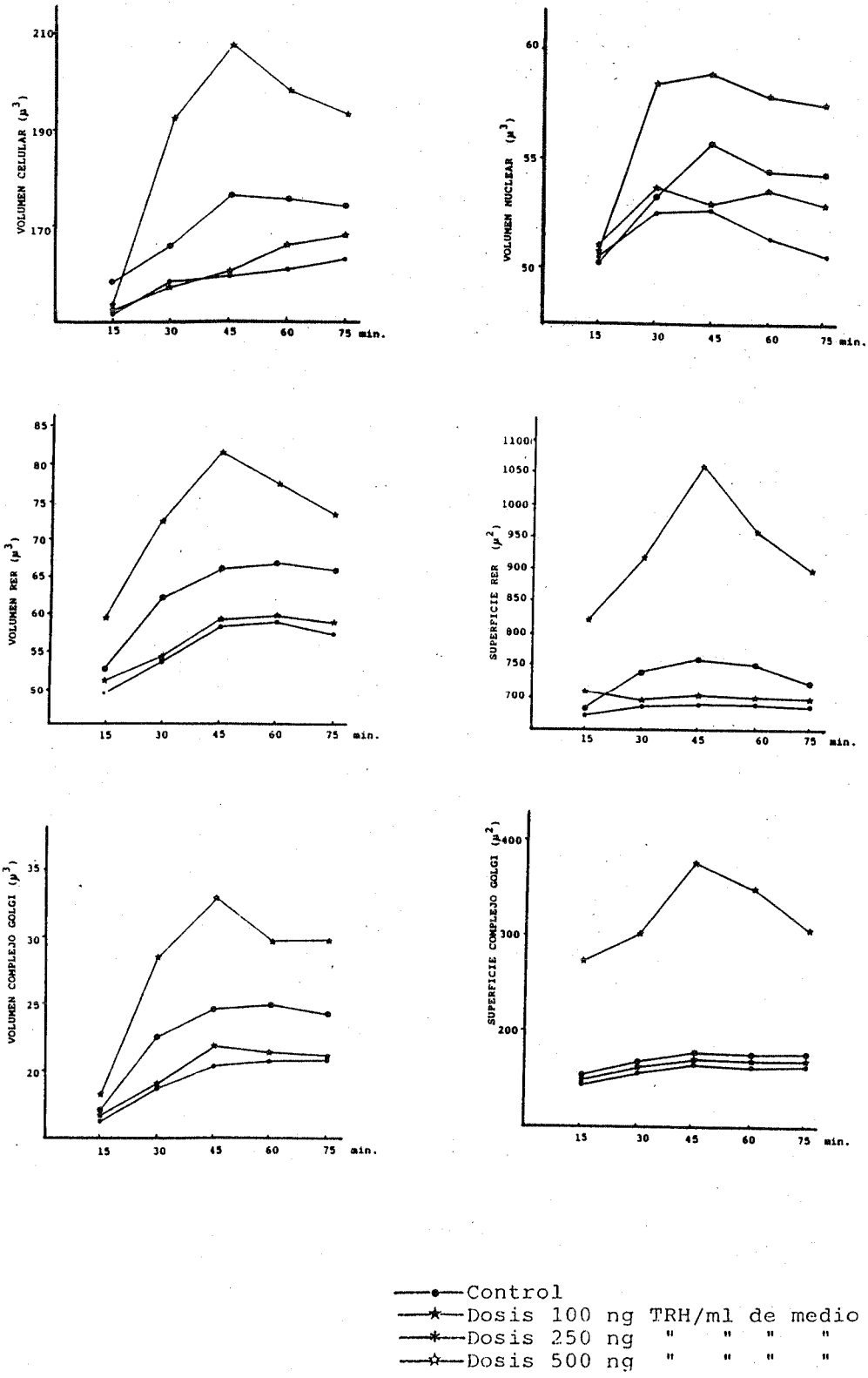
1. Chen, H.J. and J. Meites. Effects of biogenic amines and TRH on release of prolactin and TRH in the rat. Endocrinology, 96, 10-14 (1975).
2. Ylikorkala, O., S. Kivinen and M. Reinilla. Serical prolactin and thyrotropin responses to thyrotropin releasing hormone throughout normal human pregnancy. J. Clin. End. Metab., 48, 288-292 (1979).

REINA ET AL.: ACCION DE LA TRH SOBRE HIPOFISIS. II. CELULAS MAMOTROPAS.

3. Koch, Y., G. Goldhaber, I. Fireman, E. Zor, J. Shani and E. Tal. Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the rat by anti-serum to thyrotropin releasing hormone. Endocrinology, 100, 1476-1478 (1977).
4. Drouin, J., A. DeLean, D. Rainville, R. Lachance and F. Labrie. Characteristics of the interaction thyrotropin releasing hormone. Endocrinology, 98, 514-518 (1976).
5. Tashjian, A.H. Jr., N.J. Barowsky and D.K. Jensen. Thyrotropin releasing hormone: Direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 516-519 (1971).
6. Hinkle, P.M. and A.H. Tashjian Jr. Thyrotropin releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH<sub>3</sub> strain of pituitary cells in culture. Biochemistry (USA), 14, 3845 (1975).
7. Tixier-Vidal, A., N. Brunet and D. Gourdj. Plasma membrane modifications related to the action of TRH on rat prolactin cells lines. Apud: Hormones and cell culture (G.H. Sato and R. Ross eds.) Book Coed Spring Harbor Conj. on Cell Proliferation. Vol. 6. Cold Spring Harbor Lab. pp. 807-825 (1979).
8. Walker, A.M. and M.G. Farquhar. Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammothrophs. Endocrinology, 107, 1095-1104(1980).
9. Grosvenor, C.E. and F. Mena. Regulating mechanism for oxytocin and prolactin secretion during lactation. Apud: Neuroendocrine Perspectives (E.E. Müller and R.M. MacLeod eds.) Vol. 1. pp. 69-110. Elsevier Biomedical Press (1982).
10. Tixier-Vidal, A., C. Tougard, B. Dufy and J.D. Vicent. Morphological, functional and electrical correlates in anterior pituitary cells. Apud: Neuroendocrine Perspectives (E.E. Müller and R.M. MacLeod eds.) Vol. 1. pp. 211-251 (1982).
11. Pawlikoswki, M., M. Karasek and J. Kuner-Radek. Influence of thiro-tropin releasing hormone and dibutyryl ciclic adenosine 3'-5' monophosphate on ultrastructure of adenohipophysis in organ culture. Endokrinologie, 66, 306-312 (1975).

REINA ET AL.: ACCION DE LA TRH SOBRE HIPOFISIS. II. CELULAS MAMOTROPAS.

12. Wilbur, D.L., J.A. Yee and S.E. Raigue. Hypophysal portal vascular infusion of TRH in the rat: An ultrastructural and radioimmunoassay study. Am. J. Anat. 151, 272-283 (1978).
13. Okino, H., S. Matsui, S. Shioda, Y. Nakai and K. Kurosumi. Ultrastructural and morphometric studies on the rat pituitary thyrotrophs and thyroid follicular cells following administration of thyrotropin releasing hormone. Archivum Histologicum Japonium, 42, 482-505 (1979).
14. Hoyt, R.F. Jr. and A.H. Tashjian Jr. Immunocytochemical analysis of prolactin production by monolayer cultures of GH<sub>3</sub> rat anterior pituitary tumor cells: II. Variation in prolactin content of individual cell colonies and dynamics of stimulation with TRH. Anat. Rec. 196, 163-181 (1980).
15. Tixier-Vidal, A. and D. Gourdji. Endocytosis in cultured prolactin cells. Apud: Central and Peripheral regulation of prolactin function. (R.M. MacLeod and V. Scapagnini, eds.) pp. 125-140. Raven-Press, New York (1980).
16. Goudji, D. Characterization of thyroliberin (TRH) binding sites and coupling with prolactin and growth hormone secretion in rat pituitary cell lines. Apud: Synthesis and release of adenohipophysal hormones. (M. Justiz and K.W. Kerus, eds.) pp. 463-493. Plenum press. New-York (1980).
17. Tixier-Vidal, A. Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture. Apud: The anterior Pituitary (ultrastructural in biological systems, vol. 7) (A. Tixier-Vidal and M.G. Farquhar, eds) pp. 181-224. Academic Press. New York (1975).
18. Weibel, E.R. and R.P. Bolender. Stereological techniques for electron microscopic morphometry. Apud: Principles and Techniques of electron microscopy (Biological applications) Vol. 3. pp. 237-296 (M.A. Hayat, eds) VanNostrand Reinhold Company. London. (1973).
19. Convey, E.M., H.A. Tucker, V.G. Smith and J. Zolman. Bovine prolactin, growth hormone, thyroxine and glucocorticoid response to thyrotropin releasing hormone. Endocrinology, 92, 471-476 (1973).



Figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12