

R. 3.949

T.O.
A/21

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II



INFLUENCIAS DE LAS GONADOTROFINAS LUTEOESTIMULANTES,
FOLICULOESTIMULANTE Y CORIONICA SOBRE LA PRODUCCION
DE TESTOSTERONA POR LA CELULA DE LEYDIG AISLADA DE
RATA.

ANTONIO AZNAR MARTIN
Noviembre, 1.976



ANTONIO AZNAR REIG, CATEDRATICO NUMERARIO
DE PATOLOGIA Y CLINICA MEDICAS II DE LA FACUL
TAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que D. ANTONIO AZNAR MARTIN ha estado desarro
llando el siguiente trabajo: "Influencia de las Go
nadotrofinas Luteoestimulantes, Foliculoestimulan
tey Coriónica sobre la Producción de Testosterona
por la Célula de Leydig aislada de Rata", para po
der acceder al grado de Doctor.

Y para que conste, y surta los efectos oportu
nos, expido el presente certificado en Sevilla a 27 de
Noviembre de 1.976

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Antonio Aznar Reig".

Fdo. Prof. Aznar Reig

A handwritten mark or signature in black ink, consisting of a large, stylized letter 'A' followed by a horizontal line and a vertical stroke.

"Me niego a aceptar el fin del hombre... El hombre es inmortal no sólo porque es el único, entre todos los seres que posee una voz inagotable, sino porque tiene alma, un espíritu capaz de compasión, sacrificio y resistencia"

William Faulkner, 1.949

A mis padres, Loles y Sabina.



Mi sincero agradecimiento:

Al Prof. A. Aznar Reig, por cuya dirección y consejo he logrado eficazmente mi labor.

Al Dr. Emilio Herrera Justiniano, amigo, e infatigable trabajador, que me estimuló y ayudó día a día en la realización de este trabajo.

A la Dra. Milagrosa Díaz Galvez, mi gratitud por su desinteresada y eficaz ayuda en el Laboratorio.

A la Srta. Mercedes Villaescusa Martínez, que con paciencia y entusiasmo logró una perfecta transcripción del manuscrito.

I N D I C E

CAPITULO I:	
Abreviaturas empleadas 8
CAPITULO II:	
Introduccion e Hipótesis de trabajo	
A.- Introducción	
1) Concepto actual de endocrinopatia. 9
2) Gonadotrofinas: estructura, heterogenicidad y liberación. 12
3) Receptor de membrana. 22
4) Aconteceres intracelulares después de la ocupación del receptor por la hormona polipéptida. 25
B.- Hipótesis de trabajo 34
CAPITULO III:	
Material y Métodos 37
CAPITULO IV:	
Resultados Obtenidos 50
CAPITULO V:	
Epicrítica de los resultados obtenidos 72
CAPITULO VI:	
Conclusiones 79
CAPITULO VII:	
Bibliografía 81

C A P I T U L O I

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ATP : Trifosfato de adenosina.
BSA : Seroalbúmina bovina.
cAMP : Adenosin monofosfórico cíclico.
FSH : Hormona foliculoestimulante.
g : unidades de gravedad.
H³ : tritio.
hCG : Gonadotrofina coriónica humana.
hCG- α : subunidad α de gonadotrofina coriónica humana.
hCG- β : subunidad β de gonadotrofina coriónica humana.
hFSH : Hormona foliculoestimulante humana.
HLA : antígenos de histocompatibilidad de leucocitos.
hLH : Hormona luteoestimulante humana.
hLH- α : subunidad α de la hormona luteinizante humana.
hLH- β : subunidad β de la hormona luteinizante humana.
LH : Hormona / Factor liberador de hormona luteinizante.
M : molar.
mCi : milicurios.
mg : miligramos = 10^{-3} gramos
ml : mililitros.
mu : miliunidades.
m U.I. : miliunidades internacionales.
ng : nanogramos = 10^{-9} gramos.
oLH- α : subunidad α de la hormona luteinizante ovina.
oLH- β : subunidad β de la hormona luteinizante ovina.
PBS : buffer fosfosalino.
pg : picogramos = 10^{-12} gramos.
r.p.m. : revoluciones por minuto.
T : testosterona.
U.N.E. : unión no específica.
 μ g : microgramos = 10^{-6} gramos.
 μ l : microlitros = 10^{-6} litros.

C A P I T U L O I I

INTRODUCCION E HIPOTESIS DE TRABAJO

I N T R O D U C C I O N

1.- CONCEPTO ACTUAL DE ENDOCRINOPATIA

El simplista y confuso concepto de una endocrinopatía, en la clínica se correlacionaba con la presencia en sangre circulante de un exceso o escasez de hormonas, ya no satisface; y aún cuando, el primer paso objetivo, sea la dosificación hormonal en el plasma, éste es el inicio de una serie de exploraciones, en las cuales, no sólo se busca cuantificar unas hormonas, sino comprobar asimismo, el estado funcional de la glándula productora, por pruebas de estimulación y frenación; y como en efecto, algunas están encadenadas en un complejo mecanismo, y sea ejemplo de ello en nuestro caso, el eje hipotálamo-hipófisis-gonadas, otro paso es comprobar además el funcionamiento de los distintos eslabones de la cadena, para concretar el nivel causante de la endocrinopatía. Por ejemplo hipogonadismo primario si la glándula efectora no responde; secundario, si al estar ésta en buenas condiciones funcionales el fallo reside en la hipófisis: hipogonadismo-hipofisario; o si en el hipotálamo: hipogonadismo-hipotalámico; o si en aquellos mecanismos que ponen en marcha la producción de hormonas liberadoras hipotalámicas, serían los hipogonadismos suprahipotalámicos.

Pero sin entrar en la faceta plasmática hormonal, en la cual, la presencia y ocupación competitiva de la proteína transportadora, TBG (Testosterona Binding Globulin), por los andrógenos y los estrógenos, puedan dar lugar a matices; la importancia actual se centra en el "órgano efector", y en -

los diversos acontecimientos que tienen lugar en él, cuando impacta la hormona: "receptor" de membrana, síntesis de AMP cíclico y de las vías alternativas, activación de la proteinkinasa, afectación del núcleo, y puesta en marcha de la estoidogénesis; en nuestro caso testosterona; y que ha dado lugar recientemente al nuevo concepto de "anti-hormona", para referirse a "todas aquellas sustancias que actúan alterando la respuesta hormo-inducida sin reparar en su mecanismo" BLUNDELL (3).

Cada célula eucariótica, posee toda la información genética necesaria para el desarrollo, economía y reproducción de todo el organismo, como demostró GURDON (29) (28), al conseguir transferir el núcleo de una célula somática diferenciada (célula epitelial del intestino del renacuajo *Xenopus*) al huevo fertilizado, que le habían quitado su propio núcleo, y conseguir que el 20 por 100 de los núcleos trasplantados, lograran desarrollar seres complejos: ranas, idénticas a las de donde procedía el núcleo de la célula, o sea, que toda la célula por especializada que esté, no ha perdido ningún tipo de genes, los cuales unos están inactivados (reprimidos), y solamente algunos son activos, aquellos genes que habitualmente se manifiestan en aquellas células.

El efecto hormonal, tanto de los esteroides como de las hormonas polipéptidas, consiste en poner de manifiesto o en actividad, los genes del núcleo de la célula efectora o diana ("target"). En determinados momentos, esta de-represión selectiva y fisiológica, que está controlada muy específicamente, por mecanismos de una gran estabilidad y por mecanismos de retrocontrol ("feedback") DAVIDSON y cols. (15), se altera, y los genes normalmente reprimidos se manifiestan, así por ejemplo, las células neoplásicas en algún caso dan lugar a manifestaciones clínicas que se conocen por el nombre de Síndromes paraneoplásicos, y que referidos a la Endocrinología dan lugar a Síndromes hiperfuncionales hormonales, por producción inadecuada y ectópica de hormonas AZNAR REIG y AZNAR MARTIN (1).

La regulación de la expresión de los genes de las células en situación fisiológica, responden a dos tipos de señales: a) intermediarios metabólicos, que influyen sobre la actividad de enzimas específicos, y b) mediadores químicos, los cuales unos son liberados en la vecindad de las células, como resultado de la actividad eléctrica (neurotransmisores), o se han liberado a distancia en órganos endocrinos (hormonas).

Estas hormonas, ejercen a su vez un doble tipo de control: 1) específico, por su impacto sobre el "receptor" en la célula diana ("target"), y sería el efecto hormonal específico, y 2) efecto pleiotrópico, TOMKINS y GELEHRTER (60). La respuesta pleiotrópica, comprende un complejo de acciones coordinadas, que son inhibidas o estimuladas cuando el crecimiento celular está afectado por la hormona; y así, la respuesta pleiotrópica negativa, consiste en la inhibición de la toma de glucosa y precursores de ácidos nucleicos, inhibición de mRNA y consiguiente no-síntesis de proteínas, impide la formación de polisomas e incrementa el catabolismo proteico intracelular; hechos que objetivan lo que confusamente intuye el clínico, al hablar de acción inespecífica (o no-hormonal) de las hormonas, al lucubrar sobre una acción inespecífica de las hormonas en su empleo terapéutico.

Esta revisión panorámica de la problemática que inquieta al investigador y clínico inmersos en la Endocrinología, ha hecho que intentemos - adentrarnos en alguna faceta de las comentadas, como indicaremos al plantear la hipótesis de trabajo.

2.- GONADOTROPINAS: ESTRUCTURA, HETEROGENEIDAD Y LIBERACION EN PLASMA.

Ya está concretado que la hipófisis produce hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo-estimulante (FSH) ambas están segregadas por las células basófilas del lóbulo anterior de la hipófisis, y su secreción está bajo control hipotalámico a través de un factor estimulante-liberador, del cual se conoce su estructura péptida:

(pyro) -GLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-POR-GLY-NH₂

y se denomina LH-RF, LH-RH ó Gn-RH, hormona liberadora de gonadotrofinas. Fue aislada en 1.971 por SCHALLY y cols. (56) en el hipotálamo de cerdo; y posteriormente por GEIGER y cols. (26) y BURGUS y cols. (4).

En el hombre, la LH es responsable del desarrollo morfológica y del estímulo de la secreción de andrógenos por las células de Leydig, y la FSH es la principal responsable de la espermatogénesis.

LH y FSH son glicoproteínas, compuestas de dos subunidades; una denominada β es distinta para cada hormona, y la otra, denominada α es común a estas dos hormonas; a la hormona tiroestimulante y a la gonadotrofina coriónica humana. Esta última hormona ha sido aislada y extraída de la placenta humana y de orina de embarazada (30-55 días de gestación) y tiene efectos biológicos idénticos o semejantes a la LH.

La estructura primaria de la LH hipofisaria y de sus subunidades, unidades no-covalentes, que han sido aisladas y purificadas en diferentes especies animales (humana, bovina, ovina, porcina y rata) es en parte conocida. En la figura A tomada de BISHOP y cols. (2) se ven las secuencias de la subunidad α de la LH, hCG de ovino, bovino y humano; y se aprecia una considerable homología en las diferentes especies, la secuencia del N-terminal de las diferentes especies se aprecia en la figura B tomada de BISHOP y cols. (2) viendose que es heterogénea.

Aunque la secuencia de la mitad hidrocarbonada de la subunidad α de la LH y TSH no está todavía bien establecida, en la LH ovina, bovina, porcina y probablemente humana, contiene tres subunidades laterales heterosacáridas, dos de ellas unidas a la subunidad α y una de ellas unida a la subunidad β , (ver TABLA I) de JUSTISZ y cols. (33), y parece ser que hay una sorprendente diferencia, fundamentalmente por la ausencia de N-acetilgalactosamina y la presencia de ácido siálico y galactosa en la hCG- α ; sin embargo parece concluirse que la mitad hidrocarbonada no es importante para la actividad biológica en el receptor, pero puede jugar un papel en el aclaramiento metabólico; aunque no está determinada su función exacta.

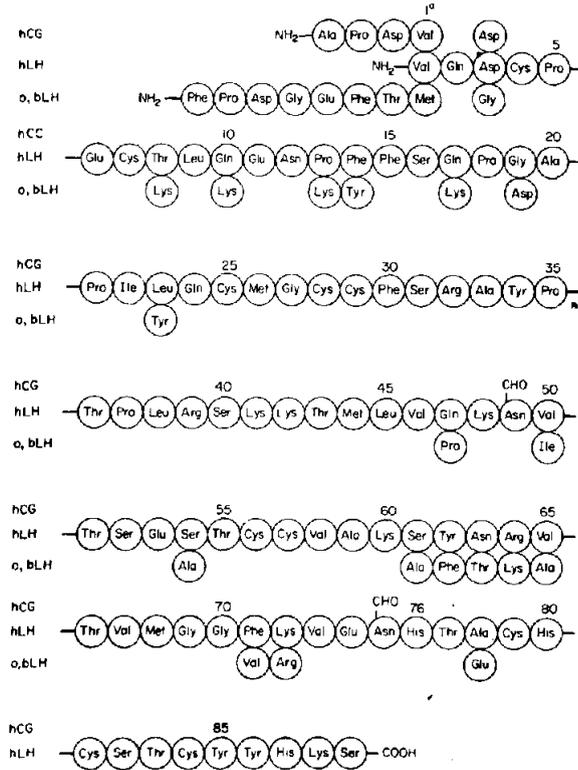


FIGURA A

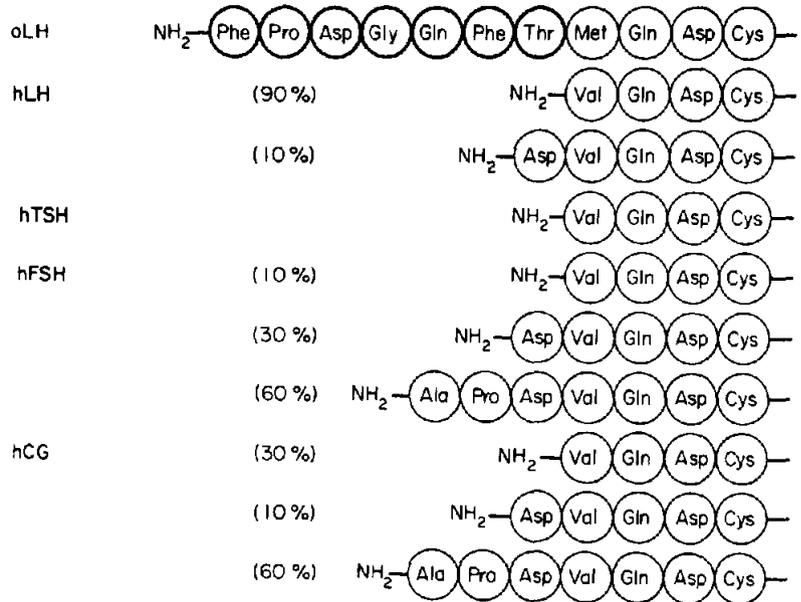


FIGURA B

Carbohydrate	Ovine ^a			Bovine ^b			Porcine ^c			Rat ^d			Human (pituitary) ^e		
	Na- tive ¹	$\alpha^{1,2}$	$\beta^{1,2}$	Na- tive ¹	$\alpha^{1,2}$	$\beta^{1,2}$	Na- tive ¹	α^2	β^2	Na- tive ¹	α^1	β^1	Na- tive ¹	α^1	β^1
Mannose	7.2	3-4	2	9	7-9	3-4	8.4	6.4	2.5	6	3	2	8.3	4.7	2.2
Galactose	1.1	1	0.5	0	0	0	1.2	0.9	0.2	2	1	1	3.7	2.4	1
Fucose	1.6	1	0.9	1.6	0.7-1.4	0.8-1	1.5	0.8	0.8	2	1	1	2.0	0.5	0.7
Glucosamine	8.5	5	2.9	10	4-5	2-3	8.1	3.9	2.8	13	8	4	11.3	8.0	3.7
Galactosamine	3.4	1.5	0.9		1.5-2	1.5-1.8	3	1.5	1.6	3	1	1	1.9	1.2	0.6
Sialic acid													2.3	0.2	0

TABLA I



En la figura C tomada de BISHOP y cols. (2) se aprecia la secuencia de aminoácidos de la subunidad β hormono-específica de la h-LH, hFSH y hCG. Y comparando hLH- β con hCG- β se puede apreciar - que la mayor diferencia observada es en el final de C-terminal (la molécula de hCG es 28 a 30 residuos más larga); y en la localiza— ción de las cadenas laterales de carbohidrato, parece ser que la di— ferencia en la actividad biológica y/o actividad inmunológica hLH y hCG, reside en este péptido. En cuanto a la acción biológica, la di— sociación de la oLH en dos subunidades es acompañada de la pérdida de aproximadamente el 90 por 100 de su actividad biológica DE LA LLOSA y cols. (19) y CATT y cols. (9); este mismo efecto se ha visto en la hLH; la potencia de la hLH- α y la hLH- β fue de 3 por 100 y 13,9 por 100 respectivamente de la hLH activa, LEE y cols. (38).

Son interesantes asimismo, los estudios que se han hecho sobre las alteraciones de la estructura primaria y su actividad bio— lógica, DE LA LLOSA y cols. (19) producen alteraciones en la subuni— dad β , y reasocian con la subunidad α , esto induce una significativa alteración en la actividad biológica, afectando a un 50 por 100 de la actividad de la LH reconstituida, cuando se compara con la re— construcción de las dos subunidades intactas. La LH obtenida por - reasociación de la subunidad β intacta y la subunidad α alterada, exhibe una actividad biológica semejante a la LH reconstituida con subunidades intactas α y β . Estos resultados sugieren, que la afec— tación del segmento dodecapéptido 44-53 de la subunidad β afecta - significativamente la actividad biológica y probablemente en la ca— pacidad de unión de la hormona al receptor.

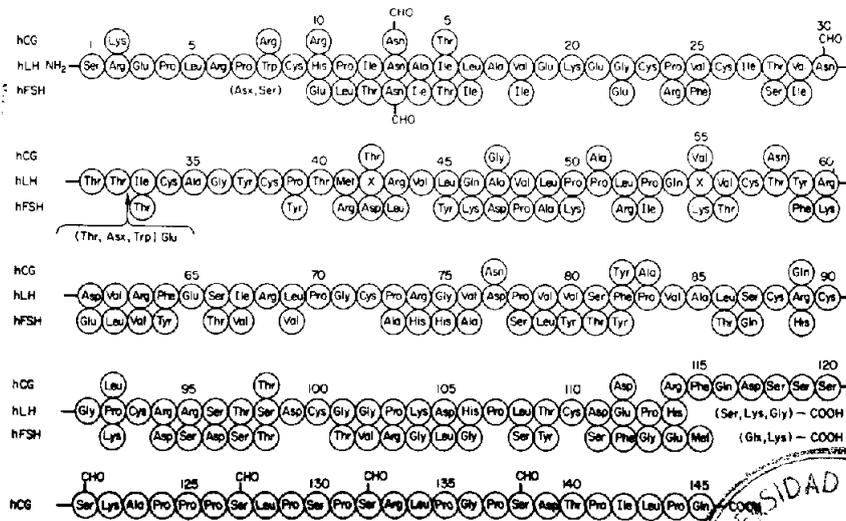


FIGURA C

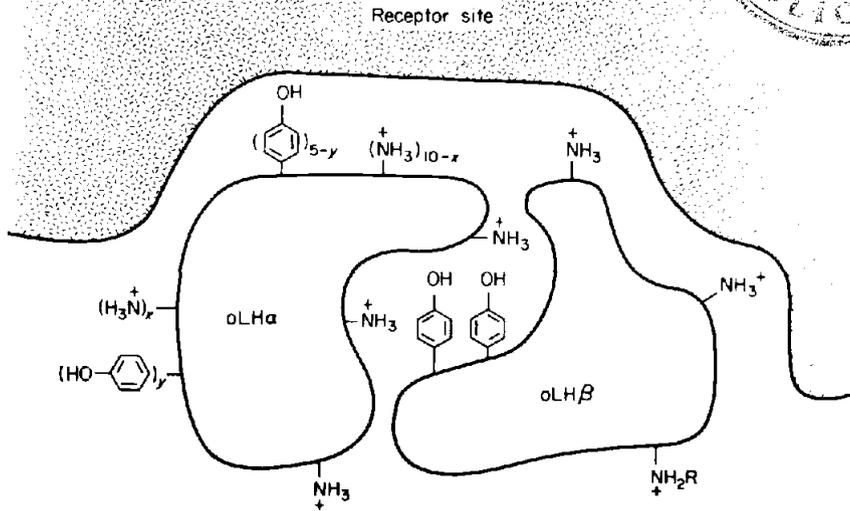


FIGURA D

Asimismo LIU y cols. (41), encuentran que la nitratación de varios grupos tiróxicos 4 ó 5 en la oLH- α disminuye significativamente la unión de esta subunidad a la subunidad no tratada oLH- β , y reduce marcadamente su actividad biológica. Los datos anteriormente expuestos indican que:

1) Dos grupos de aminoácidos de la oLH- β pueden estar involucrados en la unión al receptor, y pueden ser neutros, por estar cargados positivamente.

2) Dos grupos de aminoácidos en la cadena oLH- α están involucrados en la interacción de la subunidad, y están enmascarados por acilación, y

3) Dos de los 8 grupos de aminoácidos en la cadena están involucrados en la unión con el receptor. En la figura D tomada de LIU y cols. (41) resumen las interacciones de las subunidades y la unión al receptor.

La concentración en el suero de LH y FSH, en el hombre es de 0,3 a 30 mg/ml (10^{-9} - 10^{-11} M) y en nuestro laboratorio las cifras obtenidas han sido 3 a 10 mU/ml.

La desaparición de LH y de FSH del plasma, se produce de una forma bifásica; y así la vida media inicial de LH es de 18 minutos, y otra onda a los 194 minutos aproximadamente, REBAR y cols. (51). La vida media de FSH es de 3,9 horas la primera honda y 7 a 4 horas la segunda, YEN y cols. (63). Asimismo la hCG inyectada, desaparece bifasicamente, con una vida media de 5,6 y 23,9 horas respectivamente, RIZKALLAH y cols. (54). En orina aparece tan sólo una pequeña cantidad de la LH o FSH inyectada.

Existe una heterogeneidad de las hormonas polipéptidas - en el plasma debido a:

- 1) Prohormona.
- 2) Hormona de distintos pesos moleculares.
- 3) Productos de degradación, y por último, se ha descrito por ejemplo que la gonada de rata no sólo regula la - cuantía de hormona, sino también la clase de ella, dependiendo del ambiente hormonal existente en aquel momento.

La secreción por la pituitaria es por "pulsos" más frecuente para la LH que para la FSH; y los picos tienen lugar con una fre-cuencia de 30-90 minutos aproximadamente y claro es, no hay alteraciones en el día (ausencia de ritmo circadiano) ni variaciones de día a día en el varón adulto. Claro es que la liberación por la pituitaria es debido a la acción de la hormona hipotalámica liberadora (Gn-RH) y se conoce que la llegada de esta a la hipófisis, tiene lugar un incremento de cAMP, y a partir de unos límites se inicia la -secreción de LH. Para la regulación de la secreción de LH, el hipotálamo es un importante eslabon, puesto que la elevación para la ovulación de LH, no tiene lugar cuando en animales u hombres hay lesiones en ciertas áreas del mismo, o son bloqueados por algunos medicamentos tales como la reserpina, que inhibe la función de las catecolaminas en el hipotálamo.

Parece ser , que esta liberación de LH en la mitad del ciclo, juega un decisivo papel la secreción preovulatoria de estróge-nos por el folículo en desarrollo, y esto se ha comprobado porque la administración de estrógenos en ratas y en hombres produce la secreción de LH, YEN y TSAI (63). Piensa REICHLIN (52) que la elevación -de LH en la mitad del ciclo es producida por una respuesta hipotalámica despertada por los estrógenos ("estrogen-triggered"), sería un reflejo neuroendocrino, mediado por una señal química que informa el

hipotálamo que el folículo ha madurado lo suficiente para ser estimulado adecuadamente con LH para llevar a cabo la ovulación; con un método biológico muy sensible miden "LRF" ("*factor liberador de LH*") - en plasma humano en mujeres durante varias fases del ciclo y comprueban que la elevación de LH de la mitad del ciclo ha sido acompañado por frecuentes y grandes picos de secreción de LRF (comparados con la fase precoz folicular) SEYLER y cols. (57).

Señala REICHLIN (52) que aun cuando la incrementada secreción de LRF es un importante factor en la determinación del pico ovulatorio en la mitad del ciclo, existen otros involucrados; otro, es la sensibilización de la pituitaria a los estrógenos, la cual es tiempo y dosis dependiente, y tercero, es que LRH sensibiliza a la pituitaria a la estimulación del LH-RH, de forma tal que la constante estimulación acelera la respuesta a sucesivas dosis.

Este fenómeno de sensibilización está incrementado en humanos tratados con estrógenos. Sin embargo el control de feedback de la secreción de LH por estrógenos en el hombre es sorprendentemente deficiente. Los hombres normales muestran una inhibición de la respuesta de la pituitaria al LH-RH después del tratamiento con estrógenos, pero paradójicamente muestran un incremento de la actividad de la LRH del plasma. Piensa REICHLIN (52) de esto, que los estrógenos ejercen un efecto positivo sobre la secreción LRH, semejante a lo visto en las mujeres, pero que ésta estimulación fracasa al liberar LH, porque la pituitaria está inhibida por los efectos directos de los estrógenos. Para explicar este mecanismo de retrocontrol posi-

tivo y negativo, propone que en hipotálamo hay dos equipos de neuronas estrogeno-sensibles: uno, es estimulado por los estrógenos a segregar LRF, este grupo es el responsable del pico ovulatorio de LH ; el otro grupo es sensible a la deficiencia de estrogénos, es decir, son inhibidos por los estrógenos. Este grupo de neuronas es mucho más lento en el tiempo de acción, ya que la actividad no se manifiesta hasta varias semanas más tarde. El feedback estrogénico en el varón se ha demostrado como un componente negativo, inhibidor a nivel pituitárico; el tratamiento a largo plazo con estrógenos, altera mucho la respuesta pituitárica, y esto sería la inhibición de gonadotrofinas por la administración de estrógenos; en deficiencia de estrógenos, la respuesta de la hipófisis al LRF está aumentada y esta sensibilización es la responsable de los elevados niveles iniciales de LH en la castración.

WANG y cols. (62) estudiando la liberación de gonadotrofinas en respuesta a "pulsos" de LRF (10 γ g i.v. "bolus" a dos horas - de intervalos por cinco veces), o una infusión constante de LRF (0,2 γ g/min por cuatro horas), pueden valorar la sensibilidad y la reserva de gonadotrofinas, en los diferentes estados del ciclo menstrual.

En la pituitaria se ha descrito, una forma molecular grande de LH pero no de FSH, que es una pro-hormona la cual contiene dos α -subunidades y una β -subunidad; la eliminación de una α -subunidad, da lugar a la hormona nativa, que sale al plasma.

En el plasma humano, GRAESSLIN y cols. (27) han descrito - una heterogeneidad de LH, así se encuentra una "big" LH (peso molecular aproximado 140.000-180.000), una "little" LH (peso molecular aproximado 20.000-30.000) e incluso por diálisis del plasma, una "mini" LH (peso molecular aproximado de 1.000), sin que haya diferencia biológica ni inmunológica entre ellas. La "big" es una forma estable, y es debido a una agregación lábil a la nativa de la pituitaria y que tiene lugar en el suero; y parece ser que la "little" sería la nativa. En el plasma y en todos los líquidos y tejidos del organismo se han encontrado α -subunidad (pero no se han encontrado β -subunidad).

3.- RECEPTOR DE MEMBRANA.

Para que cualquier hormona active el tejido diana lo primero que tiene que hacer, es unirse a algún constituyente de la célula.

Aún cuando no se han podido aislar purificados ningún sitio, utilizando hormonas marcadas con tritio (H^3) y con I-125, se han encontrado criterios para caracterización e identificación de los mismos, y así CATT (6), los define como *"lugares del lado plasmático de la membrana de alta afinidad de unión por una hormona polipéptida en una célula diana, cuando estos sitios están ocupados por la hormona polipéptida (se han identificado su número y cuantía de recepción), tienen la habilidad de alterar la respuesta de la célula diana"*; y por análisis a los receptores de drogas en los nervios y músculos, se denominaron *"receptores"*.

Por el empleo de detergentes solubilizantes se ha concretado una serie de proteínas vinculadas a los mismos tales Ca^{2+} -ATPasa, glicoforin y el receptor de acetyl-colina. Estos detergentes y marcadores no interfieren en la determinación del peso molecular ni en su actividad biológica, y con ellos se podrá estudiar la situación conformacional en los receptores ocupados y no ocupados. Estos artículos permitirán estudiar: los cambios de afinidad del receptor por la



hormona, por competición de los sitios de unión o porque estos sean efectores alostericos (como se ha visto en receptores de drogas), - en los que al unirse una molécula a otro lugar del receptor lo anule; la pérdida de receptores y la regulación de la síntesis de receptores por presencia de elevados niveles de hormonas prolongadamente, por ejemplo la insulina, hormona de crecimiento y catecolaminas; y este mecanismo sería el responsable de la resistencia hormonal o insensibilidad, que tienen lugar en aquellas situaciones en que hay elevados niveles de hormona circulante CATT (6), así como el estado conformacional en que se encuentren (la modificación de la orientación en el espacio), pueden impedir la unión hormona-receptor.

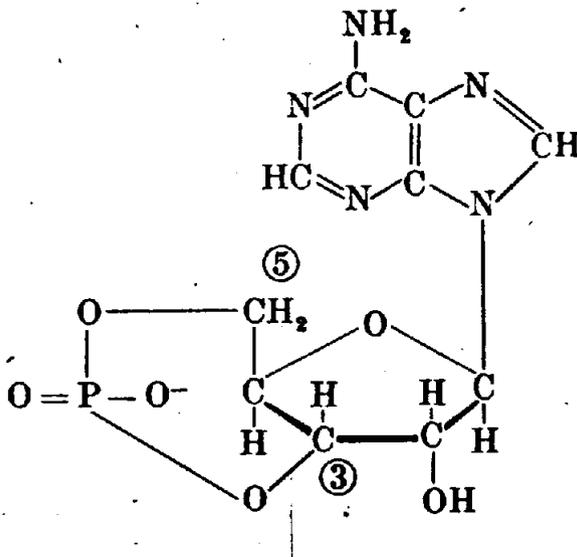
Se han descrito casos en la patología humana escasos en su frecuencia, que son debidos a marcados defectos en la concentración de receptores.

Recientemente SVEJGAARD y RIFER (59), emiten la teoría de que los aloantígenos HLA (sistemas de antígenos de mayor histocompatibilidad de leucocitos) pueden interferir con las interacciones hormona/receptor, por tener algunas moléculas de HLA, estructuras parecidas a aquellas, por las que la hormona se une al receptor; y entonces hay una competición por el receptor, entre la hormona y el antígeno HLA; y así se ha descrito que el sistema H-2 (de histocom-

patibilidad en las ratas, semejante al HLA en el hombre), parece controlar el peso del timo, del testículo y las concentraciones de testosterona plasmática, y así mismo hay evidencia, de que puede controlar la sensibilidad de la célula diana a la testosterona.

4.- ACONTECIMIENTOS INTRACELULARES DESENCADENADOS
POR LA OCUPACION DEL RECEPTOR POR LA HORMONA.

Las hormonas polipeptídicas LH, FSH, ACTH, TSH, PTH y vaso-
presina impactan en la parte plasmática de la membrana de las células
de los órganos efectores "receptor" de la célula diana, y ponen en -
marcha una serie de reacciones iniciadas por una sustancia, que deno-
minó su descubridor SUTHERLAND "segundo mensajero" (el primer mensaje-
ro químico sería la hormona), y que pronto se indentificó como un nu-
cleótido: el ácido adenosin monofosforico cíclico.



Para que la información se transfiera desde el primer mensajero (hormona) al segundo mensajero (cAMP), se requiere en el "receptor" de membrana de la célula diana se produzcan dos efectos: primero, unión de la hormona de ocupación al receptor; segundo, unión de los nucleótidos de purina (ATP) a un sitio (o subunidad) no idéntico al sitio catalítico de la adenil-ciclasa, induciendo un estado del enzima, el cual está en equilibrio lento con la forma activa de la enzima. El "complejo hormona-receptor" incrementa el ritmo de formación del estado alterado, y posiblemente lo estabiliza HILZ (31).

Esta compleja situación de la formación de cAMP, además se ve matizada por mecanismos que modulan la interacción basal entre hormonas y adenil-ciclasa:

1) Reguladores "feedback", que hacen a la célula irresponsable a estimulaciones posteriores por hormona; tal como activación de una proteína kinasa unida a la membrana que conduce a la inhibición de la adenil-ciclasa, como se ha visto en el adipocito.

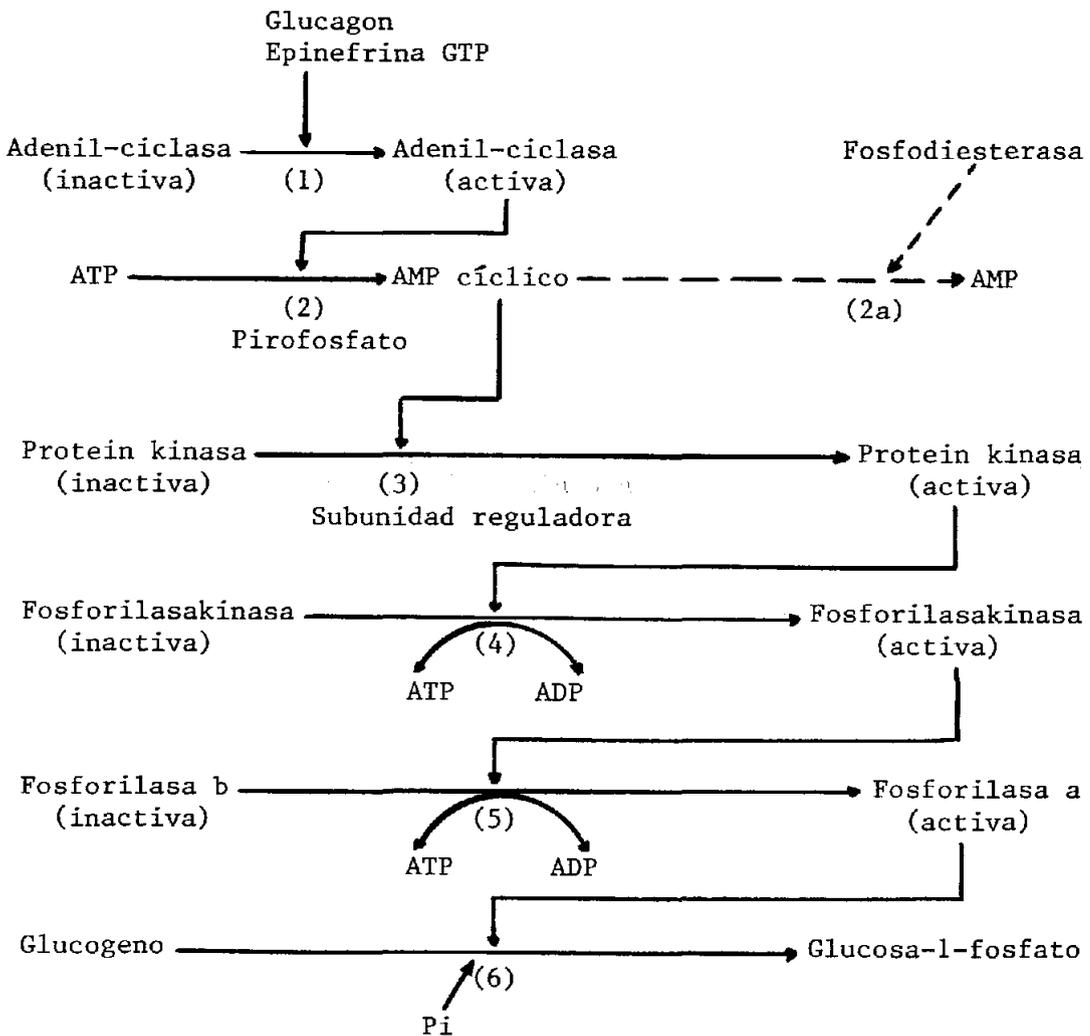
2) Reguladores "feedback", por productos finales que ejercen una acción inhibitoria directa sobre adenil-ciclasa.

3) Otros reguladores, serían la desensibilización del sistema adenil-ciclasa por prolongada exposición, ya que la respuesta del estímulo inicial decae lentamente y con el tiempo, el "tejido-diana" llega a ser refractario al estímulo hormonal, porque la acumulación de cAMP intracelular es transitoria.

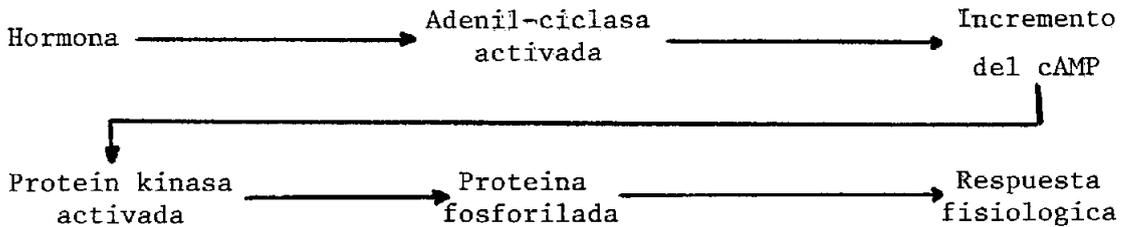
A continuación del incremento del cAMP, tiene lugar la activación de la proteína kinasa, y a partir de entonces se inicia la

respuesta característica de la célula diana, en nuestro caso la esteroidogénesis.

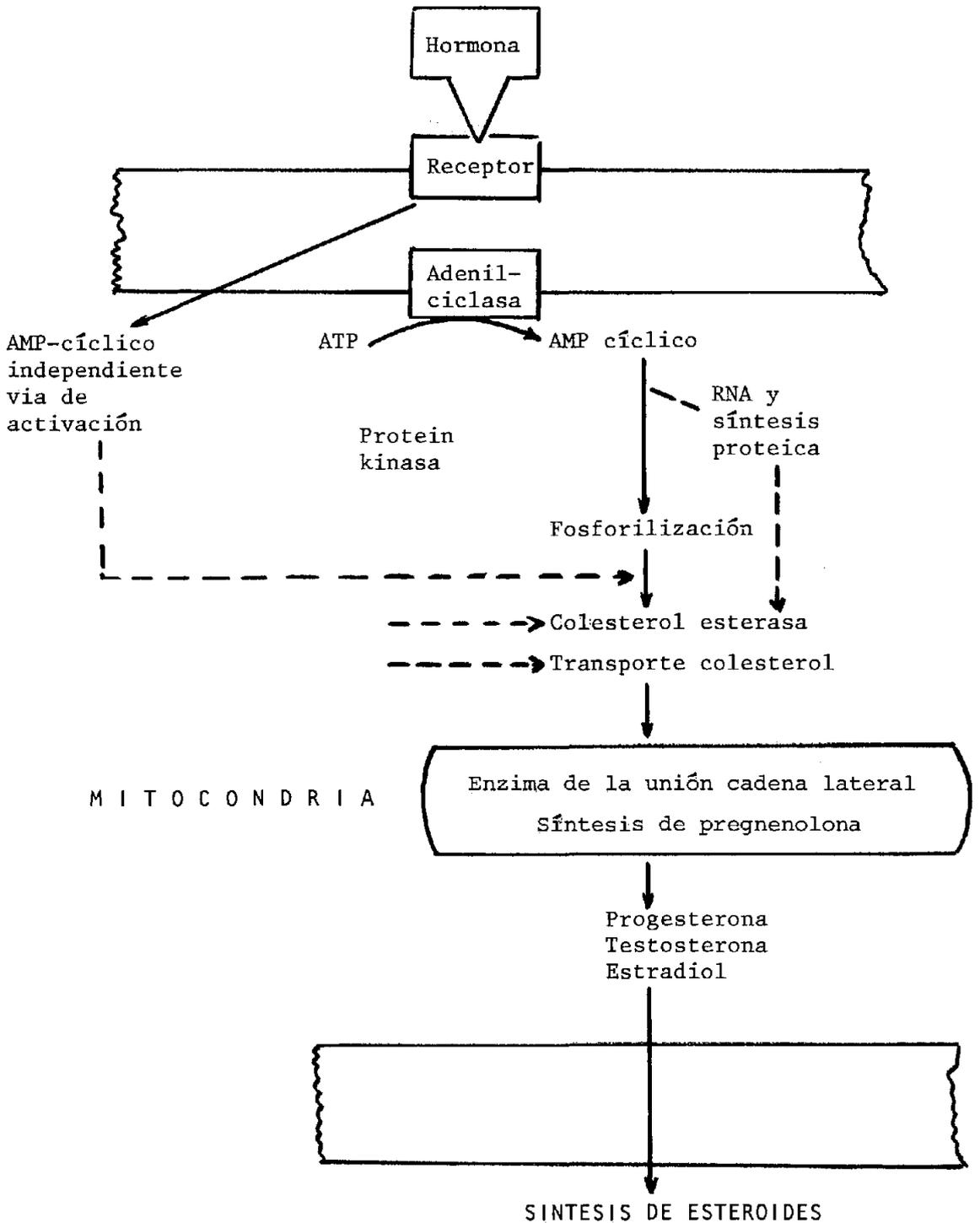
Esta reacción en cascada, puesta de manifiesto cuando la acción del glucagón o adrenalina inicia la glucogenolisis en la célula muscular, fue descrita así:



Actualmente existe el conocimiento de que las hormonas que actúan a través del cAMP pudieran operar con un mecanismo análogo al citado, común a todos COHEN (12).

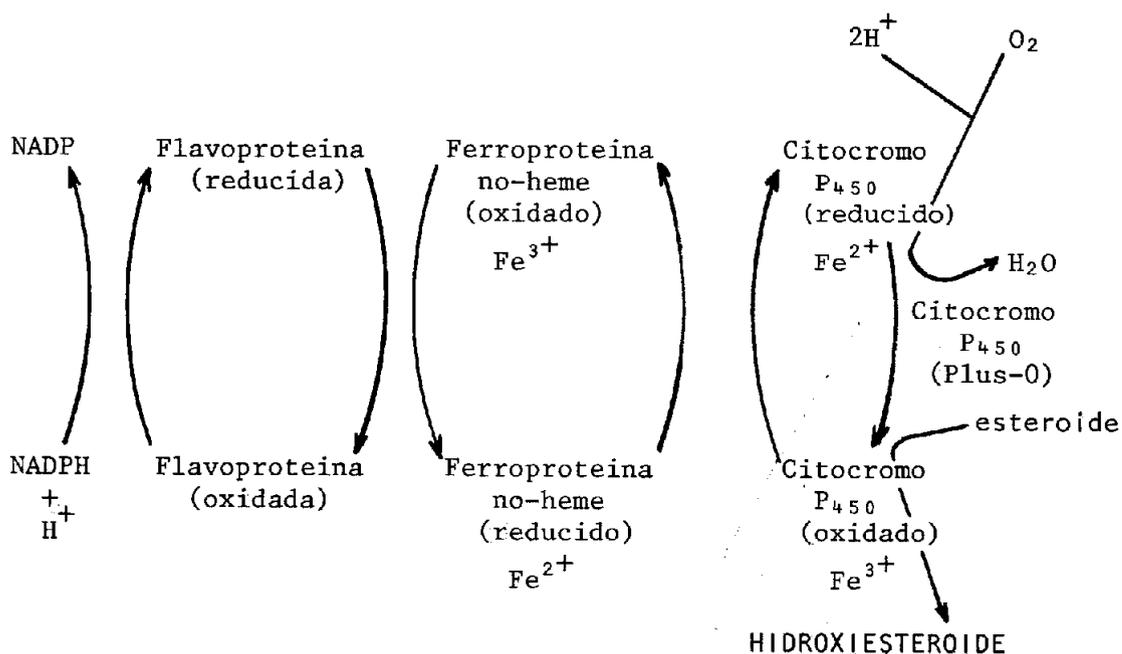


El último paso en nuestro caso sería la derepresión de genes con síntesis de mRNA y síntesis de proteína, que actuando sobre el colesterol lleva a la esteroidogénesis y liberación de la testosterona. En el siguiente esquema de CATT se pueden ver integrados los acontecimientos intracelulares desde la ocupación del receptor por la hormona hasta la liberación de testosterona.

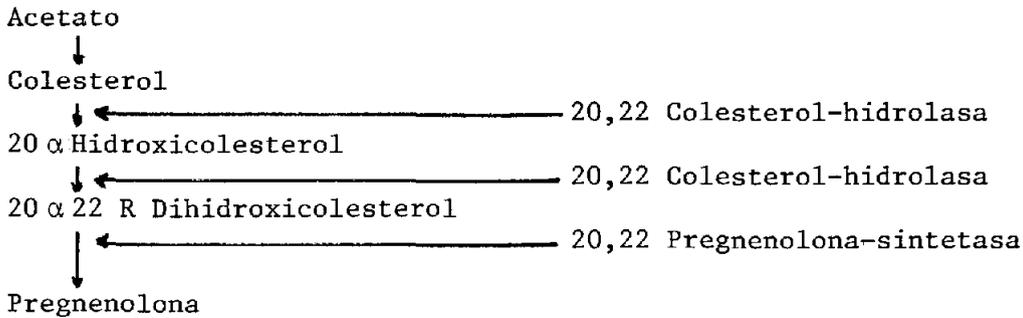


En ausencia de hipófisis y por tanto en carencia de LH, la síntesis testicular de esteroides, se limita al paso de acetato al colesterol; y el enzima 20,22-colesterol-hidrolasa, responsable de la introducción de 2 hidrógenos en la cadena del colesterol, es el enzima que es activado por la LH.

Este enzima, como las restantes hidrolasas esteroideas, es un complejo enzimático de varios componentes; es una flavoproteína que cataliza la transferencia del NADP reducido, a una ferroproteína no-heme, y de ahí al citocromo P₄₅₀.



Asi mismo hay un marcado incremento de la pregnenolona-sintetasa por LH; aunque esto puede ser debido a una activación alostérica. Los hechos suceden así:



El papel de la FSH en el testículo, es la estimulación de las células de Sertoli LOSTROH (42), MANCINI y cols. (44); así como en el hombre, DE KRESTER y BURGER. (16), han visto el efecto de las gonadotrofinas en hipogonadismos hipogonadotróficos; en ellos, las células inmaduras con un núcleo basal, nucleolo desarrollado, disminución del retículo endoplásmico liso y ausencia de las características uniones de las células de Sertoli entre sí, se transforman después de las gonadotrofinas, de células inmaduras en maduras. Las células de Sertoli aisladas responden a la adición de FSH o de 3'5' c-AMP, y según LOSTROH es porque están programados en su función precozmente en su desarrollo por la FSH.

En presencia de LH pero en ausencia de FSH, la espermatogénesis se detiene en el último estadio de la espermátida; mientras que en la ausencia de LH se detiene en un estadio más precoz. Si se da testosterona a un animal hipofisectomizado, la espermatogénesis es estimulada hasta el último estadio de espermátida, de lo cual se deduce, que la LH actúa a través de la testosterona.

La FSH es sinérgica con LH en el desarrollo de espermatide y de los espermatoцитos inmaduros; estimula la formación de una proteína que une a andrógenos ("*androgen binding protein*" ABP), estimula la secreción de las células de Sertoli, estimula el crecimiento de los túbulos seminíferos en el feto humano y además sugiere LOSTROH(42) que la FSH programa a la célula diana a responder a la gonadotropina, o sea la célula de Sertoli a responder a FSH.

Aunque se repite que la FSH juega un papel decisivo en la espermatogénesis, todavía esto no está bien definido. Para LOSTROH (42) depende dicha acción de:

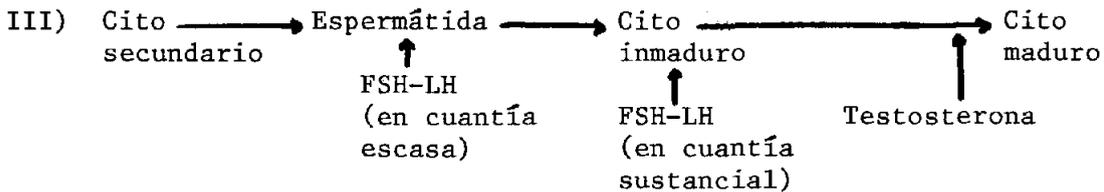
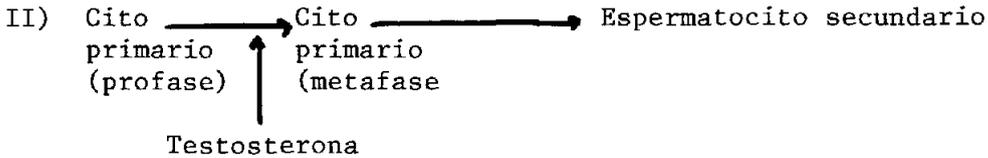
1) Edad.

2) Presencia de otras hormonas y

3) De la cantidad de hormonas segregadas o administradas; en el siguiente cuadro tomado de él, se aprecia el control hormonal de la espermatogénesis y en el que se aprecia que la testosterona (y de ahí la acción indirecta de LH) se requiere en todo él:



No se requieren hormonas en absoluto.



Estas acciones de las gonadotropinas, se evidencian así mismo por la variación de la morfología testicular inducida a sujetos hipofisectomizados; la administración de LH y FSH induce una separación de las células de Sertoli, proliferación de las espermátogonias y desarrollo del espermatocito primario; induciendo además un incremento tubular y diferenciación de células de Leydig de los precursores fibroblásticos. MANCINI y cols. (44) señalan que la administración por separado o sucesivamente de LH y FSH o viceversa estimulaba adecuadamente el epitelio germinal. En contraste, cuando ambas se daban simultáneamente en una proporción de 1/1 inducían la espermatogénesis hasta la fase de espermátida, y la completa espermatogénesis solo se logra con una proporción de 1/4 a favor de la LH, desarrollándose una completa maduración de las células de Sertoli y de Leydig.

H I P O T E S I S D E T R A B A J O

Como hemos visto en la primera parte de este capítulo, son múltiples los hallazgos que han ido jalonando el campo de la investigación del posible sinergismo en la acción metabólica de las gonadotrofinas hipofisarias. De esta forma ambas son glicoproteínas, son estimuladas en su síntesis y liberación en la hipófisis por la misma hormona liberadora hipotalámica, y actúan metabólicamente sobre los mismos órganos y funciones.

Así es ampliamente conocido, como la FSH y la LH son complementarias, no pudiendo ocurrir una función gonadal normal

si la secreción de ambas no está suficientemente proporcionada, y si bien parece en la actualidad que la función de la FSH está especialmente dirigida en el varón, al desarrollo y maduración de elementos germinales, mientras que la LH lo está a la progresión del proceso de esteroidogénesis, la acción de la primera, como veíamos en la primera parte de este capítulo, no se logra llevar efecto sin una normal producción de testosterona LH inducida, en las células intersticiales de Leydig. Pero a su vez hay también algunas evidencias experimentales anteriores que parecen señalar que si bien la producción de esteroides por el intersticio testicular está metabólicamente relacionada con la actividad de LH, la FSH a su vez también podría jugar un cierto papel en dicho proceso. En este sentido JOHNSON y EWING (32) mostraron, que aunque la FSH no incrementa por sí sola la producción de testosterona por el teste de conejo perfundido "*in vitro*" - con un medio artificial, sí incrementa la secreción de testosterona - LH inducida en idénticas condiciones.

Similares resultados han obtenido KIELD y cols. (36) infundiendo en varones LH y FSH, observando que la elevación de testosterona se sigue a la infusión de ambas hormonas es superior a la obtenida tras infusión de LH sola.

Interesados por el estudio de este sinergismo metabólico, pensamos estudiar directamente el efecto de ambas hormonas sobre células intersticiales de Leydig de ratas aisladas.

Así pues, en el presente trabajo nos propusimos:

- 1) Obtener en nuestro medio células intersticiales de Leydig aisladas metabólicamente activas.

2) Identificar su funcionamiento, en lo que a producción de testosterona se refiere, estableciendo parámetros tales como: relación dosis hormona-respuesta de célula, así como tiempo de la misma, para fijar las condiciones óptimas de observación del estímulo.

3) Una vez obtenidas estas, estudiar si la introducción - de FSH en el sistema LH-célula intersticial modificaría la respues--ta de ésta, tanto aumentando como disminuyendo la producción de tes-tosterona o modificando el binomio tiempo-respuesta.

4) Finalmente establecer si la FSH modifica de alguna forma la relación entre LH y su receptor celular.

C A P I T U L O I I I
M A T E R I A L Y M E T O D O S

M A T E R I A L

A) ANIMALES

Las células de Leydig fueron obtenidas de testículo de rata Wistar de 200-300 grs. de peso, y 2-3 meses de edad con periodo dia-noche de 10 horas y dieta "*ad libitum*" que procedían del animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla.

B) HORMONAS

1.- Marcadas

Testosterona (Δ^4 -androstan-17 β -ol-3 one) 1A, 2A (N)- 3 H
con actividad específica de 49 Ci/mmol.

Radiochemical Center Ltd. Amersham.

2.- Standards

Testosterona No. T-1500

Sigma Chemical Company

3.- Hormonas empleadas como estímulo del sistema celular.

* Hormona coriónica Gonadotrófica humana.

Serono Immuno Chemicals.

* Hormona Luteinizante Hipofisaria Humana. 2nd IRP-HMG

Serono Immuno Chemicals. 1 mU.I. = 5 ng. LER 907

* Hormona Foliculoestimulante Hipofisaria Humana. 2nd IRP-HMG

Serono Immuno Chemicals. 1 mU.I. = 35 ng. LER 907

C) ANTICUERPOS

* Anti-Testosterona 3-oxime BSA

Endocrine Sciences.

* Anti-LH (conejo)

Serono Immuno Chemicals.

* Anti-FSH (conejo)

Serono Immuno Chemicals.

D) SOLUCIONES

- * Buffer Borato pH 8 0,05 M
- * Buffer Fosfato pH 7 0,5 M
- * Buffer Fosfosalino (PBS) pH 7,4 y 0,15 M
- * Ioduro Potásico al 62,5 %
Rovi.
- * Líquido de Centelleo PCSTM solubilizer
Amershan Searle.
- * Medio de incubación Medium 199
Difco Laboratories. Detroit Michigan USA.
- * Solución de Azul de Metileno 2 %
Panreac.
- * Solución de Sulfato Amónico a saturación
Schwarz/Mann.

E) REACTIVOS

- 1.- Concanavalina A en Shepharosa
Pharmacia.
- 2.- Gammaglobulina bovina. Fracción II
Schwarz/Mann.
- 3.- Mannoheptulosa
Sigma.
- 4.- Reactivo de Fenol, según Folin-Ciocalteu
Merck.
- 5.- Seroalbúmina bovina. Fracción V
Schwarz/Mann.

6.- Enzimas

- * Collagenasa CLS 45 D 006
Worthington. Biochemical Corp. Freehold.
- * Lactoperoxidasa
Sigma.

7.- Solventes orgánicos

- * Ethyl eter. Pro Analysis
Merck.
- * Metanol. Analytical Reagent
Mallinckrodt.

8.- Sólidos

- * Acido Bórico. BO_3H_3 Analytical Reagent
Mallinckrodt.
- * Azul de Metileno substancia
Merck.
- * Carbonato de Sodio $\text{CO}_3\text{Na}_2 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
Panreac.
- * Citrato Sódico. $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Analytical Reagent . Mallinckrodt
- * Cloruro Calcico ClCa . Pro Analysis
Merck.
- * Cloruro Potásico ClK Analytical Reagent
Mallinckrodt.
- * Cloruro Sódico ClNa Analytical Reagent
Mallinckrodt.

- * Cloruro de Magnesio $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ Pro Analyti
Merck.
- * Fosfato Disódico $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Pro Analyti
Merck.
- * Fosfato de Potasio $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ Pro Analyti
Merck.
- * Sulfato Amónico. Ultra pure
Schwarz/Mann.
- * Sulfato Cúprico $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
Riedel.

F) APARATOS UTILIZADOS

- * Cámara fría. Irmaf.
- * Contador de Centelleo, para registro de Radiación β debis. Beckman. LS-150. Liquid Scintillation System.
- * Contador de Centelleo sólido, para registro de Radiaciones γ . Nuclear Chicago.
- * Centrífugas redrigeradas:
 - ** Janetzki K 23
 - ** Universal Ujiks
- * Baño de incubación metabólica Eto Denmark.
- * Balanza de precisión Mettler tipo H 16 cap. 80 grs.
E. Mtter, Zurich.
- * Homogeneizador IKA-Werk tipo RW 18 Nr.
Staufen i. Reisan.
- * Microscopio ZEISS
- * Agitador magnético COWELL.
- * Vortex Atomixer.

G) VARIOS. MATERIAL FUNGIBLE

* Tubos de polietileno. Cap. 50 ml. FISHER.

* Viales de centelleo:

** polietileno. Packard

** vidrio. Packard

Nota.- Todo el material de vidrio utilizado, exceptuando las pipetas, antes de ser utilizado fue siliconado con una solución de silicona al 2 por 100 en agua destilada (Emulsión de Silicona SI 35 B).

M E T O D O S

Dividiremos la exposición de la metodología que hemos empleado en nuestros estudios en dos grandes apartados:

A) Producción de Testosterona, en células intersticiales de Leydig aisladas bajo distintos estímulos.

B) Análisis de desplazamiento sobre receptor de gonadotropina luteoestimulante en células intersticiales.

A) PRODUCCION DE TESTOSTERONA, EN CELULAS INTERSTICIALES DE LEYDIG AISLADAS BAJO DISTINTOS ESTIMULOS.- A su vez, en este apartado consideraremos:

I) Obtencion y preparaci3n de c3lulas intersticiales de Leydig.

II) Incubaci3n de las c3lulas intersticiales en presencia de gonadotrofina.

III) Valoraci3n de la Testosterona liberada al medio de incubaci3n.

I) Obtenci3n y preparaci3n de c3lulas intersticiales de Leydig

Tras el sacrificio de las ratas con 3ter, se extrajeron los test3culos y se decapsularon; incub3ndose luego estos, en tubos de polietileno (50 ml. de capacidad) en grupos de seis testes por tubo y en una soluci3n de Medium 199 con Seroalb3mina bovina (BSA) - en proporci3n de 1 mgr/ml., conteniendo a su vez colagenasa (0,25 mgr/ml.).

Los tubos asi preparados, tras gasearse dos a tres segundos con carb3geno, se cerraron; incub3ndose a continuaci3n a 37°C., con una agitaci3n mec3nica a 150 ciclos/min., el tiempo necesario para conseguir la disgregaci3n de los t3bulos (15 a 20 min.). Posteriormente, tras adici3n de Medium, se lavaron los t3bulos dos veces, - separ3ndose aparte, el l3quido de lavado, que conten3a las c3lulas intersticiales.

En un paso posterior, tras centrifugaci3n de los tubos durante 10 min. a 1.000 r.p.m. y entre 0 y 4°C., se obtuvo un "pellet", y tras decantar el l3quido sobrenadante se redisolvi3ron finalmente las c3lulas mediante agitaci3n manual suave con 6 ml. por teste de Medium 199-BSA, tom3ndose generalmente una alicuota de 50 μ l para contaje microsc3pico de c3lulas previa tinci3n con azul de metileno.

Todo el proceso descrito, fue desarrollado en cámara fría entre 2-4°C.

II) Incubación de las células intersticiales en presencia de gonadotrofinas.

Aproximadamente 16×10^6 células (volumen aproximado 2 ml.), fueron incubadas en cada una de las experiencias, y estos contenían previamente cantidades conocidas de gonadotrofinas, llevados a un volumen constante de 100 μ l.

Los viales fueron incubados a 37°C. y 125 ciclos/min. de agitación, en una atmósfera de carbógeno constante.

En primer lugar, se estudió la producción de Testosterona inducida por distintas concentraciones de LH, 20,80 10,40 5,20 2,60 1,30 0,65 0,32 y 0,16 mU.I., realizándose a continuación un estudio comparativo paralelo de la producción de Testosterona HCG inducida, utilizando los mismos niveles de dosis. En ambas experiencias, el tiempo de incubación fue de 180 min.

Con la elección de una dosis de LH óptima, 5 mU.I., se procedió a estudiar la producción de Testosterona a diferentes tiempos de incubación, testándose ésta cada 10 min. durante la primera hora; y luego en horas sucesivas hasta la tercera.

Para apreciar si existía o no influencia, de FSH sobre LH, en lo que a producción de Testosterona se refiere, en viales conteniendo células intersticiales y 5 mU.I. de LH se incubaron paralelamente a otros con 5 mU.I. de LH más 5 mU.I. de FSH, estudiando la producción de Testosterona a distintos tiempos, cada 10 min. durante la primera hora, a la segunda y tercera horas en los viales que contenían LH; LH más FSH, y otros, en los que en lugar de gonadotrofinas, se puso el mismo volumen de PBS, y se consideraron como blancos; en los diferentes tiempos.

Por último, se estudió comparativamente la producción de Testosterona en células incubadas durante 120 min. en presencia de: 1ª buffer, 2ª 5 mU.I. de LH, 3ª 5 mU.I. de LH más 5 mU.I. de FSH, 4ª 5 mU.I. de LH con 5 mU.I. de FSH, que habían permanecido en contacto con anticuerpos anti-LH durante 12 horas para obtener equilibrio; simultáneamente en otra serie de viales se incubaron las células con 5ª 5 mU.I. de FSH con anticuerpo anti-FSH. Cada punto correspondiente a cada dosis testada y/o a cada tiempo, así mismo como a cada valor de blanco, fueron desarrollados por triplicado.

Al final de los distintos periodos de incubación, el contenido de los viales fue decantado cuidadosamente a tubos de polietileno y centrifugados a 1.500 g. durante 15 min., siendo el sobrenadante congelado a $-20^{\circ}\text{C}.$, hasta el momento de la dosificación de Testosterona.

III) Valoración de la Testosterona liberada al medio de incubación.

Para la valoración radioinmunológica de Testosterona alicuotas del medio de incubación, se diluyeron en proporción 1:12,5 testándose el líquido correspondiente de cada vial por triplicado, y a dos concentraciones (100 y 50 $\mu\text{l}.$, respectivamente).

Así pues, cada punto resultó el valor medio de 18 determinaciones de Testosterona.

Las diluciones anteriormente mencionadas permitieron leer concentraciones de Testosterona en una curva standard con límite de sensibilidad de 12,5 pgr. y máximo desplazamiento a 150 pgr.

La separación de las fracciones libre y ligada, con posterior valoración de la fracción libre, se desarrolló mediante precipitación con sulfato amónico al 50 % y centrifugación tras incubación de 3 horas a temperatura ambiente.

B) ANALISIS DE DESPLAZAMIENTO SOBRE RECEPTOR DE GONADOTROFINA LUTEOSTIMULANTE EN CELULAS INTERSTICIALES.

Expondremos a su vez en dicho apartado: en primer lugar el proceder para obtener el receptor, seguidamente el método utilizado para marcar con I^{125} la hormona luteoestimulante, y finalmente en líneas generales el desarrollo analítico del desplazamiento hormonal sobre el mencionado receptor.

I) Obtención del receptor de gonadotropina.

Los testes obtenidos tras el sacrificio de las ratas con éter, limpios y pesados, fueron decapsulados, y homogeneizados durante 90 segundos a alta velocidad 10.000 r.p.m., tras habersele añadido PBS en proporción de 10 ml/gr. de tejido.

Posteriormente, se centrifugaron dichos homogenados durante 20 min. a 2.400 r.p.m. y a 4°C., decantándose a continuación el sobrenadante a un tubo limpio y siliconado.

En un siguiente paso se adicionó PBS (7 ml.), y tras agitar cuidadosamente los tubos en vortex, y obtener la dilución del "pellet", se midió en éste la concentración de proteínas por el método de Lawry, añadiéndose más PBS, en cantidad necesaria para obtener una concentración final de 80 mg/ml. Finalmente, la preparación conteniendo el receptor se guardó dividida en pequeñas alícuotas, bien en congelados a -20°C., o en nevera a 4°C. si su utilización iba a ser inmediata.

II) Obtención de hormonas luteinizantes marcada con I¹²⁵.

LH pituitárica humana altamente purificada fue marcada por el método de la peroxidasa en la forma siguiente:

En habitación bien ventilada bajo campana de gases con aspiración de aire, y tras haber ingerido dos horas antes el experimentador 1 mgr. de yoduro potásico para bloquear su tiroides, e impedir la captación por éste de yoduro radiactivo. Se comenzó la reacción y en ella, a 25 µgr. de hormona luteinizante en un volumen de 50 µl. de buffer fosfato pH 7 0,5 M, se adicionó 1 mCi de I¹²⁵, 10 µgr. de lactoperoxidasa y 10 µl. de H₂O₂, y tras 5 min. de agitación magnética se paró la reacción con 0,5 ml. de PBS.

La purificación de la hormona marcada se desarrolló mediante cromatografía de afinidad con canavalina A en sepharosa, alu—yéndose la fracción de la hormona marcada tras la aplicación de manoheptulosa a la columna.

La actividad específica obtenida para la fracción hormonal purificada fue aproximadamente 35 µCi/µgr.

III) Análisis sobre receptor.

Standard de las preparaciones de LH y FSH, usadas para las experiencias anteriores, y con concentraciones de 50, 25, 12,5, - 6,25 y 3,1 mU.I., fueron incubados separadamente con LH-I¹²⁵, aproximadamente 12.000 cpm, y 100 ul. de la solución del receptor (80 mgr/ml.). Tras la incubación de 14 horas a 24°C., se añadieron 3 ml. de PBS a cada tubo; tras centrifugación a 4°C durante 20 min. a 3.000 r.p.m., se aspiró el sobrenadante y tras repetir dos veces la anterior maniobra, se contó la actividad isotópica presente en el precipitado, relacionando la actividad obtenida, a aquella encontrada en tubos en los que se puso 100 µl. de PBS en lugar del standard, considerados como tubos cero.

La representación gráfica de las curvas para cálculo de — desplazamiento de LH-I¹²⁵ sobre receptor, se hizo calculando el porcentaje de la radioactividad a cada nivel de dosis standard sobre las actividades totales depositadas en cada tubo, y otras veces sobre las actividades encontradas en los tubos cero. La actividad isotópica de estos últimos tubos osciló, generalmente en — las diversas preparaciones del receptor y de hormonas marcadas, — entre 16-40 por 100 de la actividad total depositada.

La unión no específica de la hormona marcada a partículas presentes en la preparación de receptor, se calculó en presencia de 500 mU.I. de hormona standard.

C A P I T U L O I V

RESULTADOS OBTENIDOS

I. PRODUCCION DE TESTOSTERONA LH-INDUCIDA:

En la figura 1 hemos representado los valores medios con sus respectivos errores standard, que hemos obtenido al incubar células de Leydig, con hormona luteoestimulante durante 180 min. a diferentes concentraciones: 0,16 0,32 0,64 1,25 2,50 5 10,4 y 20,8 mU.I.

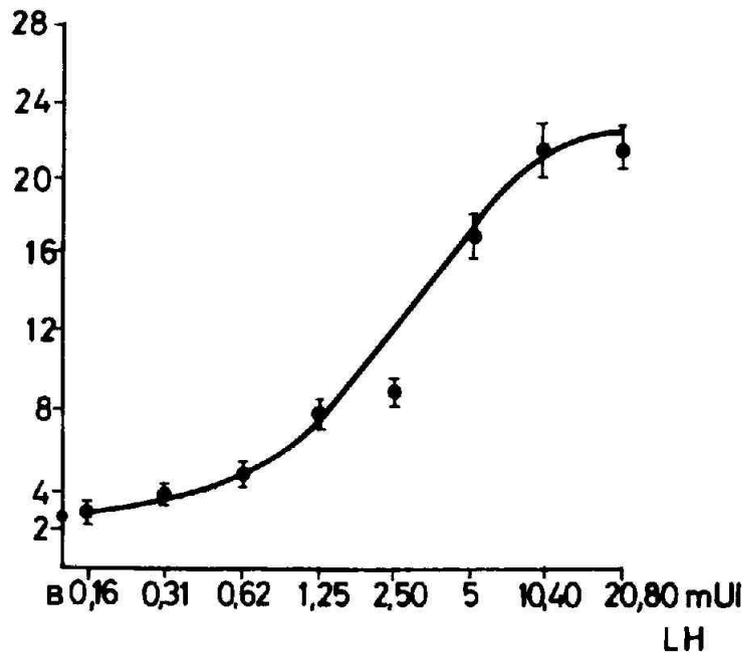
Puede apreciarse como con concentraciones de hormonas de 0,16 y 0,32 mU.I. la producción de Testosterona es indistinguible de aquella obtenida en los viales en los que no se adicionó hormona, considerado como producción basal; cuyo valor medio se representa en la gráfica sobre el eje de ordenadas (B)

Ya con concentraciones de 0,65 mU.I., la producción de Testosterona es netamente superior a la producción basal ($p < 0,01$), incrementándose ésta progresivamente hasta la concentración de 10,4 mU.I. alcanzándose de esta forma un "plateau" en la respuesta.

Así pues, existe una relación lineal dosis-respuesta desde 0,62 a 10,4 mU.I.

En el cuadro 1 aparecen los valores obtenidos expresados en forma numérica.

Testosterona ng / 16×10^6 células / 180 min.



C U A D R O I

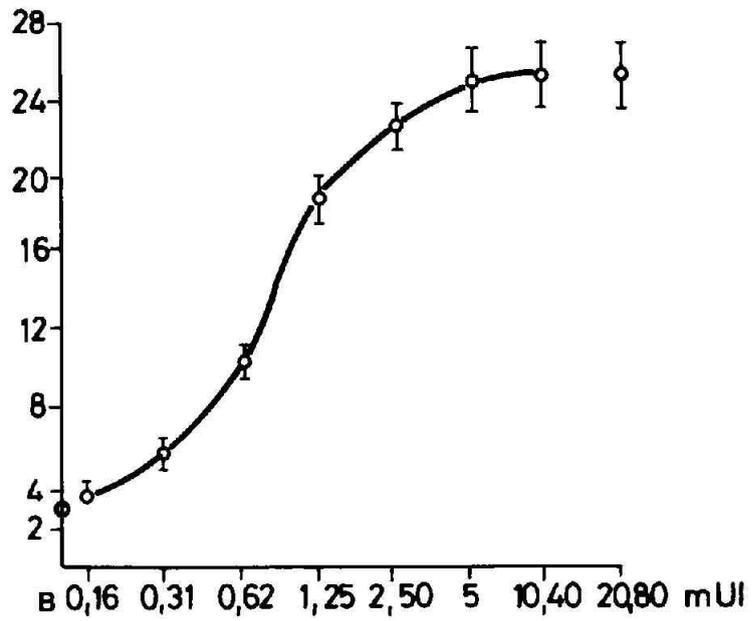
Standard LH mU.I.	Producción de Testosterona ng/16 x 10 ⁶ cel./180 min.
Blanco	3,529 ± 45
0,16	3,080 ± 429
0,32	3,575 ± 100
0,64	4,354 ± 149
1,25	7,825 ± 354
2,50	9,235 ± 647
5	17,150 ± 1159
10,40	21,835 ± 1327
20,80	21,807 ± 1002

II. PRODUCCION DE TESTOSTERONA HCG-INDUCIDA:

La producción de Testosterona, en el mismo sistema celular, pero utilizando esta vez como estímulo gonadotrofina coriónica humana, aunque a las mismas dosis que las utilizadas para LH, aparece en la figura 2 y cuadro II.

A nivel de 0,32 mU.I., la respuesta es ya claramente superior ($p < 0,001$), a la obtenida en situación basal; pudiéndose observar una clara relación dosis-respuesta desde 0,32 mU.I. a 2,5 mU.I.; siendo la producción muy similar e indistinguible estadísticamente para las concentraciones de 5 10,4 y 20,8 mU.I.

Testosterona ng/16x10⁶ células / 180 min.



o HCG

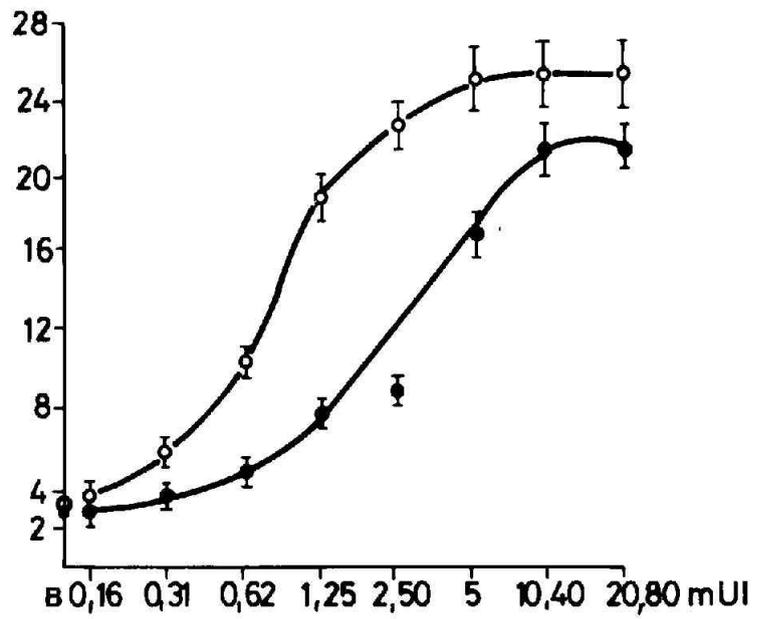
C U A D R O I I

<u>Standard</u> <u>HCG mU.I.</u>	<u>Producción de Testosterona</u> <u>ng/16 x 10⁶ cel./180 min.</u>
Blanco	3,529 ± 45
0,16	3,712 ± 150
0,32	5,885 ± 394
0,64	10,220 ± 586
1,25	18,825 ± 1249
2,50	23,100 ± 1198
5	25,355 ± 1630
10,4	25,685 ± 1704
20,8	30,222 ± 1747

III. COMPARACION DE LAS PRODUCCIONES DE TESTOSTERONA LH-INDUCIDA Y HCG-INDUCIDA.

El estudio comparativo de la producción de Testosterona en tre LH y HCG a las mismas dosis, aparecen en la figura 3, en la - que puede apreciarse como solo a dosis de 0,16 mU.I. la producción del esteroide es indistinguible para una u otra hormona, mientras que ya para todas las demás dosis empleadas se aprecia una mayor - producción por parte de HCG ($p < 0,001$) en todas las dosis.

Testosterona ng/16 x 10⁶ células / 180 min.



● LH

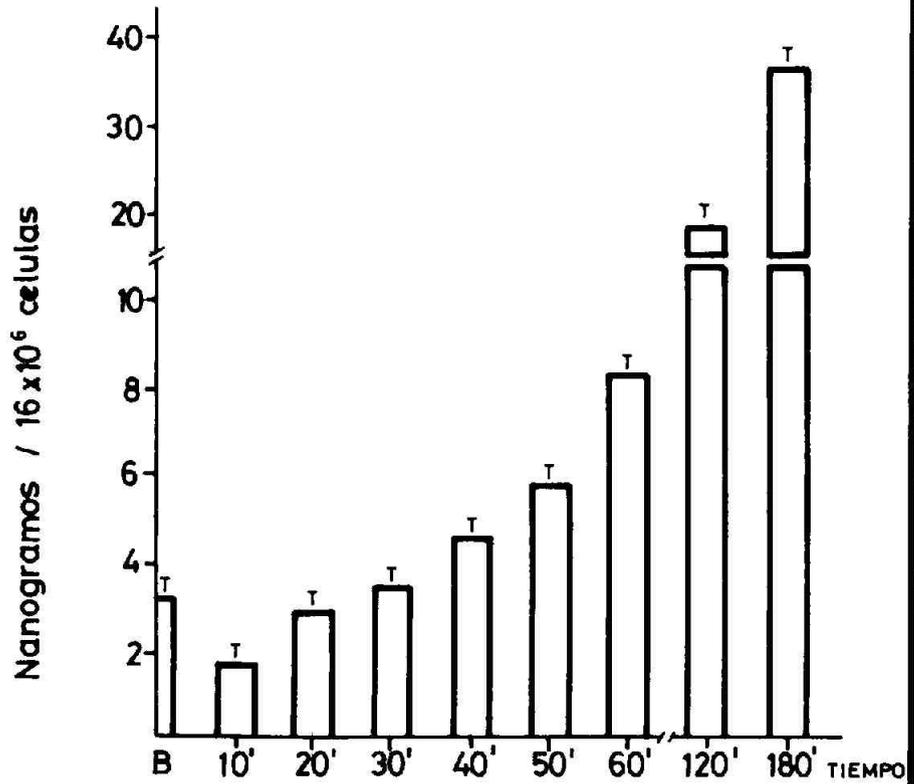
○ HCG

IV. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA PRODUCCION DE TESTOSTERONA INDUCIDA POR LH.

La figura 4 muestra en forma de diagrama de barras, los valores medios y los errores "standards" de la media, de la producción de Testosterona cuando las células intersticiales de Leydig se incubaron con una misma cantidad de LH deteniendo la incubación a diferentes tiempos.

En primer término, puede apreciarse como tras 10, 20 y 30 min. de incubación la cantidad de Testosterona producida y liberada al medio en presencia de la hormona, es diferenciable estadísticamente de aquella producida en tres viales en los que se incubaron células en el medio de incubación con 100 μ l. de buffer pero sin hormona (valor B); contrariamente, el valor medio obtenido a los 40 min. es ya mayor que el basal ($p < 0,01$), pero a su vez, menor que el hallado para los 50 min. de incubación ($p < 0,001$); sucediendo lo mismo a los 60 min. y a los 120 min., correspondiendo la mayor producción de Testosterona a la incubación desarrollada durante 3 horas. De esta forma existe una clara relación respuesta-tiempo, objetivable ya a partir de los 40 min. Los valores numéricos aparecen en el cuadro III.

TESTOSTERONA



C U A D R O III

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Producción de Testosterona ng/16 x 10⁶ cel./5 mUI LH</u>
10 minutos	1,970 ± 193
20 minutos	2,543 ± 234
30 minutos	3,597 ± 125
40 minutos	4,377 ± 500
50 minutos	5,866 ± 220
60 minutos	8,112 ± 412
120 minutos	19,433 ± 3652
180 minutos	39,508 ± 1880
Blanco 180 minutos	3,320 ± 221

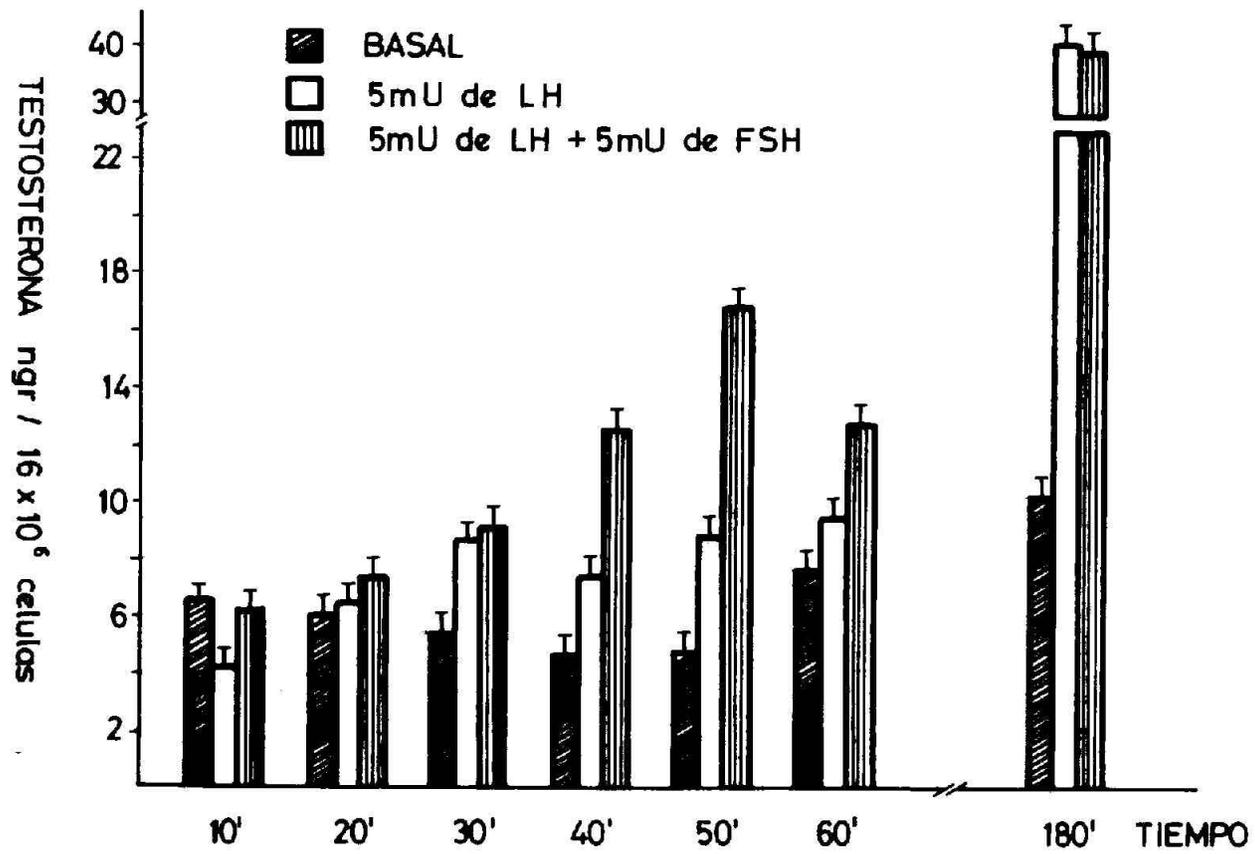
V. EFECTO DE LA ADICION DE FSH SOBRE LA PRODUCCION DE TESTOSTERONA EN LAS CELULAS INTERSTICIALES AISLADAS E INCUBADAS CON LH:

El resumen gráfico de esta experiencia lo mostramos en la figura 5 y cuadro IV. Cada columna es representativa del valor me dio y error "standard" de la producción de Testosterona, según - las circunstancias experimentales detalladas en el capítulo de Mé todo.

El estudio de los valores de Testosterona obtenidos a los 10 y a los 20 min. no arrojó diferencias, tanto al comparar las distintas columnas de cada grupo entre sí, como individualmente - entre ambos grupos.

Contrariamente despues de los 30 min. de incubación la pro ducción de Testosterona fué mayor en las células incubadas con - hormonas, tanto LH como LH + FSH, que aquellas incubadas con buf- fer ($p < 0,001$; $p < 0,001$) si bien no existió diferencia al comparar ambas incubaciones hormonales entre sí ($p < 0,2$)

Y tras 40 min. de incubación, las diferencias entre las in cubaciones con LH y LH + FSH se hacen ostensibles, y a su vez es- tadísticamente significativas ($p < 0,01$), hecho que se repite de - forma clara y evidente a los 50 y 60 min., pero no a los 180 min. ($p < 0,01$).



C U A D R O IV -a-

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Estímulo utilizado</u>	<u>Producción de Testosterona ng/ 16 x 10⁶ células</u>
10 min.	Basal	6,141 ± 553
	5 mU.I. LH	4,900 ± 453
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	6,027 ± 543
20 min.	Basal	6,042 ± 428
	5 mU.I. LH	6,109 ± 747
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	7,700 ± 443
30 min.	Basal	5,325 ± 412
	5 mU.I. LH	8,250 ± 499
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	8,525 ± 470
40 min.	Basal	4,118 ± 685
	5 mU.I. LH	6,729 ± 404
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	12,870 ± 502

C U A D R O IV -b-

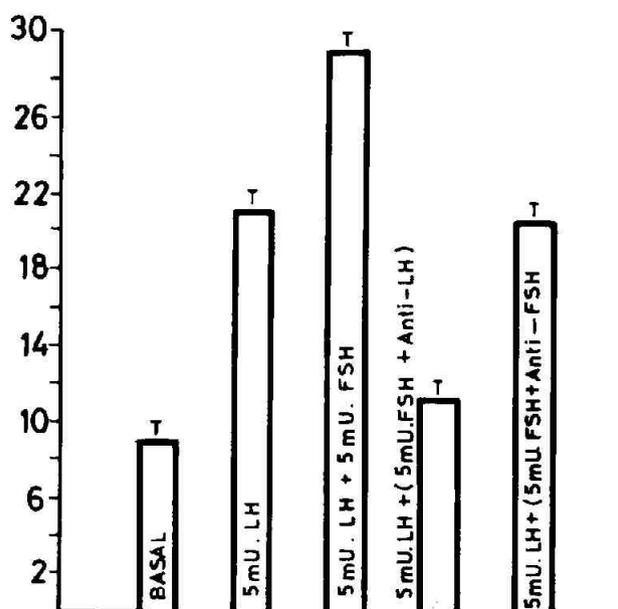
<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Estímulo utilizado</u>	<u>Producción de Testosterona ng/ 16 x 10⁶ células</u>
50 min.	Basal	4,737 ± 687
	5 mU.I. LH	8,731 ± 283
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	16,720 ± 1655
60 min.	Basal	6,800 ± 624
	5 mU.I. LH	9,321 ± 1520
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	12.512 ± 858
180 min.	Basal	10.100 ± 825
	5 mU.I. LH	42.900 ± 2765
	5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	42.075 ± 2320

En la figura 6 y cuadro V, mostramos comparativamente los resultados obtenidos tras valorar la producción de Testosterona, por células intersticiales de Leydig incubadas en condiciones ya señaladas anteriormente, así como en el texto de la ya mencionada figura. Puede apreciarse en ella, como existió una evidente diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$), al comparar la producción de Testosterona en células incubadas con LH y las incubadas solo con buffer, y como a su vez la producción esteroidea en el grupo de células incubadas con LH + FSH fue mayor, con el mismo grado de significatividad estadística, que la de LH, reconfirmado una vez más - lo ya observado en la experiencia anterior tras incubación de células durante 40, 50 y 60 min.

De gran interés resulta, también la producción de Testosterona en las células incubadas en primer lugar con LH y a los que posteriormente se le añadió FSH unido a anticuerpos anti-FSH, y que como puede observarse fue casi igual, e indistinguible estadísticamente, de la producción de las células incubadas con LH y mucho menor ($p < 0,01$) que las incubadas con LH + FSH.

Finalmente la producción de Testosterona, en las células incubadas con LH y a las que posteriormente se les añadió FSH incubada durante 2 horas con anticuerpo anti-LH, fué menor ($p < 0,01$) que todos los demás grupos, si exceptuamos el grupo basal (células incubadas con buffer PBS).

TESTOSTERONA ng / 16×10^6 células / 120 min.



C U A D R O V

Tipo de estímulo
en la incubación

Producción de Testosterona
ng/16 x 10⁶ cel./120 min.

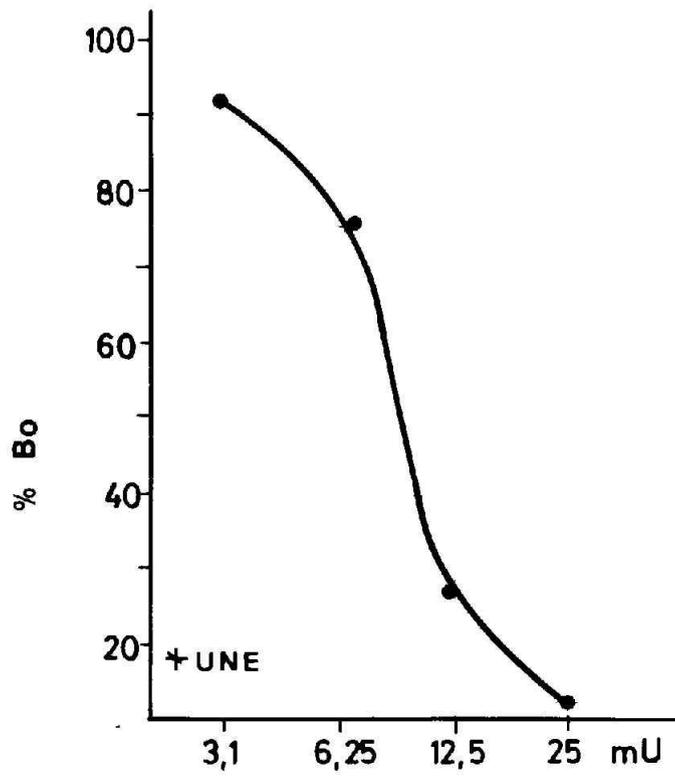
Buffer	9,875 ± 1025
5 mU.I. de LH	23,466 ± 2283
5 mU.I. LH + 5 mU.I. FSH	29,040 ± 1329
5 mU.I. LH + (5 mU.I. FSH + anti-FSH)	21,175 ± 1153
5 mU.I. LH + (5 mU.I. FSH + anti-LH)	13,410 ± 1132

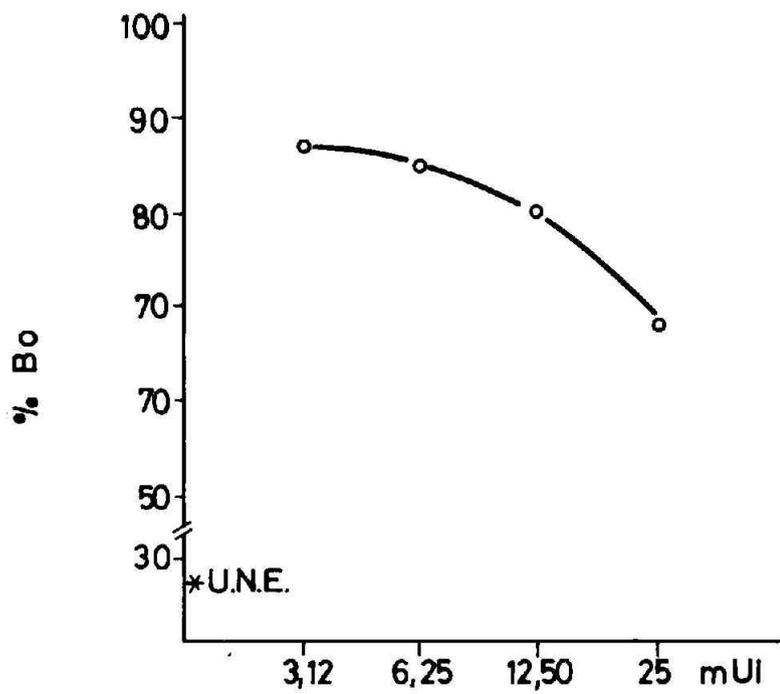
VI. UNION ESPECIFICA DE LH-I¹²⁵ SOBRE RECEPTOR DE LH. LA MODIFICACION POR DIVERSAS CONCENTRACIONES DE LH Y FSH.

La figura 7 muestra una curva de desplazamiento de LH-I¹²⁵ sobre receptor de LH, cuando se añaden a los tubos diversas concentraciones de LH.

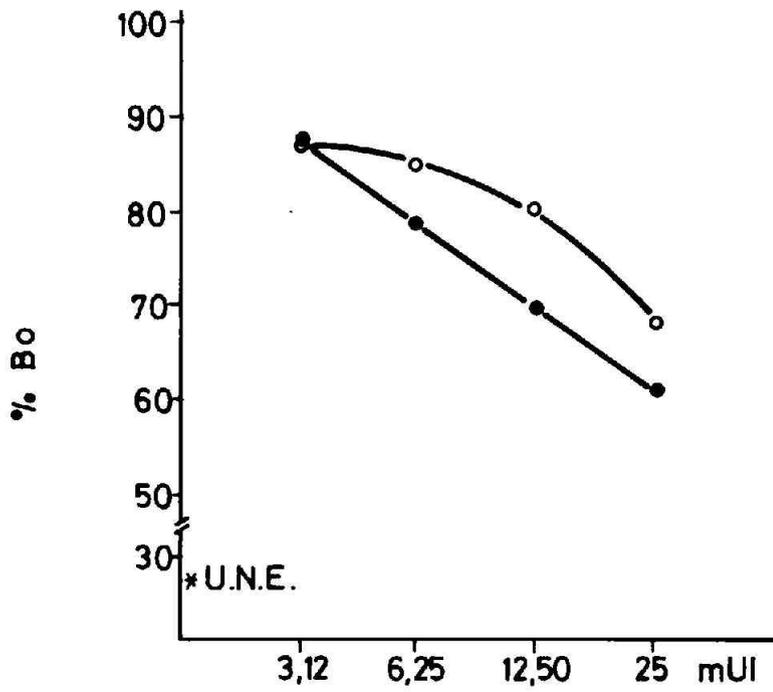
Se han utilizado las mismas concentraciones de LH (3,1 6,25 12,5 y 25 mU.I.) que las utilizadas en las incubaciones de células. Con las diferentes concentraciones standards se ha representado el porcentaje sobre 0 de fracción "ligada" al receptor, obtenidos para cada una de ellas, pudiéndose observar sobre el eje de ordenada la unión de LH-I¹²⁵ en presencia de cantidades saturantes de hormona "fría" (unión no específica U.N.E.).

Cuando en lugar de poner LH, en presencia de receptor y LH-I¹²⁵, pusimos FSH a las mismas concentraciones, es decir, 3,1 6,25 12,5 y 25 mU.I.; obtuvimos los resultados que mostramos en la figura 8, en la que aparecen conjuntamente reacciones de desplazamiento por LH y FSH, y en los que destaca la existencia de un desplazamiento para FSH, que es muy evidente aunque de menor grado que el obtenido por LH.





○ FSH



- LH
- FSH



C A P I T U L O V

EPICRITICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

El incremento en la producción de testosterona obtenido al incubar en las condiciones elegidas, las células de Leydig de rata con distintas concentraciones de LH muestra no sólo la viabilidad celular "in vitro" sino a su vez una gran sensibilidad - (0,6 mU.I.), ya referida anteriormente por el autor del método DU FAU y cols. (24), y que si bien podía aumentarse adicionando al sistema MIX, un inhibidor de la fosfodiesterasa, como demostraron los autores antes mencionados, era más que suficiente para analizar la respuesta celular ante las diferentes condiciones experimentales.

La producción de testosterona obtenida tras la incubación de las células con hCG nos permite establecer una vez más, la mayor actividad biológica de dicha hormona señalada ya por DUFAU y cols. (21)(24), cuando se compara con la LH, puesta de manifiesto por una mayor producción esteroidea y que conduce a una máxima liberación de testosterona con solo 5 mU.I., mitad de dosis - que para LH (10.40 mU.I.), y aumenta el límite de sensibilidad del sistema a 0.31 mU.I., ya que por esta dosis la concentración de testosterona en el medio es claramente mayor ($p < 0,01$) que la de aquellos viales considerados como blancos.

La producción de testosterona, en función del tiempo de - incubación de la célula, inducida por 5 mU.I. de LH, muestra que si bien existe una respuesta clara a partir de los cuarenta minutos de iniciarse la incubación, esta se incrementó mostrándose - proporcionalmente mayor hasta los ciento ochenta minutos. Parece existir también una cierta relación entre dosis de gonadotrofina y tiempo de respuesta del sistema, como pudo comprobar CATT y - cols. (7) que con una dosis importante de hCG (100-1.000 mU.I.) obtuvo respuesta celular por encima del valor basal ya a los - veinte minutos de incubación, si bien le fué imposible disminuir el tiempo de respuesta por debajo de este límite, contrastando ello con los resultados obtenidos por EIK-NESS (25) "in vivo" tras perfundir testículo de cerdo con hCG obtenía respuesta en lo que a liberación de testosterona se refiere al minuto de - haber estimulado el teste.

De todas formas el periodo de tiempo que aparece es necesario que transcurra entre el inicio del estímulo, unión de la tropina al receptor, y de comienzo la liberación de testosterona sugiere que una compleja serie de eventos metabólicos deben ocurrir antes de que la esteroidogénesis se muestre aparente. Curiosa y estrechamente relacionado con el punto que analizamos CATT y cols. (7) han podido comprobar que dosis de hCG que son capaces

de producir una máxima liberación de testosterona al medio por parte de las células de Leydig son incapaces de provocar liberación a este de AMP cíclico y como dosis crecientes de gonadotrofina coriónica humana (100-1.000 mU.I.) que ya vimos antes no pueden incrementar más la producción de testosterona, se muestran aun capaces de aumentar la liberación de AMP cíclico al medio.

Datos muy interesantes, a nuestro juicio, resultaron al incubar las células de Leydig con gonadotrofina luteoestimulante y foliculoestimulante, ya que del análisis de estos se desprende una mayor producción de testosterona cuando la célula se incubaron con ambas gonadotrofinas existiendo a su vez una clara relación en función del tiempo que se mantuvo la incubación. Y así a los cuarenta, cincuenta y sesenta minutos de ésta, la testosterona producida fue superior en aquellas células incubadas con LH + FSH, que en aquellas con LH sola, y en ésta a su vez a las células incubadas sin gonadotrofinas, siendo la falta de diferencia que obtuvimos entre ambos grupos de células incubadas con gonadotrofinas tras tres horas de incubación atribuible a haberse alcanzado la máxima capacidad de respuesta esteroidogénica en las mencionadas células.

Estos hallazgos difieren de los obtenidos por DUFAU y cols. (22) quienes usando como órgano diana de producción de testosterona teste decapsulados, no han observado efecto adicional de FSH sobre la producción de testosterona LH inducida, no obstante hay que señalar que dichos autores utilizaban preparaciones ovinas - tanto de LH como FSH, así como testes enteros decapsulados portando por tanto, junto a células intersticiales con receptores específicos para LH, receptores específicos para FSH con gran afinidad para dicha hormona, y que podrían haber impedido la acción sinérgica con la LH.

Dado que el incremento de la respuesta esteroidogénica observada para FSH podría ser dependiente de la preparación de hormona usada, como señalabamos anteriormente, para determinar la especificidad biológica de la acción quisimos ver, si a la incubación previa de ambas gonadotropinas con anticuerpos específicos, anti-LH y anti-FSH, seguía la desaparición del efecto biológico - que habíamos observado con ellas.

El análisis de los resultados aparece bastante demostrativo, nuevamente, esta vez tras dos horas de incubación de las células, volvemos a encontrar una mayor producción de testosterona - tras introducir LH en el sistema, siendo mayor la producción esteroidea por las células, cuando se adicionó LH + FSH, lo que confirman lo obtenido en el experimento anterior, y establecía a su vez una base firme para analizar los efectos producidos por los - anticuerpos anti-hormona. De una forma muy clara apreciamos que - la incubación de FSH + anti-FSH dió lugar a una disminución en la producción de testosterona, que resultó sin diferencia estadística con aquella inducida por LH sola, lo que demuestra a nuestro - juicio que el aumento de la producción de testosterona era FSH dependiente.

No tan claros resultaron los datos obtenidos al incubar - FSH + anti-LH, y que condujeron a un evidente descenso en la producción esteroidea. Nuestra interpretación del fenómeno es que éste pudiera deberse, o bien a efecto del anticuerpo anti-LH sobre la LH depositada previamente en el medio de incubación, lo que - conduciría a valorar sólo el efecto metabólico de FSH sobre las células y/o a cierto grado de contaminación por LH de la preparación de FSH utilizada, dada la dificultad de separar totalmente - ambas actividades. No obstante, este último hallazgo analizado, no invalida en modo alguno los resultados obtenidos y analizados anteriormente de la incubación de LH + FSH + anticuerpo anti-FSH.

Nuestros hallazgos concuerdan de forma evidente con los obtenidos por LOSTROH (42) quien tomando el peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales de la rata como indicadores cuantitativos de la respuesta "in vivo" de las gonadotrofinas, pudo demostrar como el peso de dichos órganos era muy superior al inyectar a ratas hipofisectomizadas con LH + FSH, siendo claramente inferior el peso obtenido al inyectar a los animales con FSH sola. La clara diferencia obtenida en el peso de los órganos de ambos grupos de animales, eliminaba la contaminación de FSH por LH. Posteriormente a estos experimentos han sido confirmados por ODELL y cols. (50) también en ratas, y por JOHSON y EWING (32) en conejos.

Un paso más en el estudio que nos propusimos era si la preparación de FSH utilizada modificaba en alguna forma la relación LH-receptor.

Para ello, resultaba obligado el obtener una preparación de testículo de rata conteniendo receptores activos metabólicamente, sobre los que después de desarrollar el "binding" de la hormona luteinizante marcada con I^{125} , y en la que el proceso de iodación no condujera a una pérdida de la actividad biológica, lo que de suceder haría imposible una unión específica LH- I^{125} -receptor. El método seguido, descrito en el capítulo correspondiente, nos dió muy buenos resultados concordando estos con los datos presentados por otros autores.

El análisis de la curva de desplazamiento de LH- I^{125} de su receptor muestra un sistema ampliamente discriminativo a los niveles de dosis de LH "fría" testados así como una gran sensibilidad; 3,1 mU.I. de LH producen un "binding" menor estadísticamente al obtenido entre LH- I^{125} y receptor en ausencia de hormona. Esta

gran sensibilidad hace perfectamente posible la utilización del sistema para medir niveles circulantes de LH o de hCG como han señalado CATT y cols. (9), DUFAU y cols. (24), TOMODA y cols. (61) y LEIDENBERGER y cols. (40).

A su vez, la pendiente de la curva de desplazamiento, así como la evidente diferencia entre la Unión No Específica obtenida al introducir en el sistema LH-I¹²⁵-receptor 500 mU.I. de LH — "fría" demuestran la actividad biológica tanto del receptor como de la hormona marcada que hemos empleado en el presente estudio.

Los resultados obtenidos al incubar LH-I¹²⁵-receptor LH y distintas concentraciones de nuestra preparación de FSH, mostraron un desplazamiento de LH-I¹²⁵ por la FSH "fría" y que si bien es de mucho menos grado que el apreciado para LH, es evidente su existencia. Tanto CATT y cols. (9) como TOMODA y cols. (34) con receptores de testes de rata y KAMMERMAN y cols. (34) con células de la granulosa del cerdo, han encontrado cierto grado de desplazamiento por las preparaciones de FSH por ellos testados.

Finalmente pues, podemos decir a modo de resumen, que en nuestro trabajo hemos encontrado un efecto claro de potenciación de la hormona foliculoestimulante sobre la producción de testosterona LH inducida, efecto claramente específico, ya que desaparece bajo la acción de los anticuerpos anti-FSH, y que en cierta manera puede estar relacionado con el sistema receptor de la hormona luteinizante. Datos muy interesantes, en este último sentido han sido presentados por KETELSLEGERS y cols. (35) mostrando como en la rata hipofisectomizada inmadura la FSH inyectada es capaz de aumentar el número de receptores de LH por teste así como la sensi-

bilidad y magnitud de la respuesta esteroidea "*in vitro*". Datos estos que si bien no aclaran el mecanismo directo de la FSH sobre la respuesta esteroidogénica a la LH, si al menos confirma tambien la dependencia.

C A P I T U L O V I

CONCLUSIONES

** El procedimiento empleado para aislar células intersticiales de Leydig de rata, célula diana de nuestras experiencias, resultó muy efectivo dada la alta proporción obtenida de dichas células, así como la escasa contaminación de elementos tubulares.

** Las distintas poblaciones de células de Leydig aisladas fueron perfectamente viables, como lo demuestra el hecho que la adición de hormonas luteoestimulante y coriónica al medio de incubación, condujo a un aumento de la producción de testosterona por las células incubadas.

** El sistema celular de Leydig-testosterona liberada, se mostró extraordinariamente sensible para medir actividad biológica de gonadotrofina luteoestimulante humana (0,6 mU.I.) existiendo una relación dosis-respuesta desde 0,6 mU.I. hasta 10,6 mU.I.

** La gonadotrofina coriónica humana, mostró una mayor actividad biológica que la luteoestimulante (límite de sensibilidad 0,3 mU.I.).

** El tiempo de respuesta mínimo del sistema a las dosis de gonadotrofina testadas fué de 30 a 40 min., no -

obteniéndose respuesta estadística significativa por debajo de es
te tiempo.

** Asi pues, y basándose en todo lo anteriormente ex-
puesto, considerando que el sistema es óptimo para el estudio de
actividades biológicas hormonales, así como para medir efectos -
"in vitro"; estimulatorios o inhibitorios.

** La adición de hormona foliculoestimulante al medio
de incubación conteniendo hormona luteinizante, y células incre-
mentó la producción de testosterona de forma significativa.

** El mencionado incremento se obtuvo a lo largo de -
todos los diferentes tiempos de incubación testados, desde 30 a
180 minutos.

** Hemos podido demostrar que el incremento de activi
dad biológica observado en el sistema va unido a la hormona foli-
culoestimulante, cuando al añadir anticuerpo anti-FSH al mismo ba
jó la producción de testosterona, haciéndose indistinguible de a-
quella obtenida por la hormona luteoestimulante humana aislada.

** Finalmente, esta actividad de la hormona folículo-
estimulante incrementando la producción de testosterona LH induci
da, parece de alguna forma ligada al receptor para la hormona lu-
teoestimulante como demostró el desplazamiento de LH-I¹²⁵ sobre -
receptor de hormona luteoestimulante obtenido de teste de rata, -
cuando se añadió al sistema dosis crecientes de hormona folículo-
estimulante.

C A P I T U L O V I I

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AZNAR REIG A. y AZNAR MARTIN A.
"De-represión y endocrinopatías paraneoplásicas"
XVIII Reunión Anual de la Asociación Enriquez de Sa
lamanca. Abril 1974. pag. 11.
Abelló S.A. Madrid 1975

- 2.- BISHOP W.H., NUREDDIND A. y RYAN R.J.
"Pituitary luteinising and follicle-stimulating hor-
mones"
En: Peptides hormones. Pag. 275. Ed. J.A. Parsons
Macmillan Press. London and Basingstoke 1976

- 3.- BLUNDELL T.
"Hormone and antihormone action at the target cell"
Nature 260 - 288 1976

- 4.- BURGUS R., BUTCHER M., AMOSS K., LING N., MONAHAN K.
RIVLER J., FELLOWS R., BLACKWELL R., VALE W., y
GUILLEMIN R.
"Primary structure of the orine hypothalamic luteini-
zing hormone-releasing factor (LRF)"
Proc. Nat. Acad. Sci. Wasch. 69/1 278 - 282 1972

- 5.- BUTCHER B.W. y SUTHERLAND E.A.
"The role of cyclic AMP in the steroidogenic actions
of ACTH and LH"
En: Protein and Polypeptide Hormones Part 1 Pag. 176
Ed. M. Margonlies Excerta Medica. Amsterdam 1968

- 6.- CATT K.J.
"Membrane receptors for peptide hormone"
Acta Endocrinologica Suppl. 202 Marzo 1976

- 7.- CATT K.J. y DUFAU M.L.
"Interactions of LH and hCG with testicular gonadotropin receptors"
En: Receptors for Reproductive Hormones
Ed. B.W. O'Malley and R. Means. Plenum Press. New York and London 1973
- 8.- CATT K.J., DUFAU M.L. y TSURUHARA T.
"Studies on a radio ligand receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin"
J. Clin. Endocr. 32, 860 1971
- 9.- CATT K.J., DUFAU M.L. y TSURUHARA T.
"Radioligand-receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin"
J. Clin. Endocr. 34, 123 1972
- 10.- CATT K.J., DUFAU M.L. y TSURUHARA T.
"Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunits"
J. Clin. Endocr. Metab. 36, 73 1973
- 11.- CHRISTIENSEN R.O. y DESAUTEL K.
Program Annual Meeting Endocrine Society 1973 Pag.1
- 12.- COHEN P.
"Post-receptor responses to hormonal stimuli"
En: Peptide Hormones Ed. J.A. Parsons
National Institute for Medical Research. Mill Hill London 1976
- 13.- COULSON P., LIU T.C., MORNS D. y GORSKI J.
"Interaction of LH with the ovary"

En: Gonadotropins Pag. 227 Ed. B.B. Saxena C.G.
Beling y H.M. Gandy Willy Interscience New York 1972

14.- CROOKE A.C. y RYLE M.

"In vitro activity of human follicle-stimulating hormone "

En: Gonadotropins Pag. 193 Ed. E. Rosemberg X. Geron
Los Altos California 1968

15.- DAVIDSON E.H.

"Gene activity in early development"
Academic Press, New York 1968

16.- DE KRESTER D.M. y BURGER H.G.

"Ultrastructural studies of human Sertoli cell in normal men and males with hipogonadotropic hipogonadism before and after gonadotropic treatment"

En: Gonadotropins Pag. 640 Ed. B.B. Saxena C.G. Beling y H.M. Gandy Willy Interscience New York 1972

17.- DE KRESTER D.M., CATT K.J., BURGER H.G. y SMITH G.C.

"Radioautographic studies of the localization of I¹²⁵ labelled human luteinising and growth hormone in immature male rats"

J. Endocr. 43, 105 1969

18.- DE KRESTER D.M., CATT K.J. y PULSEN C.A.

"Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinising hormone in rats"

Endocrinology 80, 332 1971

- 19.- DE LA LLOSA P. y JUTISZ M.
En: Structure-activity relationships and polypeptide hormones. Part I Ed. M. Margoulis y F.C. Greenwood Pag. 229 ~~Excerpta~~ Medica Amsterdam 1968
- 20.- DUFAU M.L., CATT K.J. y TSURUHARA T.
"Gonadotropin stimulation of testosterone production by the rat testis in vitro"
Biochem. Biophys. Acta 252, 574 1971
- 21.- DUFAU M.L., CATT K.J. y TSURUHARA T.
"Relation in vitro biological activities by desialylated human luteinising hormone and chorionic gonadotropin"
Biochem. Biophys. Res. Commun 44, 1022 1971
- 22.- DUFAU M.L., CATT K.J. y TSURUHARA T.
"A sensitive gonadotropin responsive system: Radioimmunoassay of testosterone production by the rat testis in vitro"
Endocrinology 90, 1032 1972
- 23.- DUFAU M.L., WATANABE K. y CATT K.J.
"Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during inhibition with hCG in vitro"
J. Endocr. 92, 6 1973
- 24.- DUFAU M.L., MENDELSON C.R. y CATT K.J.
"A highly sensitive in vitro bioassay for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin: testosterone production by dispersed Leydig cells"
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 610 1974

- 25.- EIK-NESS K.B.
"Secretion of testosterone in anaesthetized dogs"
Endocrinology 71, 101 1962
- 26.- GEIGER R., KONIG W., WISSMAN H., GELSEN R. y ENZMANN F.
"Synthesis and characterisation of a decapeptide with LH-RH / TSH-RH activity"
Biochem. Biophys. Res. Commun 45, 767 1971
- 27.- GRAESSLIN D., LEIDENBERGER F.A., LICHTENBERG V., GLISSMAN D., HESS N., CZYGAN P.J. y BETTENDORF G.
"Existence of big and little forms of luteinising hormone in human serum"
Acta Endocr. 83, 466 1976
- 28.- GURDON J.B.
"Trans-planted nuclei and cell differentiation"
Sci. Ame. 219, 24 1968
- 29.- GURDON J.B.
"Nuclear transplantation and regulation of cell processes"
Br. Med. Bull. 26, 259 1973
- 30.- HANSSON V., REUSCH E., TRYGSTAD O. y TURGERSON O.
"FSH stimulation of testicular androgen binding protein"
Nature New. Biol. 246, 56 1973
- 31.- HILZ H.
"Transfer of information by a second messenger"
Abstracts Dtsche. Gest. Endokrinologie Bonn-

Lochmühle Mayo 1976

Acta Endocr. Suppl. 202, 82 1976

32.- JOHSON B.H. y EWING L.L.

"Follicle-stimulating hormone and the regulation of testosterone secretion in rabbit testes"

Science 173, 635 1976

33.- JUTISZ M. y TERTRIN-CLAY C.

"Luteinising hormone and human chorionic gonadotropin structure and activity"

En: Current topics in experimental endocrinology

Pag. 195 Vol. 2 Ed. V.H.T. James y L. Martini. Academic Press. New York and London 1974.

34.- KAMBERMAN S., CANFIELD R.E., KOLENA J. y CHANNING

"The binding of iodinated hCG to porcine granulosa - cells"

Endocrinology 91, 65 1972

35.- KEPELSLEGGERS J.M., HSUEH A.J.W., HETZEL W.D. y CATT K.J.

"Induction of luteinizing hormone (LH) receptors and LH sensitivity in the immature rat testis by follicle stimulating hormone (FSH)"

Abstract V International Congress of Endocrinology Hamburg Fed. Rep. Germany July 1976 Pag. 212

36.- KIELD J.M., HARSOULIS P., KUKU S.P., MARSHALL P., KAUFMAN B. y FRASER T.R.

"Infusions of hFSH and hLH in normal men"

Acta Endocrinologica 81, 225 1976

- 37.- KOLENA J. y CHANNING C.P.
"Stimulatory effects of LH-FSH and prostaglandins upon cyclic 3'5'-AMP levels in porcine granulosa cells"
Endocrinology 90, 1543 1972
- 38.- LEE C.Y. y RYAN R.J.
"The uptake of human luteinising hormone (hLH) by slices of luteinised rat ovaries"
Endocrinology 89, 1515 1971
- 39.- LEIDENBERG F. y REICHERT L.E. Jr
"Studies on the uptake of human chorionic gonadotropin and its subunits by rat testicular homogenates and interstitial tissue"
Endocrinology 91, 135 1972
- 40.- LEIDENBERG F.A., WILLASCHEK R., PAHNKE V.G. y REICHERT L.E.
"Application of a radioligand receptor assay for determination of luteinizing hormone in human serum"
Acta Endocrinologica 81, 54 1976
- 41.- LIU W.K., YANG K.P., BURLEIG B.D. y WARD D.W.
"Hormone binding and target cell activation in testis"
Ed. A.R. Means y M.L. Dufau Pag. 89
Plenum Press New York 1974
- 42.- LOSTROH A.J.
"Hormone control of spermatogenesis"
En: Regulatory mechanism of male reproductive physiology" Pag. 13
Excerpta Medica Amsterdam 1976

- 43.- LUNENFELD B. y ESHKOL A.
"The role of gonad-stimulating hormone on the development of the infantile ovary"
En: Gonadotropins Pag. 197 Ed. E. Rosemberg y K. Ceron. Los Altos California 1968
- 44.- MANCINI R.E., VILAR O., DONINI P. y LLORET A.P.
"Effects of human urinary FSH and LH in the recovery of espermatogenesis in hypophysectomised patients"
J. Clin. Endocr. 33, 888 1971
- 45.- MASON N.R. y SAVARD K.
"Specificity of gonadotropin stimulation of progesterone synthesis in bovine corpus luteum in vitro"
Endocrinology 74, 664 1968
- 46.- MEANS A.R.
"Early effects of TSH on testicular metabolism"
En: The human testis Pag. 301 Ed. E. Rosemberg y C.A. Poulsen Plenum Press London 1970
- 47.- MEANS A. R.
"Concerning the mechanism of FSH action: Rapid stimulation of testicular synthesis of nuclear RNA"
Endocrinology 89, 981 1971
- 48.- MEANS A.R. y VALIUKAITIS J.
"Peptide hormone receptors specific binding of H³ FSH to testis"
Endocrinology 90, 39 1972

- 49.- MURAD F., STRAUCH B.S. y WAUGAN M.
"The effect of gonadotropins on testicular adenyl
ciclase"
Biochem. Biophys. Acta (Amts) 177, 591 1969
- 50.- ODELL W.D., SWERDLOFF R.S., JACOBS K.S. y HESCOX M.
"FSH induction of sensitivity to LH: One cause of se
xual maturation in the male rat"
Endocrinology 92, 160 1973
- 51.- REBAR R., YEN S.S.V., VAN DENBERG G., NAFTOLIN F.,
EHARA Y., ENGBLOM S., RYAN K.J., RIVIER J., AMOSS M.
y GUILLEMIN R.
"Gonadotropin responses to synthetic LRF"
J. Clin. End. 39, 10 1974
- 52.- REICHELIN S.
"Regulation of the hypophysiotropic secretions of the
brain"
Arch. Intern. Med. 1935, 1350 1975
- 53.- RICE B.F., HAMMERSTEIN J. y SAVARD K.
"Steroid hormone formation in the human ovary: Actions
of gonadotrophins in vitro in the corpus luteum"
J. Clin. Endocr. 24, 606 1964
- 54.- RIZKALLAH T., GURPIDE E. y VAN DE WIELE R.L.
"Metabolism of hCG in man"
J. Clin. Endocr. 29,92 1969
- 55.- RYLE M., CHAPLIN M.F., GRAY C.J. y KENNEDY J.F.
"The action of neuraminic acid free derivative of TSH
on the mouse ovaries cultured in vitro"

En: Gonadotropins and Ovarian development Pag. 98
Ed. N.R. Buth A.C. Crooke and M. Reyce E. and S.
Livingstone. Edimburgh London 1970

- 56.- SCHALLY A.V., ANIMURA A., KASTIN A., MATSUO A.J.,
BABA Y., REDING T.W., NAIR R.N. y DEBELJUK G.
"Gonadotropin releasing hormone. One polipeptide re-
gulates secretion of luteinizing and follicle stimu-
lation hormones"
Science 173, 1036 1971
- 57.- SEYLER L.E. Jr. y REICHLIN S.
"Episodic secretion of luteinizing hormone releasing
factor (LRF) in the human"
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 471 1974
- 58.- STEINBERGER E.
"Hormonal control of mammalian spermatogenesis"
Physiol. Rev. 51, 1 1971
- 59.- SVEJGAARD A. y RYDER L.P.
"Interaction of HLA molecules with non-immunological
ligands as an explanation of HLA and disease associa-
tions"
Lancet II, 547 1976
- 60.- TOLKINS G.M., y GELEHRTER T.D.
Biochemical actions of hormones Pag. 1
Ed. G. Litwack Academic Press. New York 1972
- 61.- TOMODA Y., MIWA T. y ISHIZUKA N.
"Radioligand receptor assay for urinary and serum hCG"
J. Clin. Endocr. Metab. 40, 644 1975

62.- WANG C.F., DASLEY B.L., LEIN A. y YEN S. L.

"The functional changes of the pituitary gonadotrophins, during the menstrual cycle"

J. Clin. Endocr. Metab. 42, 718 1976

63.- YEN S.S.C. y TSAI C.C.

"The biphasic pathern in the feedback action of ethinyl estradiol on the release of pituitary FSH and LH"

J. Clin. Endocr. 33, 882 1971

