

11202.
2
24



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Postgrado

**HIPERPROLACTINEMIA Y EL EJE
HIPOTALAMO - HIPOFISIS - TESTICULO**

[Handwritten signature]

TESIS DE POSTGRADO
Que para obtener el título de
ESPECIALISTA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

presenta el

DR. JAIME OSWALDO GUEVARA AGUIRRE

[Handwritten initials]
Vo. B.
R. L.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

<u>INTRODUCCION</u>	1
I. PROLACTINA: GENERALIDADES.....	1
II. PROLACTINA Y EL EJE HIPOTALAMO HIPOFISIARIO.....	2
II.1 CONTROL DE LA SECRECION DE PROLACTINA (PRL).....	2
III. PROLACTINA Y HORMONA LUTEINIZANTE (LH).....	4
III.1 CONTROL DE LA SECRECION DE LH.....	4
III.1.1 Influencia del Sistema Opiode Endógeno sobre la liberación de LH.....	5
III.1.2 Influencia del Sistema Dopaminérgico sobre la secreción de LH.....	6
IV. PROLACTINA Y HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (FSH).....	7
V. PROLACTINA Y TESTICULO.....	8
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	11
I. REACTIVOS EMPLEADOS.....	11
II. MODELO EXPERIMENTAL.....	12
III. ANALISIS DE HORMONAS PROTEINICAS.....	13
III.1 GENERALIDADES.....	13
III.1.1 Yodación de los estándares.....	14
III.1.2 Generación del Segundo Anticuerpo.....	15
III.1.3 Cuantificaciones Hormonales.....	18
III.1.4 Cuantificaciones Hormonales.....	18
III.2 RADIOINMUNOANALISIS ESPECIFICOS.....	18
III.2.1 Hormona Prolactina.....	18
III.2.2 Hormona Luteinizante.....	19
III.2.3 Hormona Estimulante del Folículo.....	19
IV. ANALISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.....	20
IV.1 GENERALIDADES.....	20
IV.1.1 Introducción.....	20
IV.1.2 Obtención de los estándares radiactivos.....	21
IV.1.3 Métodos de Separación de las Fases.....	21
IV.1.4 Precedimiento de extracción de los esteroides del suero.....	21
IV.2 RADIOINMUNOANALISIS DE ESPECIFICOS.....	22
IV.2.1 Testosterona (T).....	22
IV.2.2 Estradiol (E ₂).....	23

V. ANALISIS DE RECEPTORES PARA FSH.....	24
V.1 ANALISIS DEL RADIO RECEPTOR DE FSH EN TESTICULO.....	24
V.1.1 Introducci3n.....	24
V.1.2 Yodaci3n del ligando radiactivo.....	25
V.1.3 Preparaci3n de las membranas testiculares.....	26
V.1.4 Descripci3n del procedimiento.....	27
V.1.5 C3lculo de resultados.....	27
VI. ANALISIS DE ABP EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.....	30
VI.1 DETERMINACION DE ABP EN CITOSOLES EPIDIDIMARIOS.....	30
VI.1.1 Obtenci3n del ligando radiactivo.....	31
VI.1.2 Preparaci3n de los citosoles epididimarios.....	32
VI.1.3 Descripci3n del procedimiento.....	32
VII. ANALISIS DE DATOS Y CONTROL DE CALIDAD EN EL RADIOINMUNOANALISIS.....	33
VII.1 ANALISIS DE DATOS.....	33
VII.1.1 Concepto de Confiabilidad.....	33
VII.1.2 Curva est3ndar y transformaci3n Logit-Log.....	34
VII.1.3 Indices de Validaci3n de la Curva Dosis-Respuesta linealizada.....	34
VII.1.4 C3lculo de Desconocidos	
VII.1.5 Precisi3n y Exactitud en los Radioinmunoan3lisis.....	36
VII.2 CONTROL DE CALIDAD.....	37
RESULTADOS.....	38
I. RESULTADOS EN EL GRUPO 1.....	40
II. RESULTADOS EN EL GRUPO 2.....	47
III. RESULTADOS EN EL GRUPO 3.....	50
IV. RESULTADOS EN EL GRUPO 4.....	53
DISCUSION.....	56
I. YODACIONES.....	56
II. HORMONAS PROTEINICAS.....	57
II.1 HORMONA PROLACTINA.....	57
II.2 HORMONA LUTEINIZANTE.....	57
II.3 HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO.....	58
III. HORMONAS ESTEROIDES.....	58
III.1 TESTOSTERONA EN SUERO E INTRATESTICULAR.....	58

IV. RECEPTORES PARA FSH EN MEMBRANAS TESTICULARES.....	60
IV.1 ARR-FSH EN MEMBRANAS TESTICULARES.....	60
V. ABP EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.....	60
V.1 DETERMINACION DE ABP EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.....	60
VI. CONSIDERACIONES FINALES	
VI.1 SUMARIO	
 ANEXO No. 1	
RADIOINMUNOANALISIS DE HORMONAS PROTEINICAS.....	63
ANEXO No.2	
RADIOINMUNOANALISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.....	80
ANEXO No.3	
ANALISIS DE RADIO-RECEPTOR PARA FSH EN TESTICULO.....	89
ANEXO No.4	
DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ABP* EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.....	95

BIBLIOGRAFIA.

* Protefna Transportadora a nivel testicular. Abreviada de su nombre en inglés: Androgen Binding Protein.

INTRODUCCION .

La Endocrinología ha venido evolucionando desde una concepción meramente clínica hacia lo que es hoy: una disciplina en la que se conjugan entre otras, la Fisiología y la Bioquímica aplicadas. El empleo de sofisticados análisis químicos combinados con ingeniosos modelos matemáticos, ha permitido arribar a conclusiones metodológicamente muy bien sustentadas y a emitir conceptos a la vez nuevos y valederos.

Tanto el estudio de las diferentes facetas del eje Hipotálamo-Hipofisiario, cuanto la evaluación de las acciones hormonales en los tejidos, son motivo de intensa investigación en la actualidad. Ubicándose en este contexto, se decidió estudiar algunas de las diversas influencias que tiene la hormona Prolactina sobre la fisiología del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, tratando de observar las diferencias existentes durante el proceso de la maduración sexual. Por considerarlo de utilidad e interés, se incluyen las siguientes secciones en las que se describen algunos aspectos relevantes al respecto.

I. PROLACTINA: GENERALIDADES.

La Hormona Prolactina (PRL), conjuntamente con la Hormona de Crecimiento (GH), y con la Somatotropina Coriónica (CS), pertenece a la familia de las Somatomotropinas. Estos péptidos tienen acciones biológicas comunes, tales como la promoción de la lactancia y el crecimiento. Existe una gran similitud estructural si se analiza a estas hormonas en las diferentes especies, lo cual sugiere que los cambios en su duplicación genética durante la evolución de los vertebrados, fueron relativamente limitados (89).

La PRL es una cadena polipeptídica simple con 3 puentes disulfuro intramoleculares dispuestos entre sus 198 aminoácidos (89).

Tiene un peso molecular de 23 kilodaltones, hecho que la ubica como una hormona relativamente grande. Como tal, sus efectos se ejercen preferentemente a través de receptores membranales específicos y se han implicado a varios compuestos como segundos mensajeros de su acción.

La PRL tiene efectos múltiples y se le atribuye más de 90 acciones diferentes (90). Su intervención en procesos fisiológicos tan diversos como la osmoregulación, crecimiento, desarrollo, metabolismo y la reproducción, se han documentado en diferentes especies (90). Entre las acciones más conspicuas de PRL entre los mamíferos, se deben mencionar las referidas a su capacidad lactogénica, las concernientes a sus influencias en los diferentes niveles del sistema Hipotálamo-Hipofisiario y las que tiene en el Sistema Reproductivo.

II. PROLACTINA Y EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIARIO.

Las complicadas interacciones entre PRL y la unidad Hipotálamo-Hipofisiaria han recibido atención preferente en el vasto campo de las Neurociencias. Día a día se van revelando los finos detalles de esta particular relación neuroendócrina y permanentemente se ofrecen nuevas perspectivas para la comprensión de sus complejos mecanismos. La secreción de PRL está determinada por un cortejo de influencias de variada índole y por lo tanto merece una descripción más detallada.

II.1 CONTROL DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA.

La secreción de la Hormona Prolactina está regulada principalmente por el Hipotálamo y por información neural y hormonal proveniente de la periferia. Se acepta que varios neurotransmisores y neuromoduladores, incluyendo catecolaminas y neuropéptidos, ejerzan influencias diversas sobre la secreción de Prolactina.

El Hipotálamo contiene dos tipos de factores que controlan dicha secreción: inhibidores o PIFs (41,122), y estimuladores-- ó PRFs (17,79,83,118). Entre los inhibidores se cuentan al -- ácido gamma aminobutírico (49,50) y al más establecido y estudiado dihidroxifeniletilamina, más conocido como Dopamina (41, 122). Entre los estimuladores se mencionan al Factor Libera-- dor de Tirotropina (TRH), al Péptido Intestinal Vasoactivo --- (VIP) y al Péptido Histidina-Isoleucina (PHI).

La regulación inhibitoria tónica de la secreción de PRL se ha demostrado mediante la interrupción de la influencia hipota-- lámica. Los procedimientos más empleados para el efecto son: a) el trasplante de hipófisis a sitios ectópicos (29,44,77) y b) la transección del tallo hipófisiario (79). En ambos casos se ha demostrado que existe un incremento notorio en la secre-- ción de la hormona.

En lo que se refiere a los factores que promueven la secre-- ción de Prolactina: TRH (58), VIP (61,71,110) y PHI (11,123),-- se ha visto que ellos actúan directamente en la Hipófisis y -- además, que son secretados a la circulación portal en cantidad suficiente para estimular dicha secreción.

De manera adicional, se ha establecido que un gran número - de neuromoduladores influyen la secreción de Prolactina. -- Entre los neurotransmisores clásicos se deben mencionar a la Se-- rotonina (17,57), Norepinefrina, Acetilcolina e Histamina (62). Entre los neuromoduladores putativos, se deben incluir a los - Péptidos Opioides (27,59,99) y posiblemente a sus receptores - (60,120). En todo caso, se ha sugerido que esta influencia -- neural se efectúa a través de modificaciones del cociente diná-- mico PIF/PRF en el Hipotálamo (62).

III. PROLACTINA Y HORMONA LUTEINIZANTE (LH).

Existe divergencia de opiniones con respecto a los efectos que pueda tener la hiperprolactinemia sobre la secreción de las gonadotropinas, en especial en lo que se refiere a la Hormona Luteinizante. A pesar de que algunos autores reportan incrementos en -- las concentraciones de LH (30,64), una gran cantidad de estudios describen la asociación de niveles elevados de Prolactina y concentraciones bajas de LH (5,7,73,83,125). Esta controversial situación requiere ser evaluada críticamente, considerando que tanto la regulación hipotalámica de estas hormonas, cuanto sus interrelaciones, son de naturaleza compleja. Por esta razón, se incluye a continuación, una descripción somera de los mecanismos que controlan la secreción de LH, esperando situarla en el contexto referido.

III.1 CONTROL DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA LUTEINIZANTE.

El Factor Liberador de las Gonadotropinas Hipofisarias --- (LHRH), es aparentemente la vía por la cual se ejercen la mayoría de las influencias neuroendócrinas que regulan la secreción de la Hormona Luteinizante. Las sustancias que modifican el cociente LH/LHRH y sus tasas de secreción, son agentes neuroactivos elaborados por neuronas altamente especializadas --- (neuronas concentradoras de esteroides, neuronas productoras de opioides y neuronas catecolaminérgicas). Todos estos factores se combinan temporal y armónicamente para dar patrones de secreción específicos. Es natural pensar que dichos elementos se encuentran en un equilibrio dinámico y por ende muy frágil, de donde se infiere que una alteración en cualquiera de los puntos, necesariamente influirá en los otros factores y producirá una disrupción de la cadena de control. En el particular que nos atañe, se deben considerar fundamentalmente -- los efectos de los Sistemas Opióide y Catecolaminérgico sobre la liberación de la Gonadotropina LH, pues aparentemente sus influencias son determinantes de las situaciones experimentales que se describen.

III.1.1 Influencia del Sistema Opiode Endógeno sobre la Liberación de LH.-

El tono opioide parece ser muy importante en la regulación de la secreción de la Hormona Luteinizante y se tienen evidencias experimentales que apoyan este aserto. Se han empleado diversos modelos para el estudio de esta regulación, entre ellos se incluye el uso de antagonistas opioides y opioides exógenos. Se ha demostrado que la administración de agonistas opioides es capaz de inhibir la secreción de LH bajo distintas condiciones experimentales (51,54,68). Sin embargo, es interesante que pequeñas dosis de morfina administradas a ratas inmaduras aumenten la secreción de LH (48). Además de mediar la liberación de LH, los opioides parecen influenciar los eventos neurosecretorios modulados por esteroides. Es así que la administración de morfina evita la acumulación de LHRH promovida por Progesterona en ratas ovariectomizadas y suplementadas con estrógenos. En un trabajo similar, se informó que el sulfato de morfina inhibió la acumulación de LHRH promovida por testosterona en ratas macho castradas. Además, este opioide exógeno es capaz de hacer efectiva la inhibición que sobre LH tienen dosis muy pequeñas de Testosterona, las mismas que cuando son administradas solas, no producen ningún efecto (40,72). Este hecho nos indica el desarrollo de una sensibilidad hipotalámica incrementada, como resultado de la acción sinérgica de un esteroide y un receptor opioide activado, enfatizando así, la posibilidad de cambios en umbrales hipotalámicos, dependientes de diversos estadios de los Sistemas Opiode y Esteroide.

El tono opioide está dado por la concentración relativa de diversos neuropéptidos, entre los que se cuentan:

1) Endorfinas.- Las neuronas secretoras de las Endorfinas se localizan en los núcleos arcuato y periventricular, de donde emiten sus proyecciones a la eminencia media y al área medial-preóptica del Hipotálamo, lugar en donde se ejerce su acción.- Su influencia se encuentra mediada por receptores del tipo μ y κ . Característicamente, las Endorfinas producen una inhibición parcial y/o una supresión de la secreción de las gonadotropinas

(16,50,56,68). Sin embargo, existen reportes recientes en la literatura en los que se plantea la posibilidad de que pudieran existir efectos diferenciales determinados por el sexo y por la edad (48,91).

2) Met-Enkefalina y Leu-Enkefalina.- Estos pentapéptidos -- tienen afinidad por receptores δ en las áreas medial preóptica, hipotalámica anterior, eminencia media y núcleo periventricular. Su papel en la liberación de LH no está completamente establecido, puesto que mientras Met-Enkefalina es capaz de suprimir la secreción de LH, Leu-Enkefalina parece estimularla (68,82).

3) Dinorfinas.- Son producidas a lo largo del tracto magno - celular. Ejercen sus efectos por intermedio de receptores y suprimen la liberación de LH (68). Su influencia es cuantitativamente mucho menor que la producida por las Endorfinas.

Se ha informado que la hiperprolactinemia es capaz de modificar las concentraciones de Endorfinas y de Met-Enkefalinas en diferentes partes del Sistema Nervioso Central (92). De esta manera, se substancia la posibilidad de cambios en las -- concentraciones de LH, mediados por el Sistema Opióide y producidos por PRL.

También sería de interés el conocer la dinámica del LHRH -- circulante bajo la condición patológica mencionada, considerando que los métodos de cuantificación de este péptido han mejorado (80).

III.1.2 Influencia del Sistema Dopaminérgico sobre la Secreción de LH.

Se ha propuesto que un tono dopaminérgico aumentado, como el existente en casi todos los tipos de hiperprolactinemia, podría ser el factor responsable de la depresión de los niveles de la Hormona Luteinizante (34,36,37). En realidad ha existido controversia al respecto y varios análisis de la dinámica -

de la Dopamina (DA), bajo la condición patológica en mención, han orientado hacia diferentes conclusiones. Así se ha visto que DA es capaz de liberar LHRH en la eminencia media de ratas macho in vitro, y hay evidencia de que la inyección intraventricular de DA produce liberación de LH in vivo (56). Por el contrario, la mayoría de la evidencia en la literatura indica que las neuronas dopaminérgicas son capaces de ejercer una influencia inhibitoria en la secreción de LH (34,36,37). De todas maneras, la persistencia de estas discrepancias precluye la emisión de conceptos categóricos al respecto. Sin embargo, la tendencia de los criterios hacia creer que LH es suprimida por un tono dopaminérgico aumentado, sumada a la evidencia mayor de que la hiperprolactinemia se asocia con niveles bajos de LH en la mayoría de los casos, sugiere fuertemente la posibilidad de que las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares sean capaces de inhibir tónicamente la liberación de la -- Hormona Luteinizante bajo condiciones de hiperprolactinemia.

IV. PROLACTINA Y HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO.

Como se menciona al inicio, existen informes controversiales en la literatura con respecto a los efectos que pudiera tener la hiperprolactinemia sobre la fisiología de las gonadotropinas. Este hecho es aún más manifiesto en el caso de la Hormona Folículo-Estimulante (FSH): se han informado datos que documentan tanto estimulación (6,64,121), cuanto inhibición de su liberación (6,7,73). Esta dualidad probablemente refleje la complejidad inherente de los mecanismos neurohormonales que gobiernan la liberación de FSH y cuyos pormenores son motivo de intensa investigación al presente. Se ha establecido que el control de la secreción de FSH es diferente al de LH, aún a pesar de que las dos hormonas son secretadas por el mismo gonadotropo, bajo la influencia de un factor liberador común (109). Mientras el locus neuroanatómico que rige la secreción de LH es muy amplio (núcleo supraquiasmático, núcleo arcuato, área medial preóptica y zonas del área hipotalámica anterior, de la banda diagonal de Brocca, del hipocampo, del nervus terminalis, del hipotálamo ventro medial, de la comisura anterior y del septum medial), el que gobierna la liberación de FSH parece estar restringido al área hipotalámica anterior y a la conexión -

del núcleo arcuato con la eminencia media en el hipotálamo ventromedial (53).

La manera como influencia el Sistema Opióide Endógeno y el Sistema Catecolaminérgico a esta secreción no está claramente delineada, de tal modo que cualquier intento de análisis, incluyendo a estos elementos, es altamente especulativo.

V. PROLACTINA Y TESTICULO.

Las relaciones entre la Hormona Prolactina y el Testículo, han sido abordadas desde diferentes enfoques. Estudios in vivo e in vitro han demostrado la presencia de receptores para Prolactina en las células de Leydig, sugiriendo acciones directas de la somatomotropina sobre el Testículo (1,14,23,95). Se han descrito funciones tróficas positivas de Prolactina sobre esta glándula. Entre las más conocidas están: mantenimiento de la espermatogénesis (126), restauración de niveles de Testosterona e incremento de la incorporación de ^{14}C -acetato a Testosterona (45), aumento de las reservas gonadales de colesterol (3), incremento en la unión de LH a sus receptores y aumento del número de los mismos (11,74,81,128), etc. En todo caso, estos efectos tróficos se ejercen teniendo como denominador común a un sinergismo entre PRL y LH bajo condiciones muy específicas de tiempo y duración de exposición del testículo a la hiperprolactinemia.

También existen varias observaciones que describen efectos antigonadales de PRL. Es así que la conocida disminución de Testosterona que ocurre en la gestación tardía de fetos masculinos, ha sido relacionada a los niveles de PRL, independientemente de otros factores (124). Se ha visto además, que PRL puede incidir negativamente en el Testículo, a través de mecanismos indirectos tales como la inhibición de la secreción de LH (34,36,37,38,103,125). Se ha involucrado como mecanismo intermedio de dicho efecto a la elevación del tono dopaminérgico en las neuronas tuberoinfundibulares. La activación de receptores para DA que precede a este aumento (26,36,37,42), conjuntamente con incrementos o disminuciones

del recambio de dicha catecolamina (19,35,43), son factores críticos en el establecimiento de una tonicidad determinada a nivel --hipotalámico. Alteraciones funcionales que afecten a cualquiera de estos factores, incidirán directamente en la dinámica de la secreción de la Hormona Luteinizante. Además, una serie de experimentos han sugerido fuertemente la posibilidad de que DA medie la retroalimentación negativa que ejerce la Testosterona sobre la secreción de LH (34,36,37,113,114,115). A pesar de este cúmulo de evidencia, se debe mencionar que existen varios informes en los que no se describe la asociación de hiperprolactinemia y concentraciones disminuidas de LH (34,81,124).

Los efectos tróficos positivos de PRL sobre el testículo son fáciles de entender, dadas las características estructurales y --funcionales de la hormona ubicada en su papel de somatomotropina. Por el contrario, la asociación muy frecuente de hiperprolactinemia con alteraciones endocrinológicas y gametogénicas del testículo, sugiere per se, la posibilidad de una relación causal entre estos factores. La factibilidad de que PRL pueda tener efectos deletéreos sobre la glándula sexual masculina ha sido postulada y substanciada en numerosos estudios (30,34,36,37,103,124,125). La información al respecto se ha venido acumulando rápidamente y dentro de ella se ha hecho evidente el trato preferente que ha recibido el análisis de la hiperprolactinemia sobre la célula intersticial del Testículo. Existen varios y controversiales trabajos sobre el tema (26,38,42,45,64,73,81,103,125), sin embargo, se puede percibir que son necesarias evaluaciones más completas de la fisiología testicular bajo la condición patológica en mención. La relativa carencia de análisis de la función de la célula tubular del Testículo (célula de Sertoli), cuando existen concentraciones elevadas de PRL, precluye la posibilidad de obtener conclusiones definitivas y orienta hacia la realización de estudios en los cuales se trate particularmente este aspecto.

Procurando ubicarse en la perspectiva ofrecida por la tan amplia gama de consideraciones esquematizadas en las secciones precedentes, se decidió estudiar los efectos de la hiperprolactinemia sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, tratando de advertir

las sutiles modificaciones imprimidas a este nivel por el proceso de la maduración sexual. Este último enfoque constituye un concepto relativamente nuevo y algunas publicaciones lo incluyen como componente importante de su desarrollo (12,44,91,112). La mera consideración de cambios inherentes al desarrollo secuencial del Sistema Reproductivo, confiere un matiz más dinámico al estudio de las áreas citadas y lo transforma en un análisis más completo del problema en mención.

OBJETIVO

En esta tesis se describen los experimentos diseñados y efectuados, con el objetivo de evaluar los efectos que tiene la hiperprolactinemia sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, analizados a diferentes períodos de la maduración sexual. Como luego se advertirá, el estudio de la fisiología de la Célula Tubular -- del Testículo (Célula de Sertoli), recibe una atención especial.

MATERIAL Y METODOS .

I. REACTIVOS EMPLEADOS.

Los reactivos empleados se describen categorizándolos de -- acuerdo a los diferentes análisis en que se usaron. A saber:

a) Reactivos para los Radioinmunoanálisis de Hormonas Proteínicas.-

El I^{125} se obtuvo de Amersham International (Inglaterra); las inmunoglobulinas de conejo, albumina sérica bovina -- ASB, Cloramina T, metabisulfito de sodio y EDTA de Sigma-Chemical, Co. (St. Louis, Mo.); los fosfatos mono y dibásico de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio de J.T.Baker, S.A. (México); la azida de sodio de Fisher Scientific, Co., el Sephadex (G-100) de - Pharmacia Fine Chemical (Upsala, Suecia); los adyuvantes-completo e incompleto de Freund de Difco, Mich. Las -- hormonas de naturaleza proteínica: Prolactina, Luteinizante y Folículo-Estimulante, así como sus anticuerpos específicos, fueron obtenidos de la NIAMDD (Bethesda, Md.)

b) Reactivos para los Radioinmunoanálisis de Hormonas Esteroides.-

Los esteroides marcados con tritio: 3H -Estradiol y 3H -Testosterona, con una actividad específica de 80-100 Ci/mmol se compraron a Amersham International (Inglaterra); los anticuerpos específicos correspondientes fueron provistos por el "Match Reagent Program", de la Organización Municipal de la Salud"

c) Reactivos para el Análisis de Unión de la Hormona Folículo Estimulante a Membranas Testiculares.-

El I^{125} provino de Amersham (Inglaterra); cloramina T, metabisulfito de sodio, yoduro de potasio, TRIS y albumina sérica bovina de Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.); los fosfatos mono y dibásico, cloruro de sodio, cloruro --

- de magnesio, sacarosa, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio de J.T.Baker, S.A. (México). Las Hormonas: Folículo Estimulante I-6 para las radioyodaciones, porcina para las uniones no específicas y RP-1 para las curvas de desplazamiento fueron procedentes del NIAMDD (Bethesda, Ma.).
- d) Reactivos para el ensayo de Unión de ^3H -5-Dihidrotestosterona a Citosoles de Epidídimo.-
- La ^3H -5-Dihidrotestosterona con una a.e. de 50.6 Ci/mmol, se obtuvo de New England Nuclear Corp. (Boston, Ma.); la ^3H -5-Dihidrotestosterona no radiactiva fué adquirida a Steraloids, Inc. (Wilton, Na); TRIS, carbón Norit A. y Dextrán de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y glicerol de J.T.Baker (México).

II. MODELO EXPERIMENTAL.

Basados en las consideraciones mencionadas respecto al control hipotalámico de la secreción de Prolactina, y las referentes a la influencia de la hiperprolactinemia sobre la fisiología del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, escogimos como modelo experimental a la rata macho hiperprolactinéica, analizada en diferentes estadios del desarrollo sexual.

Para obtener tal condición, se efectuaron trasplantes homogéneos de 2 glándulas hipofisarias de ratas Wistar hembras adultas, a las cápsulas renales de ratas macho provenientes de la misma colonia. Los animales trasplantados recibieron alimentación ad-libitum y permanecieron en un ciclo de 14 horas luz a una temperatura de 23°C. De acuerdo con la edad al tiempo del trasplante, los animales se incluyeron en 4 grupos. Los grupos 1 y 2 correspondieron a ratas inmaduras (15 días) y los grupos 3 y 4 a ratas adultas (60 días). Cada grupo experimental estuvo constituido por N animales trasplantados y N animales control. Estos últimos fueron manipulados de manera idéntica a los primeros, excepto que no recibieron el implante hipofisario. Todos los animales se sacrificaron luego de 30 días del trasplante y se colectaron -

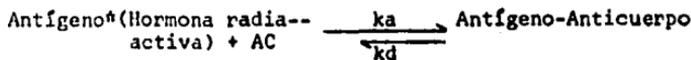
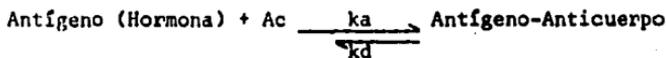
la sangre periférica y los tejidos testicular y epididimario. Se excluyeron del estudio a aquellos animales que presentaron signos de necrosis o infección en los sitios de trasplante, conjuntamente con concentraciones circulantes normales de Prolactina.

III. ANALISIS DE HORMONAS PROTEINICAS.

III.1 GENERALIDADES:

Dentro de los varios análisis hormonales conocidos, destaca nítidamente el denominado radioinmunoanálisis (RIA). Este tipo de estudio fué diseñado por los doctores Berson y Yallow (10), y su postulación les significó la concesión del premio Nobel de Medicina. La evolución en calidad y precisión que ha tenido este método incide directamente en los notables progresos que ha experimentado la Endocrinología moderna.

En este tipo de análisis, se utilizan hormonas radiactivas que compiten con preparaciones hormonales estandarizadas y hormonas presentes en los fluidos biológicos, por los sitios de unión que tienen los anticuerpos generados específicamente contra dichas moléculas. Siendo considerada la unión antígeno-anticuerpo como una pseudoreacción de primer orden, termodinámicamente se la puede expresar como:



ka= Constante de Asociación

kd= Constante de Disociación

La unión se considera reversible, siendo la constante de disociación mucho más lenta que la constante de asociación. De-

este hecho básico se deduce que la cantidad de hormona unida en un momento dado, está determinada por la resultante de la suma algebraica de las constantes de asociación y disociación. Puesto que las concentraciones de hormona radiactiva y anticuerpos son fijas, la resultante final dependerá exclusivamente de la concentración de hormona no radiactiva presente en la reacción.

Los estimados de la cantidad de la hormona en una muestra dada se pueden deducir de su interpolación a curvas estándar, para cuya confección se emplean varios métodos de graficación. Estos son: a) unido/libre vs Log de la dosis de la concentración hormonal; b) curva Dosis-Respuesta de unido/total vs la dosis de la hormona y c) transformación de los datos a una curva Logit vs Log, en la cual la linearización de la curva estándar permite una interpolación más sencilla y precisa de los resultados. En los análisis aquí descritos, es este último modelo el empleado para los cálculos (9,10).

III.1.2. Yodación de los Estándares.-

La incorporación de Yodo 125 a los residuos aromáticos de las Hormonas Proteínicas, se llevó a cabo mediante el método de la cloramina T (49). El procedimiento consiste en añadir 1 milicurie de I^{125} a una alícuota que contenga N microgramos de la hormona disueltas en PBS-0.01M-ASB0.1%, seguidos de la adición de una cantidad adecuada de Cloramina T. Luego de un tiempo de exposición al oxidante (30-60 segs), se detiene la reacción por medio del empleo de Metabisulfito de Sodio.

La separación del producto yodado del material radiactivo libre se hizo por medio de cromatografía en Sephadex G-100, eluyendo la columna con la solución amortiguadora antes mencionada.

Los productos de yodación y el material radiactivo fueron colectados en tubos de cristal que contenían PBS-0.01M-ASB 5%.

Estos tubos habían sido previamente enfriados a 4°C y en el momento de la recolección estaban sobre hielo. La actividad específica (ae) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$ae = \frac{B(D/C)}{A} = \text{microcuries/microgramo.}$$

en donde A= Masa de la hormona en microgramos

B= 1000 microcuries

C= Cuentas totales-residuo

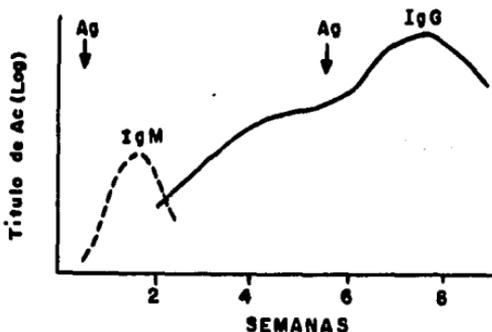
D= Cuentas totales de proteína yodada

Posteriormente se prepararon alícuotas de 100 microlitros a partir de los picos de elución y se las guardó a -20°C. En el momento del RIA respectivo, se les agregó Suero Normal de Conejo (SNC) a una concentración final del 2%.

III.1.3 Generación del Segundo Anticuerpo.-

Desde las descripciones iniciales de Ehrlich y Landsteiner (28,65), se han venido elaborando una serie de procedimientos tendientes a la generación de anticuerpos de especificidad conocida (33,117), por medio del empleo de inmunógenos determinados. La formación de las inmunoglobulinas sigue una secuencia clásica, la misma que puede expresarse gráficamente así:

CINETICA DE FORMACION DE ANTICUERPOS



Como se muestra en la figura, luego de la administración -- del antígeno se obtiene una inducción temprana y transitoria - del pentámero IgM, seguida de una elevación mayor, más prolongada y susceptible de perpetuación, de inmunoglobulinas del ti po IgG. Es esta última característica la que se explota para garantizar persistencia y aún incremento de títulos adecuados del segundo anticuerpo (Ig G), a través de inmunizaciones repetidas.

Haciendo uso de estos conocimientos, nuestro laboratorio generó en carneros un anticuerpo anti-gamma globulina de conejo. - La inmunoglobulina producida será descrita a partir de este -- punto como segundo anticuerpo y fué usada como factor precipitador en todos los radioinmunoanálisis de hormonas proteínicas que se describen aquí:

El procedimiento de generación del segundo anticuerpo fue el siguiente:

Primera Inmunización: a carneros de raza Merino Australiano, - de aproximadamente 35 kilos de peso y 6 meses de edad, se les administraron 100 microgramos/kilogramo de peso de gamma globulina de conejo, disueltos en 10 ml de adyuvante completo de -- Freund. Con esta dosis, se cumple el objetivo dual de inducir anticuerpos de alta afinidad por un lado, y de evitar el fenómeno de tolerancia por otro. La administración se realizó por la inyección intradérmica de 20 microdosis, a 3 cms de distancia cada una en el dorso del animal. Se tomaron muestras para titulación posterior.

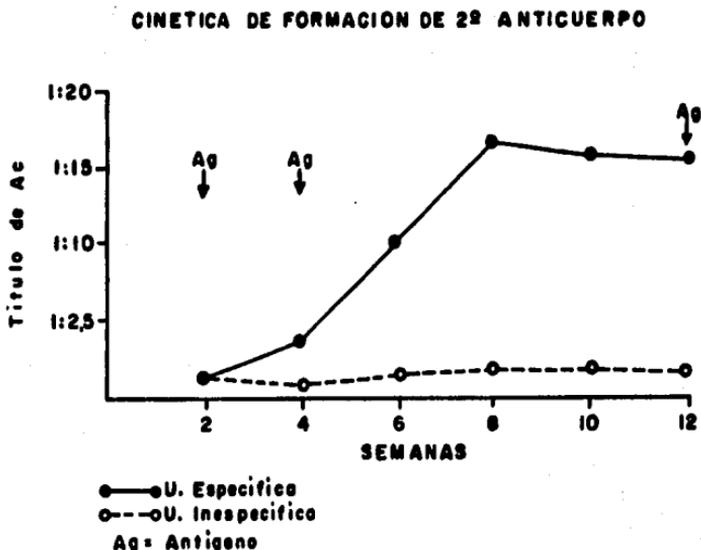
Segunda Inmunización: Luego de un lapso de 4 semanas, se reinmunizó a los animales, buscando una respuesta anamnésica apropiada. Se utilizó la misma dosis disuelta en adyuvante incompleto de Freund y aplicada sobre la misma área anatómica. Se tomaron muestras para titulación posterior.

Evaluación: A las 12 semanas se tomó otra muestra de suero y-

se analizaron todos los especímenes para estimar los títulos de anticuerpo inducidos, y así evaluar la respuesta generada.- Se debe anotar que los sueros se guardaron a -20°C .

Inmunizaciones Posteriores:

Cuando los títulos del 2o. anticuerpo fueron bajos a la 12a. semana, se utilizó una dosis similar a la de la segunda inmunización. Con el objeto de mantener elevados estos niveles, se administraron a los animales dosis similares a las de la segunda inmunización, cada 6 meses. El perfil de titulación del segundo anticuerpo así generado y expresado en valores de unión específica y no específica es el siguiente:



III.1.4 Cuantificaciones Hormonales.-

Las concentraciones circulantes de la Prolactina, Hormona Luteinizante y Hormona Folículo-Estimulante se determinaron por medio del uso de radioinmunoanálisis específicos, cuyos reactivos fueron proporcionados por la agencia de Hormonas Hipofisarias (Baltimore, Md.). En todos los casos, cada muestra -- fué analizada por triplicado y los resultados se expresaron en ng/ml de suero.

III.2 RADIOINMUNOANÁLISIS ESPECÍFICOS.

III.2.1 Hormona Prolactina.-

Reactivos empleados: 100 microlitros (ul) de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M-ASB 0.1%-SNC 2% (Solución A), conteniendo 20,000 cuentas por minuto (cpm) de ^{125}I -Prolactina I-5; 100 de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M-ASB a 0.1% (Solución B), conteniendo concentraciones crecientes de NIADKK-PRL-Rp-3 desde 0.15625 hasta 20 nanogramos por 100 ul; 100 ul de solución B conteniendo el anticuerpo anti rPRL S4, el cual actúa eficientemente a una dilución final de 1:10,000; 100 ul de solución B conteniendo el anticuerpo precipitador (segundo anticuerpo) en una dilución inicial de 1:10; agua desionizada y a una temperatura de 4°C.

Procedimiento: Se incubaron a temperatura ambiente y por 18 horas: 100 ul de la hormona radiactiva, 100 ul de las diferentes diluciones de PRL-Rp-3/6 muestra y 100 ul de anticuerpo -- anti rPRL S-4. Al cabo de este período se agregó a cada tubo 100 ml del segundo anticuerpo y se permitió proseguir la reacción por medio de la adición de 1 mililitro de agua. Se centrifugaron los tubos a 3000 revoluciones por minuto (rpm), durante 30 minutos (min.), se decantaron y se determinaron las cpm de los precipitados en un espectrofotómetro para radiaciones gamma -- (Eficiencia de conteo del 55%). Se calcularon los resultados a partir de las cpm obtenidas, en una calculadora Hewlett ----

Packard HP-97. Dichos resultados fueron expresados luego de su interpolación a una curva Logit vs Log (100), y se validaron de acuerdo a criterios de Control de Calidad previamente establecidos (9).

III.2.2 Hormona Luteinizante.-

Reactivos Empleados: 100 ul de Solución A conteniendo ---- 12,000 cpm de ¹²⁵I-LH I-5; 100 ul de Solución B conteniendo -- concentraciones crecientes de NIAMSD LH- Rp-1 desde 1.5625 --- hasta 100 nanogramos por 100 ul; 100 ul de Solución B, conteniendo el anticuerpo anti rLH-S8, el cual trabaja eficiente--- mente a una dilución final de 1:180,000; 100 ul de Solución B, conteniendo el segundo anticuerpo a una dilución inicial de -- 1:10.

Procedimiento: A 100 ul de la hormona radiactiva, se le agregaron 100 ul de las diferentes diluciones de LH-Rp-1/6 muestra y 100 ul del anticuerpo anti rLH-S8. Se incubó esta reacción por 18 horas, al cabo de las cuales se adicionó 100 ul del segundo anticuerpo a cada tubo y se dejó proseguir por 6 horas adicionales. Luego de este lapso se adicionó 1 mililitro de agua fría a cada tubo, se centrifugó el radioinmunoanálisis a 3000 rpm por 30 minutos, se decantó y se determinaron los cpm de los precipitados. Se calcularon los resultados de manera similar a la descrita para el RIA de PRL.

III.2.3 Hormona Estimulante del Folículo (FSH).-

Reactivos Empleados: 100 ul de solución amortiguadora de fosfatos 0.5M-gelatina 0.1%-SNC 2%, conteniendo 20,000 cpm de ¹²⁵I-FSH-I/; 300 ul de solución amortiguadora de fosfatos -- 0.05M-gelatina 0.1%, conteniendo cantidades crecientes de --- NIAMDD FSH Rp-1 desde 4 hasta 800 nanogramos por 300 ul; 200ul de solución amortiguadora 0.05M-EDTA, conteniendo el anticuerpo anti rFSH-S11 que trabaja una dilución final de 1:90,000; - 200 ul de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, conteniendo el segundo anticuerpo a una dilución inicial 1:20.

Procedimiento: Se incubaron a temperatura ambiente y por 24 - horas 100 ul de la hormona radiactiva, con 300 ul de los diferentes diluciones de la FSH-Rp-1/6 muestra y 200 ml del anticuerpo anti rFSH-S11. Luego de transcurrido este lapso, se le agregaron a la reacción 200 ul del segundo anticuerpo y se le dejó continuar por otras 24 horas. Al final de este período - se agregaron 2 mililitros de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M a 4°C a cada tubo. Se centrifugó el análisis a 3000 rpm por 30 minutos, se decantaron los tubos y se estimaron los cpm de los precipitados. Se calcularon los datos de manera similar a los RIAs de PRL y LH.

IV. ANALISIS DE HORMONAS ESTEROIDES.

IV.1 GENERALIDADES.

IV.1.1 Introducción.-

La mayoría de los radioinmunoanálisis para la cuantificación de Hormonas Esteroides, utilizan moléculas marcadas con ^3H . Las ventajas de estos análisis derivan de las características intrínsecas de las radiaciones beta. La prolongada vida media y el tipo blando de emisión de las partículas beta, inciden en que las preparaciones que usan este tipo de compuestos sean muy estables; que puedan ser guardadas con escasos riesgos de contaminación, y que representen un peligro mínimo de radiación externa al personal que los utiliza. Por supuesto que también existen desventajas inherentes al procedimiento. La relativa baja eficiencia con las que se cuentan las preparaciones, es un factor que implica que se necesiten concentraciones mayores de antígeno tritiado. El elevado costo del procedimiento originado en el uso de líquidos de centelleo es una desventaja adicional. Sin embargo, la sensibilidad de los análisis justifica el empleo de material tritiado con ventaja -- sobre las preparaciones yodadas, también disponibles para la cuantificación de Esteroides.

IV.1.2 Obtención de los Estándares Radiactivos.-

Estos compuestos se obtuvieron de Amersham (Inglaterra).---
³H-Estradiol y ³H-Testosterona tuvieron una actividad específica de 80-100 Curies/milimola.

IV.1.3 Métodos de separación de las Fases.-

Los métodos de separación de las fases (hormona libre-hormona unida) son de varios tipos. Los más usados son: precipitación química de la hormona unida, precipitación con un segundo anticuerpo, separación en fase sólida y adsorción con carbón recubierto de dextrán. En los análisis referidos en esta sección, se escogió como método de separación a éste último. - En realidad, el más importante sistema de separación de las fases hormona esteroide libre-hormona esteroide unida a anticuerpo, es el compuesto por carbón activado, recubierto de moléculas de dextrán que actúan como "coladores moleculares" (25). - Cuando se añade el carbón-dextrán a los tubos, al final de la incubación, el centro de la partícula (carbón activado) adsorbe el antígeno marcado libre. Debido a su tamaño mucho mayor, los complejos hormona-anticuerpo no pueden pasar a través del dextrán que recubre el carbón, permitiendo así una separación muy eficiente y confiable. La separación final se logra con centrifugación adecuada a baja temperatura (2-4°C) y decantamiento del sobrenadante. El uso de este rango de temperaturas es muy importante en este tipo de análisis, puesto que el método es dependiente de tiempo y temperatura de acuerdo a la Ley de Acción de las Masas. Los principios de esta Ley se aplican tanto a la reacción de unión del anticuerpo al antígeno, cuanto a la adsorción del antígeno libre por el carbón. La premisa básica a considerar es que las bajas temperaturas reducen la tasa de disociación del complejo antígeno-anticuerpo, la cual puede aumentarse debido a la presencia del carbón dextrán. El mismo tipo de deducción nos permite establecer que el carbón no debe dejarse por un tiempo muy prolongado con los incubados.

IV.1.4 Procedimiento de extracción de los Esteroides del suero.-

La extracción de los Esteroides se realizó siguiendo un protocolo..

sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que -- consta de los siguientes pasos:

- Adicionar a cada 500 microlitros de muestra un volúmen 10 veces mayor de éter etil dietílico.
- Agitar los tubos por 1 minuto y dejar separar las fases.
- Congelar la fase sólida en alcohol-hielo seco y decantar el sobrenadante en nuevos tubos.
- Evaporar el éter y resuspender los esteroides en 2 ml de una solución PBS 0.1M-gel 0.1% pH 7.3. Agitar por 1 minuto y -- guardar las muestras a 4°C ó realizar el RIA inmediatamente.

Se implementó además un sistema de medición de "recuperación": se adicionó un volumen de hormona radiactiva con aproximada--- mente 1000 cpm a las muestras, y se determinó posteriormente el número de cpm obtenidas luego de la extracción.

IV.1.5 Cuantificaciones Hormonales.-

Las concentraciones circulantes de Testosterona y Estradiol se determinaron por el uso de radioinmunoanálisis específicos (67), cuyas condiciones de incubación y extracción han sido -- previamente informadas por nuestro laboratorio (98). Cada --- muestra fué analizada por triplicado y se expresaron los resul tados en picogramos por mililitro de suero.

De manera similar a la de los demás análisis, los resulta-- dos se estimaron mediante el uso de un calculadora Hewlett -- Packard HP-97 y se expresaron en una curva estándar Logit vs - Log (100). El Control de Calidad de los ensayos respetó los - parámetros establecidos en nuestro Departamento (9).

IV.2 RADIOINMUNOANALISIS ESPECIFICOS.-

IV.2.1 Testosterona (T).-

Reactivos empleados: 100 ul de solución amortiguadora de fos fatos 0.1M-gel 0.1% (Solución D), conteniendo 10,000 cpm de -- ³H-T; 100 ul de solución D, conteniendo el anticuerpo anti T, - generado en ovejas, usando T-3CMO-ASB como inmunógeno. Este -

anticuerpo actúa eficientemente a una dilución final de -----
1:210,000; 100 ul de solución D, conteniendo cantidades cre---
cientes de Testosterona no radiactiva, desde 9.9 hasta 316.8 -
picogramos/100 ul; 200 ul de solución D, conteniendo carbón ac
tivado Norit A y Dextrán T-70.

Procedimiento: Se incubaron a 4°C por 24 horas 100 ul de hor-
mona radiactiva, con 100 ul de las diferentes diluciones de --
Testosterona no radiactiva/6 muestra y 100 ul del anticuerpo -
específico. Luego del lapso mencionado, se agregaron a los tu
bos 200 ul de solución D-Carbón-Dextrán. Se los dejó por 30 -
minutos, se los centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm y se de--
cantaron los sobrenadantes en viales conteniendo 5 mililitros-
de solución de centelleo. Luego de 1 minuto de agitación cons
tante se dejaron reposar los viales en la oscuridad por 4 hrs.
y se estimaron los cpm en un espectrofotómetro de Centelleo Lf
quido TRI CARB-300 que posefa una eficiencia de conteo de 50%.
Se calcularon los resultados mediante su interpolación, a una-
curva estándar Logit vs Log, de manera similar a la realizada-
con las Hormonas Proteínicas.

IV.2.2 Estradiol (E_2):-

Reactivos Empleados: 100 ml de Solución D, conteniendo ---
10,000 cpm de $^3H-E_2$, 100 ul de Solución D, conteniendo el anti
cuerpo anti- E_2 , generado en conejos usando como inmunógeno ---
 E_2 -6-CMO-ASB, y que actúa a una dilución final de 1:56,000; --
100 ul de concentraciones crecientes de E_2 no radiactivo, ----
desde 6.4 hasta 204.8 picogramos por mililitro; 200 ul de Solu
ción D-Carbón-Dextrán.

Procedimiento: Idéntico al que se emplea para cuantificar Tes
tosterona.

V. ANALISIS DE RECEPTORES PARA FSH (ARR-FSH).

V.1 ANALISIS DEL RADIO-RECEPTOR DE FSH (ARR-FSH) EN TESTICULO.-

V.1.1 Introducción.-

Los análisis de receptores de membrana (ARR) específicos -- para la hormona Folículo Estimulante (FSH), se efectuaron --- utilizando procedimientos establecidos en varios estudios --- (13, 24, 63, 70, 96, 104). En todos ellos se considera que el principio básico es el mismo que se emplea para el radioinmuno análisis (RIA): se logra la unión de una hormona radiactiva a un agente específico. La diferencia reside en que en el RIA - dicho agente es un anticuerpo y en el ARR se trata de un receptor para el ligando hormonal radiactivo.

Los receptores hormonales putativos, se encuentran en la su superficie externa de las membranas de las células de Sertoli. - Tienen determinadas características físico-químicas, que pue-- den ser analizadas mediante la combinación de sofisticadas téc nicas bioquímicas y análisis matemáticos postulados y estable-- cidos.

Los receptores de membrana para FSH son relativamente muy - estables cuando se guardan congelados a temperaturas menores a los -40°C, de tal manera que varias muestras pueden ser analiza-- das conjuntamente. Este hecho facilita la ejecución de cual-- quier estudio e infiere directamente en la reproducibilidad de los resultados.

En el presente estudio se utilizó para los ARR, la técnica- descrita por Findley y Steinberger en 1983 (32), con ligeras - modificaciones. Esta técnica introduce algunos cambios que -- son muy importantes. Los métodos empleados con anterioridad - (pg.*)utilizaban sistemas heterólogos, consistentes en prepara-- ciones membranales de rata y un ligando de origen humano (hFSH). Este hecho per se, podría condicionar pequeñas variantes en --

* (13,63,96,104)

en las características de la unión. Sin embargo, esta objeción se torna inexistente con el empleo de un sistema homólogo: preparaciones membranales y ligando de la misma especie, como el utilizado en el análisis diseñado por estos autores. Por otro lado, la Unión Específica informada por ellos es muy superior a las anteriormente reportadas. Todos estos factores, sumados a la fácil obtención de las preparaciones de receptores, se conjuntan para lograr un ensayo sensible y altamente reproducible.

V.1.2 Yodación del Ligando Radiactivo (^{125}I -rFSH).-

La obtención del ligando radiactivo se logra usando una modificación de la técnica de la Cloramina T (49), en la cual -- todas las soluciones y reactivos deben estar fríos (0° a 4°) -- para su uso. La descripción del método es la siguiente:

a) Se agrega 1.0 mCi de ^{125}I a 50 microlitros de PBS, 0.05, -- conteniendo 2.5 microgramos de FSH I-6 y se determinan las --- Cuentas Totales.

b) Se inicia la reacción añadiendo 2.5 microgramos del agente oxidante Cloramina T, disueltos en 10 microlitros de PBS 0.01M pH 7.4. Luego de 20 segundos de agitación constante, se detiene la incorporación de ^{125}I por medio de la adición de 50 microgramos de metabisulfito de sodio disueltos en 50 microlitros de PBS 0.01M pH 7.4. Se transfiere el producto a una -- columna de 25 x 0.9 cm, conteniendo Sephadex G-100 previamente saturado con PBS 0.01M ASB 5% pH 7.4 .

c) Se lava el recipiente (cono eppendorf de 0.5 ml), con 100-microlitros de PBS 0.01M pH 7.4, conteniendo Yoduro de Potasio al 1%, y Sacarosa al 16%, y se transfiere este producto a la -- columna mencionada. Se determinan las Cuentas Residuales.

d) Se inicia la cromatografía y se colectan 40 fracciones en-tubos de 7 x 1 cm, conteniendo 200 microlitros de PBS 0.01M -- ASB 5% pH 7.4 . Estos tubos deberán estar necesariamente ---

sobre hielo durante todo el proceso de cromatografía.

e) Luego de establecidos los picos máximos de elución de la hormona radiactiva y el Yodo libre, se escogen las fracciones idóneas de hormona para su uso posterior y se conservan congeladas a -20°C en alícuotas de 100 microlitros. Se calcula la actividad específica del compuesto con la fórmula previamente descrita :

$$a = B \frac{D}{C} / A$$

V.1.3 Preparación de las Membranas Testiculares.-

La preparación de los receptores para FSH en membranas testiculares se hizo de acuerdo a técnicas establecidas (32), y cuyo procedimiento es el siguiente:

a) Se preparan dos soluciones amortiguadoras que se denominan A y B. Ambas deberán estar a $2-4^{\circ}\text{C}$ para el día de su uso. La solución A está constituida por 0.025M TRIS, 0.010M Cloruro de Magnesio y 0.15M Sacarosa, y se ajusta a un pH de 7.2 . La solución B está hecha de 0.025M TRIS, 0.010M Cloruro de Magnesio y 0.10% ASB. No contiene Sacarosa y se ajusta a un pH de 7.2 .

b) Se toman los testículos inmediatamente después del sacrificio de los animales, se descapsulan, se pesan y se colocan en solución A en cantidad suficiente (5 mililitros por gramo de tejido).

c) Se homogeneizan en la posición 4 del Polytron-Kinematica - GmbH 3023, empleando para el efecto 3 "golpes" de 5 segundos -- cada uno y con 10 segundos de intervalo entre ellos, sumergiendo el recipiente de homogeneización en hielo durante dichos lapsos.

d) Se filtra el homogenado através de 4 y luego de 8 capas de gasa.

e) Se centrifuga el producto a 12,000 x g, durante 40 minutos en un aparato refrigerado a 2°C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 1.5 mililitros de solución B - por gramo pesado al inicio del proceso. La resuspensión se -- efectúa por agitación permanente en vortex (1 minuto) y deberá efectuarse en un cuarto frío.

f) Se centrifuga a 1500 x g, por 15 minutos, y se resuspende el precipitado utilizando un pistilo de teflón, cuidando siempre de que los recipientes permanezcan sobre hielo todo el --- tiempo. Se toman alícuotas de 200 microlitros para medición - de proteínas y se guardan los especímenes a -60°C.

V.1.4 Descripción del Procedimiento.-

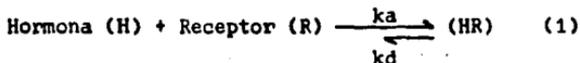
Los análisis se realizaron bajo agitación constante de 24 - horas a 4°C. Los tubos (0.9 x 7 cms), contenían 100 microlitros de ¹²⁵I-FSH (con aproximadamente 20,000 cpm), 100 microlitros de la preparación de los receptores y cantidades crecientes del estándar internacional RP-1, desde 2.334 a 300 nanogramos. Se ajustaron las preparaciones para un volúmen de incubación de 500 microlitros usando para ello la solución B. La -- Unión no específica se estimó efectuando incubaciones paralelas - con un exceso de 200 veces de FSH porcina, contenidas en 50 microlitros de la solución B. Al final del periodo de incubación se agregaron 2 mililitros de solución B a los tubos, se centrifugaron a 1600 x g, por 15 minutos, se decantaron y se contó - la radiactividad asociada a los precipitados en un Espectrofotómetro para radiaciones gamma (Eficiencia de conteo 55%).

V.1.5 Cálculo de los Resultados.-

Los razonamientos teóricos enunciados para la transformación de los datos de la unión de una hormona su receptor, se basan en los siguientes hechos:

1.- Cuando una hormona interactúa con su receptor, se produce-

una reacción bimolecular reversible, que alcanza su punto de equilibrio en un momento dado. Su expresión sería:



k_a = Constante de Asociación

k_d = Constante de Disociación

En esta asociación se asume que tanto la hormona, cuanto el receptor, son homogéneos y univalentes.

2.- Luego de transformaciones sucesivas se puede describir la siguiente relación:

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{(\text{HR})}{(\text{H})(\text{R})} = \frac{1}{K_d} \quad (2)$$

K_a = Constante de Asociación al equilibrio, expresada en moles por litro ó M^{-1} .

3.- La relación entre la concentración total de receptor y --- aquellos sitios ocupados se puede detallar como:

$$\text{Concentración total del receptor (Co)} = (\text{HR}) + (\text{R}) \quad (3)$$

que equivale a: $(\text{R}) = (\text{Co}) - (\text{HR})$

(R) = Número de receptores.

(HR) = Número de receptores ocupados.

(Co) = La concentración total del receptor.

Si se substituyen los términos, se pueden derivar las siguientes ecuaciones:

$$\frac{(\text{HR})}{(\text{H})(\text{R})} = \frac{1}{K_d} = K_a \quad (4)$$

$$y \quad \frac{(H)(R)}{(H)} = \frac{(R)}{kd} = \frac{1}{kd} (Co - [HR]) \quad (5)$$

de las cuales se infieren:

$$\frac{(HR)}{(H)} = \frac{1}{kd} \cdot (HR) + \frac{(Co)}{kd} \quad (6)$$

$$y \quad \frac{(HR)}{H} = - Ka (HR) + Ka(Co) \quad (7)$$

4.- Cuando se grafican las ecuaciones 6 y 7, se obtiene una relación expresada por una línea recta, cuya pendiente es equivalente a $-1/Kd$ ó $-Ka$. Aún más, las ecuaciones 6 y 7 son la representación matemática de un gráfico de "Scatchard", llamado así por el investigador que efectuó estas deducciones (107). El intercepto en la línea de las abscisas representa a (Co) y aquel en la línea de las ordenadas equivale a $Ka \cdot Co$ ó $(1/Kd) \cdot (Co)$. La pendiente de la línea es igual a $-Ka$ ó $-1/Kd$. Al graficar los datos se puede estimar los siguientes parámetros:

- A) Concentración total del receptor (Co) en las abscisas.
- B) Hormona unida/hormona libre $(HR)/(H)$ en las ordenadas.

5.- Considerando que el término $-Ka \cdot (HR)$ de la ecuación se acerca a cero, cuando la cantidad de hormona unida (HR) se acerca igualmente a cero, se puede establecer la siguiente relación:

$$\frac{(HR)}{H} + Co \cdot Ka = \frac{\text{Hormona Unida (u)}}{\text{Hormona Libre (l)}}$$

de la cual se puede despejar el término Ka así:

$$K_a = \frac{[HR]}{[H][Co]} = \frac{U}{L} \frac{1}{Co}$$

Si se reemplaza este término (Ka), en la ecuación 2, tendremos el valor de la Kd:

$$K_d = \frac{1}{K_a}$$

Ahora bien, se se conoce la concentración molar del receptor, se puede establecer el número de Sitios de Unión por miligramo de proteína. Para el efecto, se incluye este último parámetro, el número de moles del receptor y el número de Avogadro (número de moléculas por mol.). De esta manera se estandarizan y -- transforman los datos a número comprensibles y fáciles de analizar.

Todos estos cálculos fueron hechos por medio de programas en una microcomputadora Hewlett Packard-150.

VI. ANALISIS DE ABP* EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.

VI.1 DETERMINACION DE ABP EN CITOSOLES EPIDIDIMARIOS.

Las células de Sertoli de varias especies de vertebrados, secretan varios péptidos a los túbulos seminíferos del testículo. Entre ellos se encuentra la proteína denominada acronímicamente ABP (Androgen Binding Protein). Este polipéptido se encuentra bajo control hormonal y su metabolismo incluye su paso al epidídimo, en donde es inicialmente concentrado y luego es degradado (2). Se han realizado varios estudios en ABP purificado de epidídimos de rata (84,85,86), y se ha determinado que es un dímero con un peso molecular de 85 kilodaltones. Se compone de protómeros ligeros y pesados, que difieren ligeramente en su composición química y contenido de carbohidratos -

(66). Su gran afinidad por DHT y T ($K_a=10^9$ M), lo hacen especialmente adecuado para estudios de unión con los esteroides --mencionados.

Las similitudes entre el ABP de origen testicular y la proteína transportadora de andrógenos de origen hepático (TeBG), --son muchas (46). Se han postulado diversas hipótesis respecto a la función de ABP, sin embargo, hasta el momento, su papel en la fisiología es incierto (97).

El control hormonal de la célula de Sertoli se ejerce por --medio de testosterona y de FSH, siendo la célula en mención la --única estirpe que tiene receptores para FSH en el tejido testicular (34). Las funciones de FSH incluyen la estimulación de síntesis proteínicas en general, y de por lo menos 4 proteínas en --especial (36). Estas son ABP (34,36), un Activador de Plasminógeno, un Inhibidor de Protein-Cinasas y Gamma Glutamil Transpeptidasa. Hasta la fecha, estas acciones solo se han demostrado en la rata inmadura. A pesar de que el testículo se torna refractario a la acción de FSH alrededor de 25avo. día de edad de los --animales, se ha encontrado que la hipofisectomía puede restaurar la sensibilidad del testículo a la acción de la gonadotropina --(36,106), con producción de cAMP y ABP.

Tanto el procesamiento de tejido epididimario, cuanto las determinaciones del contenido de ABP, se hicieron siguiendo la metodología descrita por Larrea y Cols (66) en 1981.

A continuación se detalla esta técnica:

VI.1.1 Obtención del Ligando Radiactivo.-

El compuesto adquirido fue ^3H -5 α -Dihidrotestosterona, con --una actividad específica de 50.6 Ci/mmol. Se suspendió este esteroide en etanol, para obtener una concentración de 20 picomol/mililitro. Se emplearon 10 μl , conteniendo 10,000 cpm por --cada tubo.

VI.1.2 Preparación de los Citosoles Epididimarios.-

La preparación de los citosoles epididimario se hizo de acuerdo a técnicas establecidas (2,66), y cuya descripción es la siguiente:

a) Se prepara una Solución 0.02M TRIS, con 10% de glicerol pH 7.4 (Solución TG), la misma que debe estar refrigerada para su uso.

b) Se toman los epididimos inmediatamente luego del sacrificio de los animales, se disecan completamente, se fraccionan con tijera y se colocan en Solución TG en cantidad suficiente (18 mililitros por gramo de tejido).

c) Se homogeneizan en la posición 4 de Polytron-kinemática --- GmbH 3023, empleando para el efecto 6 "golpes" de 5 segundos - cada uno, con 10 segundos de intervalo entre los mismos y sumergiendo el recipiente de homogeneización en hielo durante dichos lapsos.

d) Se centrifuga el homogenado a 12,000 x g por 60 minutos a 2°C. Se aspira el sobrenadante y se descarta el precipitado.

e) Se coloca un miligramo de carbón Norit A por mililitro de sobrenadante. Se mantiene esta mezcla en agitación constante por 30 minutos y se la filtra através de algodón. Se toman -- 200 ul de alícuota para medir proteínas y se congelan los especímenes a -60°C.

VI.1.3 Descripción del Procedimiento.

Alícuotas de 200 microlitros de la preparación epididimaria fueron incubadas en equilibrio con concentraciones crecientes (1 a 40 nM) de ^3H DHT a 4°C durante una hora. Al finalizar -- este período, la separación de las fases (ABP- ^3H -DHT/ ^3H -DHT) - se realizó por la adición de 800 microlitros/tubo de una suspensión de carbón dextrán (250 mg de Norit A y 25 mg de ----

dextrán T-70 en 100 ml de Solución TG). Las muestras fueron - centrifugadas INMEDIATAMENTE a 3000 rpm durante 15 minutos. La determinación de la cantidad de radiactividad asociada al sobrenadante, se realizó utilizando 5 mililitros de Insta-Gel -- como solución de centelleo y se determinaron las cpm en un Espectrofotómetro de Centelleo Líquido (Eficiencia de conteo 42%). La estimación de la Unión No Específica, se efectuó mediante - el uso de incubaciones paralelas conteniendo un exceso de 250- veces del esteroide no radiactivo. La Unión Específica en cada muestra , se obtuvo como el resultado de sustraer a la --- Unión Total, la Unión No Específica.

VI.1.4 Cálculo de los Resultados.-

Las características físico-químicas y el número de Sitios - de Unión se determinaron utilizando la metodología descrita -- por Scatchard (107), y ya considerada en secciones precedentes.

VII. ANALISIS DE DATOS Y CONTROL DE CALIDAD EN EL RADIOINMUNOANALISIS.

VII.1 ANALISIS DE DATOS.

VII.1.1 Concepto de Confiabilidad.-

La Confiabilidad es la característica en la cual se combinan la Precisión y la Exactitud de un análisis, para dejar resultados que reflejen idealmente el contenido real de una --- muestra, tanto en una determinación individual cuanto a través - de determinaciones sucesivas.

En la práctica, esta situación no ocurre jamás. Las mediciones se encuentran dispersas alrededor de una media (según - la Precisión), la que a su vez se aproxima al valor real (de acuerdo a la Exactitud). De acuerdo a estos factores, se han diseñado una serie de procedimientos tendientes a minimizar -- los errores en las determinaciones individuales y a conceder a los análisis estabilidad y reproducibilidad.

VII.1.2 Curva Estándar y Transformación Logit Log.-

La curva estándar del radioinmunoanálisis es del tipo Dosis-Respuesta. Ella refleja la relación entre la concentración de hormona y el grado de unión de su forma radiactiva a un anticuerpo. Existen varias formas de expresar gráficamente esta relación y de entre ellas la más apropiada parece ser aquella en la cual se lineariza la Curva Dosis-Respuesta (78). En este método se transforma el porcentaje de unión (Y) a un Logit y la concentración de hormona o Dosis a un logaritmo decimal (X). Las ecuaciones correspondientes a este postulado son:

$$Y = \frac{100 (B-N)}{B_0 - N}$$

Logit $Y = L_{ne} \frac{Y}{100-Y}$

X = log dosis

En donde: Y=porcentaje de unión
B=cuentas totales
N=unión no específica
B₀=unión total
L_{ne}=logaritmo de base e
log=logaritmo de base 10

Luego de obtenidos, se grafican los valores del Logit Y, en el eje de las ordenadas y del Log X en el eje de las abscisas, con lo cual se tendrá la imagen gráfica de una Curva dosis-respuesta linearizada.

VII.1.3 Indices de Validación de la Curva Dosis-Respuesta Linearizada.-

Problemas derivados de su uso.-

A partir de valores pares de Logit y Log, se efectúa un Análisis de Regresión Linear, el cual establece los parámetros de la línea que mejor se ajusta a los puntos (método de los cuadrados menores). Estos parámetros son:

- El coeficiente de Regresión de la recta: (Intercepto en Y)
- El valor de la Pendiente de la recta: b
- El Error Estándar de las estimaciones individuales.
- El valor de la Linearidad con sus grados de libertad: F
- El valor de la Dispersión $Sy.x$.

Todos estos parámetros se encuentran generalmente en los -- programas computados que se han desarrollado para el cálculo - de RIA. Los valores correspondientes más frecuentemente usa-- dos son:

- El valor de la Pendiente (b): -2.303 ± 0.156
- El valor de F, que debe ser menor al tabulado y dentro del - 95% de los límites de confianza.
- El Coeficiente de Precisión $Sy.x$., que debe ser menor a 0.23.
- El Coeficiente de Correlación (Incluido en algunos programas), que debe estar lo más cercano a la unidad (entre 0.985 y --- 0.999).
- El valor del Intercepto al Origen.

Problemas inherentes a la Linearización de la Curva dosis-res-
puesta.-

A pesar de sus grandes ventajas, la Linearización tiene al-
menos dos problemas teóricos:

1.- La no-uniformidad de la Varianza: Es bien conocido el ---
hecho de que el Error Esperado se incrementa en los 2 extremos-
de la recta (78). La manera más simple para obviar éste incon-
veniente es la exclusión de los valores Y 80 ó 90% y Y 20 ó-
10% (15,20).

2.- La dependencia de todas las mediciones en 2 valores fijos-
Bo. y N.

Este problema podría resolverse usando el método de regre-
sión no lineal de cuatro parámetros (101), para el cual se re-
quieren procedimientos de computación sofisticados y aparatos-
muy costosos, lo que torna impráctica la solución. Por lo
cual, un recurso más idóneo es la disminución del error en las -

mediciones del Bo y N que se logra através de un incremento en el número de mediciones de estos valores en el análisis. ---- Idealmente estas mediciones deberfan hacerse al comienzo, al final y en lugares escogidos al azar (15).

VII.1.4 Cálculo de Desconocidos.-

Se efectúa luego de establecer los índices de validación de la curva estándar y de acuerdo a procedimientos establecidos.- En el caso de los RIAs de esteroides, siempre será necesario-- corregir el valor obtenido por el porcentaje de recuperación - de acuerdo a:

$$\text{Valor corregido} = \frac{\text{Valor Obtenido} \times 100}{\% \text{ de recuperación}}$$

VII.1.5 Precisión y Exactitud en los Radioinmunoanálisis.-

La precisión de un análisis, está dado por la Relación Respuesta-Error medio de la respuesta y la magnitud de la misma - (RRE). Generalmente se acepta que una RRE menor al 4% es aceptable.

Otros índices de la Precisión de un RIA son:

a) Variación intranálisis: Mide la reproducibilidad de la medición de una misma muestra a lo largo de un RIA (102). Se acepta que muestras con coeficientes de variación mayores al 10% - sean rechazadas.

b) Variación intranálisis: Mide la reproducibilidad en la medición de una misma muestra através de diferentes análisis. Este es el parámetro más importante en el Control de Calidad de un RIA y se recomienda que cuando un grupo de muestras de control se encuentre fuera de 3 desviaciones estándar ó 2 grupos fuera de 2 DE ó 3 grupos fuera de 1 DE, el análisis sea rechazado.

En lo que a la Exactitud se refiere, deben mencionarse los factores que confieren un alto grado de confianza a los análisis. Estos son:

- Alta especificidad del antisuero.
- Disminución de sobre y subestimaciones de la cantidad de radiactividad mediante el uso de muestras "blanco".
- Corrección del error causado por el uso del estándar interno.
- Eliminación de sesgos personales e interpersonales.
- El uso de pruebas de Exactitud en el Control de Calidad(15).
Un buen ejemplo de estas pruebas es el uso de Curvas de Paralelismo.

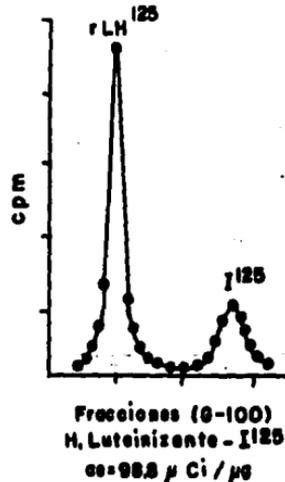
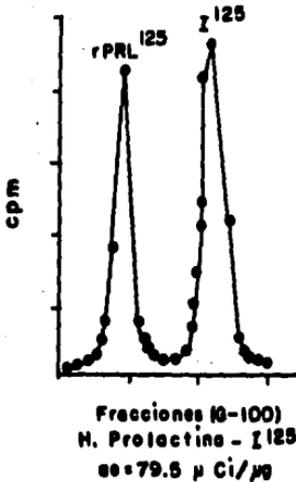
VII.2 CONTROL DE CALIDAD.

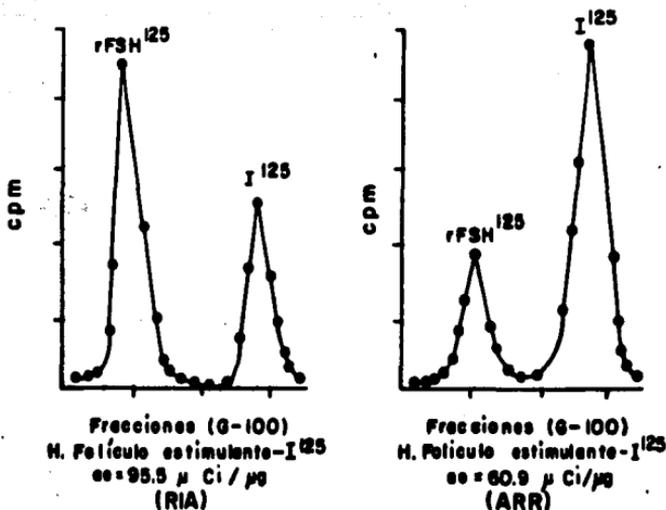
La Precisión y la Exactitud pueden deteriorarse debido a varias condiciones, disminuyendo la confiabilidad de los análisis. Por esta razón, siempre se debe desarrollar un buen sistema de Control de Calidad en cualquier laboratorio. Este sistema debe incluir revisiones periódicas de los parámetros de la curva estándar, determinación de los coeficientes de variación intra e interanálisis y, mediciones frecuentes del "blanco". Las pruebas de paralelismo se deberán también hacer con relativa frecuencia y son mandatorias cuando se cambian las condiciones de RIA.

RESULTADOS .

Las determinaciones informadas en ésta sección, se validaron de acuerdo a lineamientos preestablecidos, como se mencionó en las acápites correspondientes. Todos los análisis tuvieron características de Precisión y Exactitud estadísticamente aceptables. De todas maneras, si se desea revisar en detalle la metodología y/o la evaluación respectiva, se refiere al lector a los Anexos incluidos al final de esta Tesis.

Puesto que dentro de los procedimientos empleados para los radioinmunoanálisis se incluyeron Yodaciones específicas, a continuación se muestran ejemplos representativos de las mismas:





Como se puede apreciar, las yodaciones realizadas por el método de la Cloramina T, fueron similares. Sin embargo, cabe anotar, que en aquella realizada para ARR de FSH, la hormona tuvo una actividad específica apreciablemente menor, producto de las modificaciones introducidas, y que se describieron en la Sección de Material y Métodos.

A continuación, se encuentran detallados los resultados de los análisis realizados en los grupos de animales inmaduros (15 días) y adultos (60 días), a los 30 días posteriores al trasplante de Hipófisis a la capsula renal. Los mencionados estudios se informan categorizándolos en 2 tipos de valores: En primer término se describen las concentraciones hormonales en suero y en tejido testicular. Luego se incluye un grupo misceláneo de determinaciones, entre las que se cuentan los análisis del Radio-Receptor para FSH en testículo, los de ABP en epidídimo y los pesos testicular y epididimario.

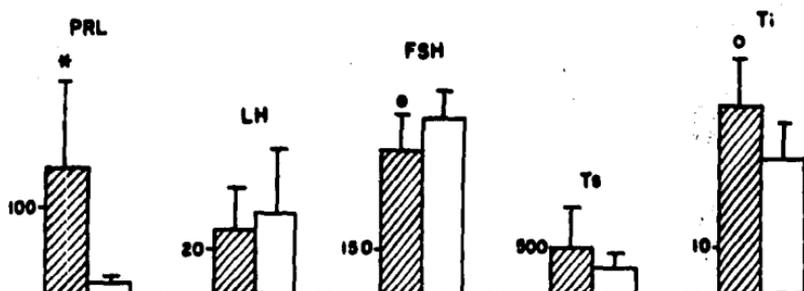
I. RESULTADOS EN EL GRUPO No. 1

Este grupo corresponde a animales que recibieron los trasplantes de Hipófisis a los 15 días de edad. Estuvo compuesto por 19 experimentales y 13 controles. En el suero de estos animales se encontraron asociadas: hiperprolactinemia, concentraciones normales de LH, ligera supresión de FSH, y tendencia a la elevación de las concentraciones de Testosterona. Además, el contenido intratesticular de Testosterona estuvo elevado. Todos estos valores están considerados en relación a los controles respectivos. Los valores y gráficos correspondientes se encuentran a continuación:

a) Valores Hormonales.-

<u>Hormona</u>	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Prolactina (ng/ml)	145.2 \pm 98.7	13.1 \pm 6.7	p < .001
Luteinizante (ng/ml)	29.3 \pm 19.4	37.6 \pm 28.9	N.S.
Estimulante del Folículo	482.2 \pm 119.4	590.1 \pm 99.9	p < .025
Testosterona (pg/ml)	526.8 \pm 426.6	299 \pm 150	N.S.
Test. Intr. (ng/g)	42.2 \pm 10.7	30.6 \pm 8.4	p < .005

La expresión gráfica de estos valores es:



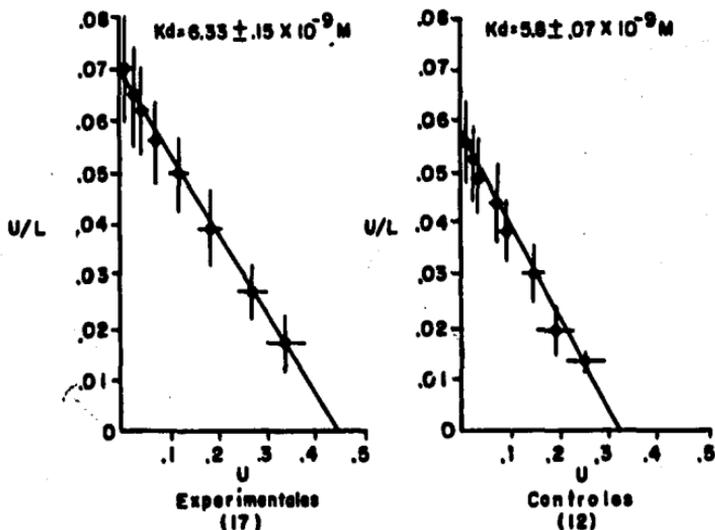
b) Análisis de Radio-Receptor para FSH.-

El número de Sitios de Unión (NSU) y las características físico-químicas de la interacción de FSH con su receptor, no se encontraron alterados.

Los resultados de estos análisis se calcularon con el método de Scatchard. Las proteínas se midieron por el método de Lowry. (69). Los valores encontrados son:

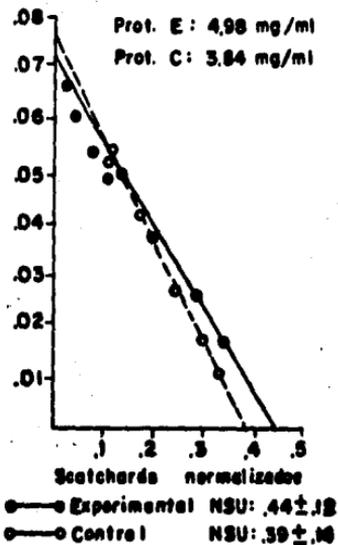
	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
NSU-FSH ($\times 10^{13}$ mol. mg.prot. ⁻¹)	0.44 \pm .12	0.39 \pm .14	N.S.
Const. de disociación ($\times 10^{-9}$ Molar)	6.33 \pm .15	5.8 \pm .07	N.S.

ARR-FSH

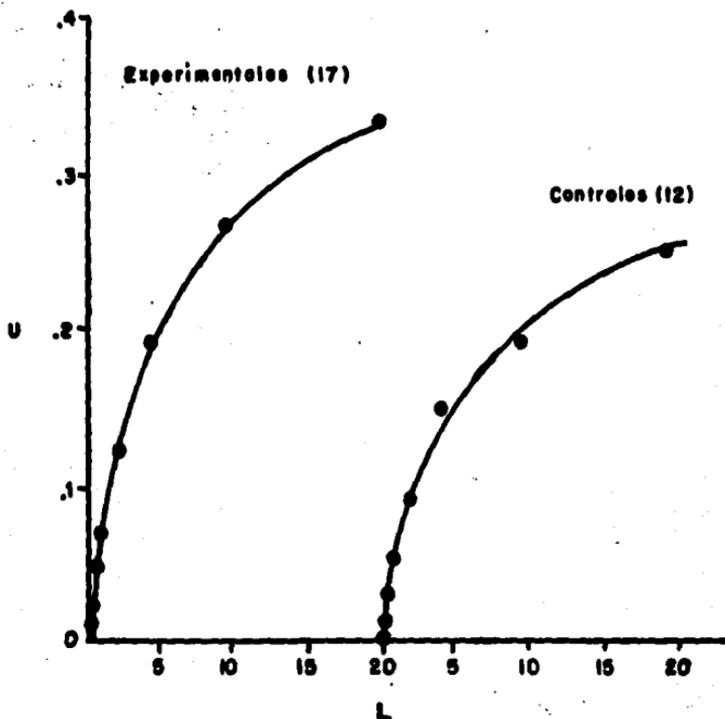


En esta figura se muestran los gráficos Scatchard correspondientes a los valores obtenidos, Se incluyen las desviaciones estándar de cada uno de los puntos.

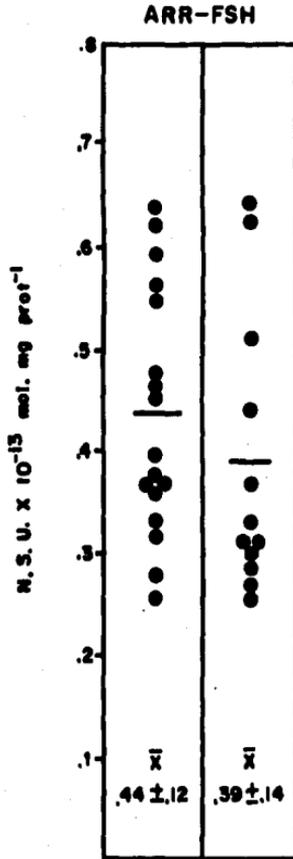
A continuación, se ve la imagen obtenida cuando se normalizaron los datos. Para el efecto, se determinó el contenido proteínico de las muestras. En el grupo experimental se encontró un promedio de 4.98 mg/ml y en el grupo control un promedio de 3.84 mg/ml.



A partir de los respectivos valores, se elaboraron las siguientes curvas de saturación:



Todos estos estudios se pueden sumarizar gráficamente de la siguiente manera:



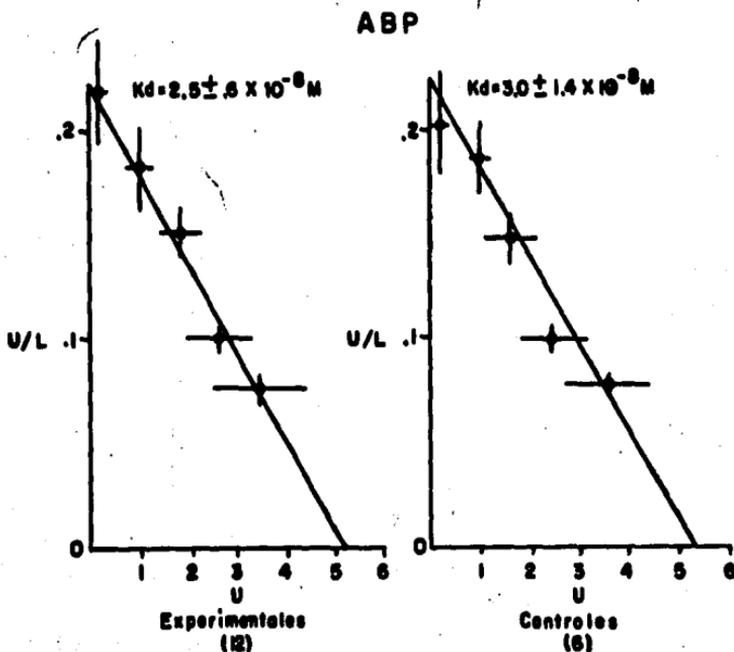
c) Determinación del contenido de ABP en citosoles epididimarios.-

Tanto el Número de Sitios de Unión (NSU), que nos indica el contenido de ABP, cuanto las características físico-químicas de la interacción de 5-DHT con la proteína en mención, no registraron cambios.

Los resultados de estos análisis se calcularon con el método de Scatchard. El contenido proteínico se estimó con el método de Lowry. Los valores encontrados son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
ABP (pm.mg.prot ⁻¹)	2.3 ± 0.9	2.5 ± 1.2	N.S.
Constante de disociación (x10 ⁻⁸ Molar)	2.5 ± 0.6	3.0 ± 1.4	N.S.

Los gráficos que corresponden a estas determinaciones son:

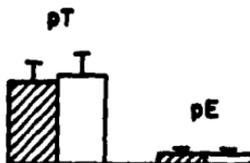


d) Pesos Testicular y Epididimario.-

No se registran cambios en estos parámetros. Los valores son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Peso Testicular (g)	1.63 \pm .36	1.77 \pm .36	N.S.
Peso Epididimario (g)	0.25 \pm .06	0.26 \pm .04	N.S.

Los gráficos correspondientes son:



En este conjunto de valores misceláneos, no se encontraron variaciones en el Número de Sitios de Unión y las características físico-químicas de la interacción entre FSH y sus receptores a nivel testicular. El contenido de ABP y las características de su interacción con 5 α DHT, así como los pesos testicular y epididimario tampoco mostraron modificaciones entre experimentales y -- controles.

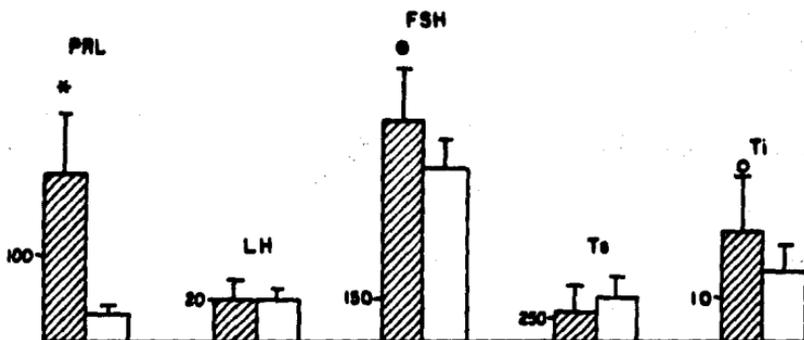
II. RESULTADOS EN EL GRUPO No. 2.

Este grupo corresponde a animales que recibieron los trasplantes de Hipófisis a los 15 días de edad. Estuvo compuesto por 18 Experimentales y 12 Controles. En el suero de estos animales se encontraron asociadas: hiperprolactinemia y concentraciones normales de LH y Testosterona, además de una ligera elevación de las concentraciones de FSH. El contenido intratesticular de Testosterona estuvo elevado. Todos estos datos están considerados en relación a los controles respectivos. Los valores y gráficas correspondientes, se encuentran a continuación:

a) Valores hormonales en el Grupo No.2:

<u>Hormona</u>	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Prolactina (ng/ml)	188 ± 64.9	32.4±6.4	p < 0.001
Luteinizante (ng/ml)	19.9 ± 7.7	18.5±5.2	N.S.
Estimulante del Folículo (ng/ml)	731 ± 178.7	574±99.5	p < .01
Testosterona (pg/ml)	336.7 ± 270.4	503±218.9	N.S.
Test. Intr. (ng/g)	24.3 ± 11.5	15.5±5.31	p < 0.05

La expresión gráfica de estos datos es:



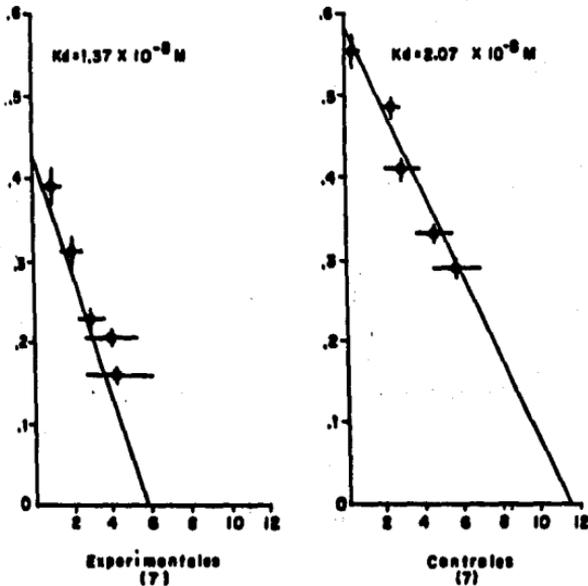
b) Determinación del contenido de ABP en citosoles epididimarios.-

En este grupo en particular, el contenido de ABP en los animales experimentales, se encontró disminuido en relación a sus respectivos controles. Las características físico-químicas de la interacción entre ABP y 5-DHT, no mostraron variaciones. Este es un efecto que se encontró previamente en varios experimentos realizados en nuestro Laboratorio. Sin embargo, en el Grupo No1, idéntico al presente, no se reprodujo el fenómeno. Los valores respectivos son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
ABP (pm.mg.prot ⁻¹)	3.97	10	
Constante de disociación (x10 ⁻⁸ M)	1.37	2.07	

Los gráficos "Scatchard" correspondientes son:

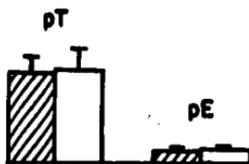
ABP



c) Peso Testicular y Epididimario.-

El peso testicular permaneció inalterado, mientras el peso epididimario del grupo experimental, estuvo ligeramente bajo. Los valores y gráficos respectivos son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Peso Testicular(g)	1.85 \pm 0.25	1.92 \pm 0.35	N.S.
Peso epididimario(g)	0.32 \pm .05	0.36 \pm 0.4	p < 0.05



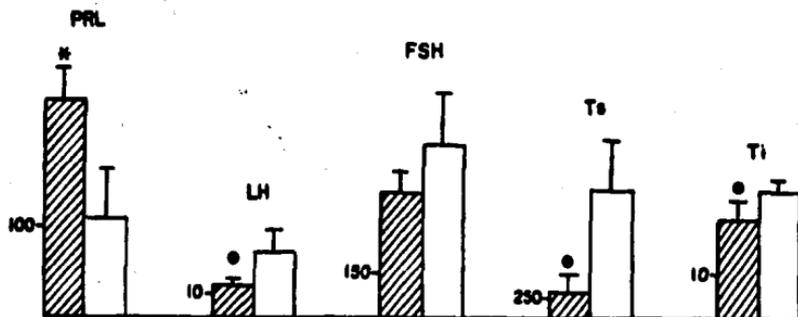
III. RESULTADOS EN EL GRUPO No.3.

Este grupo corresponde a animales que recibieron el trasplante de Hipófisis a los 60 días de edad. En el suero de estos animales se encontraron asociadas: Hiperprolactinemia, concentraciones bajas de Hormona Luteinizante, normales de Hormona Estimulante del Folículo y bajas de Testosterona. El contenido intratesticular de este esteroide también estuvo disminuido. Todos los datos están considerados en relación a los controles correspondientes. Los valores se encuentran a continuación:

a) Valores hormonales en el Grupo No.3 .-

Hormona	Experimental	Control	Estadística
Prolactina (ng/ml)	246.2 ± 35.5	115 ± 54.9	p < 0.001
Luteinizante (ng/ml)	14.9 ± 2.8	31.52 ± 11.7	p < 0.025
Estimulante del Folículo (ng/ml)	432.8 ± 69.9	590.9 ± 174.9	N.S.
Testosterona (pg/ml)	317.3 ± 209.8	475.2 ± 546.6	p < 0.025
Test. Intr. (ng/g)	32.9 ± 3.9	39.1 ± 2.1	p < 0.025

La expresión gráfica de estas determinaciones :

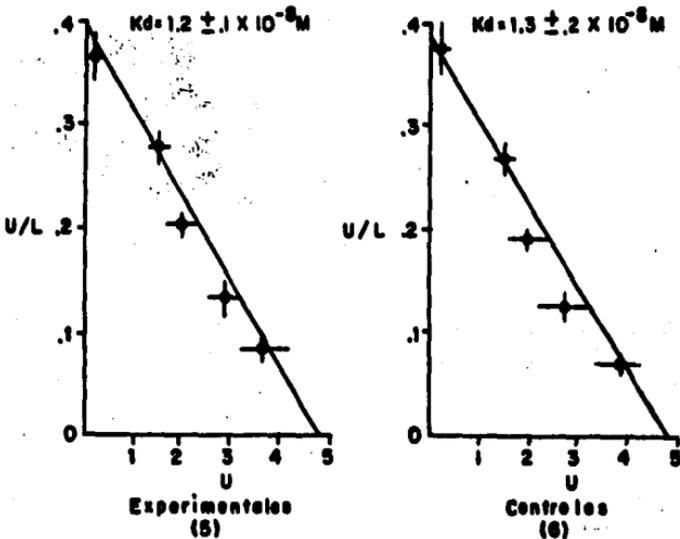


b) Contenido de ABP en citosoles epididimarios.-

Tanto el contenido, cuanto las características físico-químicas de la interacción entre ABP y 5- α -DHT, se encontraron inalterados. Los valores y gráficas correspondientes son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
ABP (pm.mg.prot ⁻¹)	2.72 \pm 0.7	3.6 \pm 0.3	N.S
Constante de disociación ($\times 10^{-8}$ Molar)	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	N.S

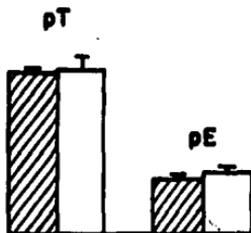
ABP



c) Peso Testicular y Epididimario.-

No se pudieron advertir variaciones en estos parámetros. Los valores son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Peso testicular(g)	3.21 \pm .07	3.23 \pm .3	N.S.
Peso epididimario(g)	1.1 \pm .06	1.2 \pm .1	N.S.



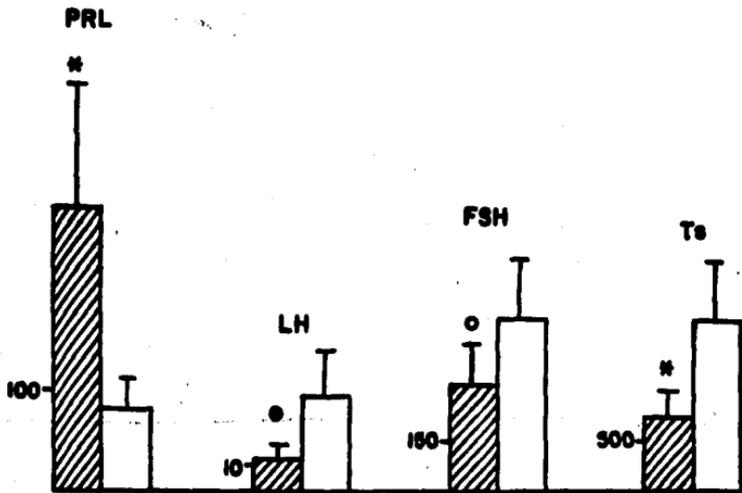
En este grupo de valores miscelaneos, no se advierten cambios en los pesos testicular y epididimario. Tampoco se notan diferencias en el contenido de ABP epididimario, ni en las constantes fisico-químicas de su unión a 5-DHT

IV. RESULTADOS EN EL GRUPO No. 4.

Este grupo corresponde a animales que recibieron el trasplante de Hipófisis a los 60 días de edad. Estuvo compuesto por 7 Experimentales y 7 Controles. En estos animales se encontraron asociados hiperprolactinemia y concentraciones bajas de LH, FSH y Testosterona en suero. Todos estos valores están considerados en relación a los controles respectivos. Los valores y gráficas correspondientes se muestran a continuación:

a) Valores hormonales en el Grupo No.4.-

<u>Hormona</u>	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Prolactina (ng/ml)	275.3 ± 121.3	80.9 ± 27.5	p < 0.005
Luteinizante (ng/ml)	13.5 ± 4.7	37.1 ± 18.5	p < 0.01
Folículo Estimulante (ng/ml)	308.5 ± 119.8	495 ± 166.9	p < 0.025
Testosterona (pg/ml)	731.7 ± 240.9	1644.6 ± 574.9	p < 0.005

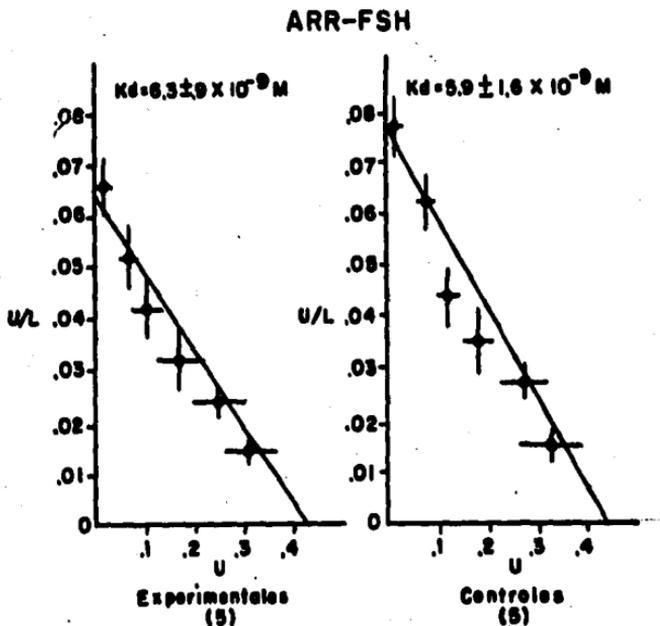


b) Análisis del Radio-Receptor para FSH.-

En este grupo de animales de 60 días al tiempo del trasplante, no se pudieron advertir variaciones de significación estadística, ni en el Número de Sitios de Unión, ni en las características físico-químicas de la interacción entre FSH y sus receptores. Los valores respectivos son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
NSU-FSH($\times 10^{-13}$ mol.mg. prot $^{-1}$).	.23 \pm .06	.24 \pm 0.4	N.S.
Constante de disociación ($\times 10^{-9}$ Molar)	6.3 \pm .93	5.9 \pm 1.6	N.S.

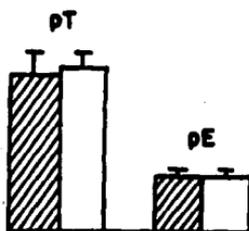
Los gráficos correspondientes son:



c) Pesos testicular y epididimario.-

No se pudieron detectar cambios en estos parámetros. Los valores y gráficos correspondientes son:

	<u>Experimental</u>	<u>Control</u>	<u>Estadística</u>
Peso testicular (g)	3.1 \pm .34	3.2 \pm .3	N.S.
Peso epididimario (g)	1.1 \pm .1	1.1 \pm .1	N.S.



En este grupo de valores misceláneos, no se advierten cambios en los pesos testicular ni epididimario. El Número de Sitios de Unión y las características físico-químicas de la interacción de FSH con sus receptores, tampoco se encuentran alterados.

D I S C U S I O N .

Como se estableció a su inicio, esta Tesis tuvo como objetivo principal, el sumarizar un grupo de estudios enfocados a analizar las influencias que tiene la hiperprolactinemia sobre algunos de los parámetros funcionales del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, a través del proceso de la maduración sexual. Artificialmente se dividió la materia en acápite, en los que se trataron particularmente los aspectos específicos del tema. De manera similar, en este abordaje crítico se ubican las discusiones respectivas, clasificadas en unidades correspondientes a las que se presentaron en la Sección de Resultados.

I. YODACIONES.

La incorporación del elemento radiactivo Yodo¹²⁵ a las diferentes hormonas proteínicas, fué un procedimiento confiable y reproducible, bajo las condiciones en las que se realizó. El método empleado (Cloramina T), tiene las ventajas inherentes a un sistema que se viene aplicando desde 1962, y se obtuvieron resultados óptimos cuando se lo utilizó.

Merece especial mención la yodación de la Hormona Estimulante del Folículo, utilizada para los análisis de Radio-Receptor en membranas testiculares. En efecto, utilizando el método de Findley y Steinberger (32), al cual se le introdujeron ligeras modificaciones, se obtuvo un ligando radiactivo con una actividad específica muy apropiada para el estudio requerido, de rápida obtención, fácil manejo y que contribuyó substancialmente a la consecución de ensayos precisos, sensitivos, y reproducibles.

II. HORMONAS PROTEINICAS.

II.1 HORMONA PROLACTINA.

En los cuatro grupos experimentales presentados, se encontraron concentraciones elevadas de Prolactina, en comparación a los grupos controles respectivos. Este es un efecto esperado del uso del modelo escogido (28,73,77). Se tiene la ventaja adicional de que, el tipo de hiperprolactinemia obtenido por medio del trasplante de hipófisis de animales de la misma colonia, está logrado a base de una molécula teóricamente idéntica a la del recipiente del implante, evitando así, la posibilidad de que aparezcan pequeñas diferencias derivadas del empleo de hormonas heterólogas.

II.2 HORMONA LUTEINIZANTE.

En los grupos experimentales aquí reportados, se describe la presencia de un efecto diferencial dependiente de la edad en la que se instala la hiperprolactinemia. Cuando el trasplante de glándulas hipofisarias se efectúa en animales inmaduros, se ve que las elevadas concentraciones de Prolactina no parecen influenciar los niveles de LH, puesto que estos no registran cambios de significación. Por el contrario, en animales adultos, se observa la asociación de hiperprolactinemia y concentraciones bajas de la Hormona Luteinizante. Estos hechos al parecer contradictorios, estarían enfatizando la existencia de diferentes estadios de maduración de los mecanismos de control de la Gonadotropina en mención. Este tipo de efectos han sido ya descritos con anterioridad (44), y existen varias postulaciones que orientan hacia la convicción de que el Sistema Opióide actúa de diferente forma de acuerdo a la edad y al estado endocrinológico del modelo estudiado (12,40,72,91.) Por otro lado, la interrelación entre el Sistema Opióide y el Sistema Dopaminérgico esta bien establecida (31,39,92,119), y favorece la creencia de que el estadio de maduración sexual con todo su espectro de cambios endocrinológicos

y diferentes niveles hormonales, refleja diferencias sutiles pero determinantes en el control de las Gonadotropinas. Apoyando este concepto se encuentran varios estudios, como aquel en el que se demuestran diferencias determinadas por la edad en la respuesta hipotalámica a la orquidectomía(12).

II.3 HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO.

En los hallazgos descritos en esta Tesis, se aprecia una supresión ligera de los niveles de FSH en asociación con hiperprolactinemia, con excepción de un grupo en el que se advierte el efecto contrario, similar al informado por Bartke y --- otros (6,64,121).

III. HORMONAS ESTEROIDES.

III.1 TESTOSTERONA EN SUERO E INTRATESTICULAR.

Los valores de estas hormonas se describen conjuntamente - porque aparentemente se correlacionan de manera muy cercana - en los grupos experimentales estudiados.

En la evaluación de estos índices se advierte una vez más, un efecto diferencial que depende de la edad en la que se ingtala la hiperprolactinemia. Mientras en los grupos en edad inmadura, existe una marcada tendencia hacia efectos tróficos - positivos sobre la célula de Leydig, en los grupos en edad -- adulta parecen existir cambios opuestos, esto es, disminución de las concentraciones circulantes e intratesticulares de Testosterona.

Es muy probable que el efecto trófico positivo en los animales inmaduros, refleje el sinergismo descrito para Prolactina y Hormona Luteinizante sobre la célula de Leydig en este - grupo etario. En efecto, se han descrito incrementos en el -

número de sitios de unión para LH/HCG en presencia de hiperprolactinemia (7,8), a más de otras acciones en las cuales se advierte un efecto cooperativo de los péptidos en mención (3, 4, 45). Es importante anotar que en estos grupos no se registraron diferencias en los niveles circulantes de la Hormona Luteinizante.

Cuando se analizaron los grupos 3 y 4, correspondientes a los animales adultos, se advirtió que existían concentraciones bajas de Testosterona, tanto en suero cuanto en tejido testicular. Estos resultados, claramente diferentes a los observados en animales inmaduros, pueden ser explicados considerando dos factores:

a) Las concentraciones circulantes de la Hormona Luteinizante en estos animales, estuvieron deprimidas. Este factor refleja una falta de estimulación central sobre la célula de Leydig, y una subsecuente disminución de los esteroides gonadales en este grupo etario.

b) La probable respuesta testicular, cualitativamente diferente y dependiente de la edad a la que se instala la hiperprolactinemia. Al respecto, Morris y Saxena (81), demostraron en un experimento agudo, en el cual administraron varias dosis de Prolactina heteróloga a ratas, que el número de sitios de unión para LH/hCG se incrementa en edades inmaduras y disminuye en edades adultas.

Los valores de Testosterona circulantes e intratesticulares informados en nuestros experimentos, subrayan de buena manera el concepto de que existen diferentes respuestas a la hiperprolactinemia, de acuerdo a la edad y al estado endocrínico del modelo estudiado.

IV. RECEPTORES PARA FSH EN MEMBRANAS TESTICULARES.

IV.1 ARR-FSH EN MEMBRANAS TESTICULARES.

Se había observado con anterioridad, que la hiperprolactinemia no afectaba el número de sitios de unión para la Hormona Folículo Estimulante a nivel de la membrana testicular (81). Sin embargo, el experimento referido fué realizado durante -- una exposición de solo dos días a la Hormona Prolactina. Por esta razón, sumada a experiencias de nuestro grupo, en las -- cuales se encontraron niveles bajos de una de las proteínas inducidas por FSH en condiciones de hiperprolactinemia, se decidió estudiar la interacción mencionada. No se encontraron diferencias en el Número de Receptores ni en las características físico-químicas de la Unión en ninguno de los grupos estudiados.

V. ABP EN TEJIDO EPIDIDIMARIO.

V.1 DETERMINACION DE ABP EN CITOSOLES EPIDIDIMARIOS.

La convicción de que en estudios previos se habían encontrado niveles bajos de ABP en presencia de hiperprolactinemia, y solo en edades inmaduras, nos indujo a repetir estas determinaciones en los experimentos aquí señalados. Lamentablemente sólo pudimos reproducir este efecto en uno de los grupos, hecho que precluye la emisión de ninguna conclusión al respecto. Sin embargo, y en caso de confirmarse la tendencia a la disminución de ABP en presencia de hiperprolactinemia, se tendría que postular necesariamente la existencia de un defecto postreceptor, puesto que el número de Sitios para FSH y las características físico-químicas de la interacción no registraron cambios.

VI. CONSIDERACIONES FINALES.

VI.1 SUMARIO.

Esta Tesis tuvo como objetivo el presentar el estudio de los efectos que tiene la Hiperprolactinemia sobre algunos de los parámetros de la fisiología de eje Hipotálamo-Hipófisis---Testículo. Dicha evaluación se realizó en 2 estadios del proceso de la maduración sexual.

En esta presentación se incluyeron los resultados de varios análisis realizados, utilizando como modelo experimental a la rata macho hiperprolactinémica. Esta condición se indujo en grupos de animales inmaduros (A) y en grupos de animales adultos (B). Se obtuvieron los siguientes resultados a los 30 días posteriores al procedimiento:

- 1.- En los animales de grupo A se encontraron:
 - Hiperprolactinemia;
 - Concentraciones normales de Hormona Luteinizante;
 - Concentraciones circulantes de Testosterona con tendencia a la elevación y;
 - Concentraciones intratesticulares de Testosterona elevadas.
- 2.- En los animales del grupo B se encontraron:
 - Hiperprolactinemia;
 - Concentraciones bajas de Hormona Luteinizante;
 - Concentraciones circulantes de Testosterona bajas y;
 - Concentraciones intratesticulares de Testosterona bajas.
- 3.- En ninguno de los grupos se registraron cambios en:
 - Peso testicular;
 - Peso epididimario;
 - Número de Sitios de Unión para FSH en membranas testiculares y características físico-químicas de esta interacción.

CONCLUSIONES .

Bajo condiciones de hiperprolactinemia de 30 días de duración, se producen efectos dependientes e independientes de la edad en la que se induce la mencionada condición patológica.

a) Efectos independientes de la edad.- No se producen cambios en los pesos testicular y epididimario, ni en los parámetros que se usaron para medir la unión de la Hormona Estimulante del Folículo a membranas testiculares. Se puntualizan estos datos debido a que existen informes contradictorios en la literatura, respecto a algunos de ellos (4,6,7,30).

b) Cambios dependientes de la Edad.- En animales inmaduros, las concentraciones en suero de la Hormona Luteinizante no se alteran, se presentan efectos tróficos positivos sobre la célula de Leydig y, existe una tendencia a la disminución de los niveles de ABP. En animales adultos, se encuentra una disminución de las concentraciones circulantes de LH, de Testosterona en suero y de Testosterona intratesticular, sin advertirse cambios en los niveles de ABP.

c) Los datos en conjunto, documentan la posibilidad de que la Hormona Prolactina tenga efectos diferentes sobre la fisiología del eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículo, dependiendo de la edad en la que se induzca la hiperprolactinemia.

ANEXO No. 1

RADIOINMUNOANALISIS DE HORMONAS PROTEINICAS

METODOLOGIA Y EVALUACION

- Prolactina (PRL)
- Luteinizante (LH)
- Estimulante del Folículo (FSH)

RADIOINMUNOANALISIS DE LA HORMONA PROLACTINA.

M E T O D O L O G I A .

Yodación.-

La incorporación del I^{125} a los residuos aromáticos, principalmente tirosinas de la molécula de las hormonas proteínicas, se consiguió mediante el empleo del método de la cloramina T (49). El procedimiento consiste en añadir 1m Ci de I^{125} a una alícuota que contenga n microgramos de PRL-I-5, en 50 microlitros de una solución de fosfatos ASB 0.1% pH 7.2, seguidos de la adición de 5 microgramos de cloramina T, disueltos en la misma solución amortiguadora. Luego de 60 segundos de agitación constante a temperatura ambiente, se detuvo la reacción, agregando 50 microgramos de metabisulfito de sodio disueltos en la misma solución.

La separación del producto yodado, del material libre, se hizo en una columna de cromatografía (Bio Rad), de 25 x 0.9 cm, previamente llena con Shepadex G-100, el cual había sido hidratado durante 24 horas y saturado con 2 mililitros de una solución amortiguadora PBS 0.01M ASB al 5% con un pH de 7.2. La elución se hizo con una solución similar pero libre de albumina.

Los productos de yodación y el material radiactivo fueron colectados en 36 tubos de cristal de 7 x 1 cms, que contenían 200-microlitros de una solución de PBS 0.01 M-ASB al 5% y un pH de 7.2. Estos tubos habían sido enfriados previamente a 4°C y en el momento de la recolección estaban sobre hielo. La actividad específica obtenida, tuvo en promedio un valor de 79.5 microcuries por microgramo de hormona radiactiva. Este parámetro se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{Actividad Especifica} \quad ae = \frac{B (D/C)}{A}$$

en donde: A= Masa de la hormona en microgramos;
B= 1000 microcuries;
C= Cuentas totales de I^{125} -Cuentas Residuales;
D= Cuentas totales de protepina yodada.

Posteriormente se prepararían alícuotas que contuvieran una cantidad constante de radiactividad de aproximadamente 20,000 -- cuentas por minuto en 100 ul, y que serían usadas en el radioinmunoanálisis correspondiente. Es válido mencionar que fué a la hormona marcada, previamente disuelta en una solución PBS 0.1M--ASB 0.1% pH 7.2, a la cual se agregó Suero Normal de Conejo (SNC) a una concentración final de 2%.

Preparación del primer anticuerpo Anti-rPRL-S4.-

Se utilizó un anticuerpo específico que actuaba eficientemente a una dilución final de 1:10,000 en el radioinmunoanálisis. Este anticuerpo se reconstituyó a partir de fracciones en las que el antisuero estaba en una dilución 1:500. Estas alícuotas tenían un volumen de 1.5 mililitros, a los cuales se les agregó -- 8.5 mililitros de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M---ASB 0.1% pH 7.2, para obtener una dilución de 1:3,333. De esta solución reconstituida, se tomaron 100 microlitros, los cuales -- se emplearon para cada tubo del RIA.

Preparación del Estándar No Radiactivo.-

Se utilizó un estándar internacional de reconocida pureza: -- NIADKK PRL-Rp-3, el cual se disolvió en una solución amortiguadora de fosfatos PBS 0.1M 0.1%, ASB, pH 7.2 y se diseñó para obtener cantidades crecientes que fueron de 0.15625 hasta 20 nanogramos por 100 ul.

Preparación del segundo Anticuerpo.-

Se realizó siguiendo el proceso detallado en la sección de Material y Métodos. Se utilizaron 100 ul, por tubo de este reactivo a una dilución inicial 1:10, en Solución PBS 0.1M-ASB 0.1% pH 7.2 .

Procedimiento del Ensayo.-

El procedimiento del inmunoanálisis fué el siguiente:

a) Se incubaron en tubos de 7 x 1 cm, 100 ul de hormona radiactiva 2% SNC, con 100 ul del estándar no radiactivo ó 100 ul de la muestra problema y con 100 ul del primer anticuerpo (anticuerpo específico). Luego de agitación en vortex, se incubó la reacción por 24 horas.

b) Luego de la incubación mencionada se agregaron 100 ul del segundo anticuerpo a cada uno de los tubos. Se incubaron por 6 horas adicionales, al cabo de las cuales se detuvo la reacción añadiendo 1 mililitro de agua destilada a 4 °C, a cada uno de los tubos. Inmediatamente se centrifugaron a 3000 RPM por 30 minutos a 2°C. Se decantaron los tubos y se contaron los precipitados en Espectrofotómetro para radiación gamma .

c) Se calcularon los resultados a partir de las cuentas por minuto, obtenidas en una calculadora Hewlett Packard Hp-97. Dichos resultados fueron expresados por interpolación a una curva estándar Logit vs Log, y fueron validados de acuerdo a criterios de control de calidad previamente publicados por nuestro grupo (9).

EVALUACION.

RIA DE PRL EN EL GRUPO NO. 1 (15 días).-

En este radioinmunoanálisis se tuvieron los siguientes índices -
de Control de Calidad:

Valor de F	1.0324
Valor S y.x.	0.3259
Coefficiente de correlación	0.0566
Intercepto al origen	1.0980
Pendiente	2.1241
Relación respuesta-error	3.5689
Sensibilidad del ensayo +2 DE	2.2223 (ng/ml)
Coefficiente de variación in- tranálisis	15.979
Coefficiente de variación in- tranálisis corregido	9.22

El perfil de precisión de la curva estándar fué:

<u>Dosis (ng/tubo)</u>	<u>Coefficiente de Variación</u>
.3125	41.475
.625	24.567
1.25	14.428
2.5	10.146
5.0	8.115
10.0	6.818
20.0	6.523

Comentario: En este análisis el coeficiente de variación intra-análisis aparece elevado debido a las dosis muy pequeñas introducidas al inicio, sin embargo, el promedio de los Logits de las muestras es de: 0.3442 ± 1.11 , el mismo que está en un rango -- óptimo de la curva estándar.

Aún más, dicho promedio y su desviación están completamente - dentro de los límites aceptables para un RIA (+2; -2), puesto - que sus valores se encontrarían entre -0.7621 y +1.4505.

En cuanto a las determinaciones de PRL, se obtuvieron los siguientes valores:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
PRL (ng/ml)	145.2 \pm 98.7	13.1 \pm 6.7

RIA DE PRL EN EL GRUPO No. 2 (15 días):

Valor de F	0.1619
Valor S y.x.	0.4604
Coefficiente de correlación	0.9282
Intercepto al origen	1.4741
Pendiente	-2.3092
Relación respuesta-error	3.2156
Sensibilidad del ensayo +2 DE	3.2551
Coefficiente de variación intranálisis	17.65
Coefficiente de variación intranálisis corregido	9.004

El perfil de precisión de la curva estándar fué:

.3125	51.5028
.6250	28.0997
1.2500	15.5800
2.5000	9.9731
5.0000	7.3080
10.0000	5.8080
20.0000	5.2932

Comentario: El coeficiente de variación intranálisis está ligeramente elevado, como en el caso del RIA anterior, sin embargo, --

los Logits de las muestra tiene un promedio de -0.4282 ± 0.7934 , en un rango completamente aceptable (-2; +2), puesto que van de -1.2216 a +0.3652. El C.V. corregido es de 9.004.

En cuanto a las determinaciones de Prolactina, se obtuvieron los siguientes valores en esta grupo:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Prolactina (ng/ml)	188 ± 64.9	32.2 ± 6.4

RIA DE PRL EN EL GRUPO No. 3 (60 días).-

Los parámetros de Control de Calidad de este ensayo, son los mismos que los del RIA anterior, pues se procesaron las muestras conjuntamente. La diferencia existente, correspondiente a los Logits de las muestras (promedio: -0.4061 ± 0.7367) los ubica en un rango de -1.2528 a +0.3306, completamente dentro de límites aceptables (-2; +2).

Las determinaciones de Prolactina en este grupo fueron:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Prolactina (ng/ml)	275.3 ± 121.3	80.9 ± 27.5

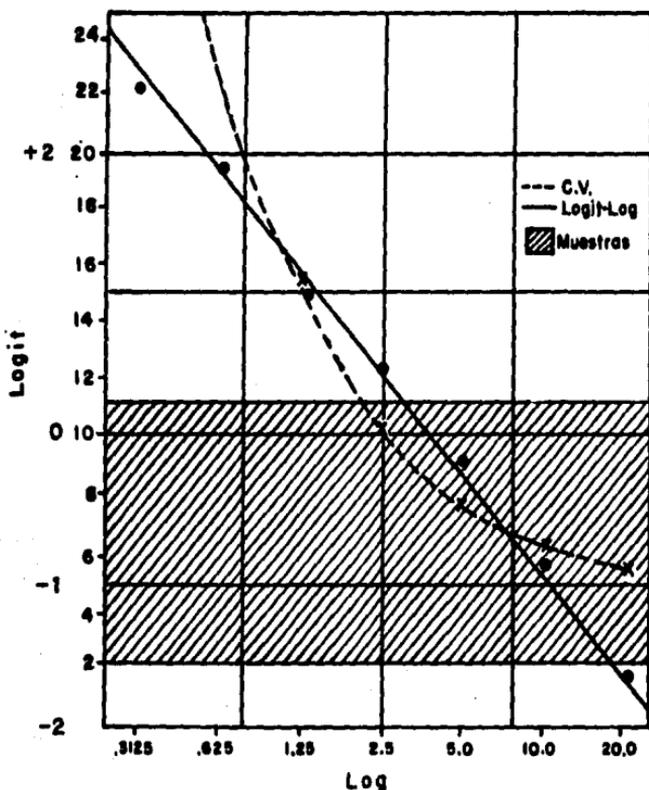
Comentario: Considero que será de utilidad, el graficar el perfil de precisión promedio, conjuntamente con la linearización de la curva dosis respuesta. En esta gráfica se encuentra interpolado el rango en el que se hallaron las muestras, cuyos Logits son los siguientes:

Grupo 1	$+ 0.3442 \pm 1.1063$	-0.7621 a $+1.4505$
Grupo 2	$- 0.4282 \pm 0.7934$	-1.2216 a $+0.3652$
Grupo 3	$- 0.4061 \pm 0.7367$	-1.1428 a $+0.3306$
Grupo 4	$- 0.6272 \pm 0.8430$	-1.4702 a $+0.5906$
Promedio	$- 0.2703 \pm 0.8699$	-1.1492 a $+0.5906$
	$(+ 0.4274$ ($+ 0.1635$))	

y con los siguientes coeficientes de variación y Logits promedio:

<u>Dosis (ng/tubo)</u>	<u>CV</u>	<u>Logit X</u>
.3125	46.48	2.4155
.6250	26.33	1.8994
1.2500	15.03	0.9872
2.5000	10.06	0.4219
5.0000	7.71	-0.1751
10.0000	6.31	-0.9163
20.0000	5.91	-1.6946

Este perfil nos daría un coeficiente de variación intranálisis - de 16.8, pero con una DE de 14.89. La gráfica resultante, en la que se ha incluido el rango en el que se encontraban las muestras es:



Vemos en la figura, que las muestras se ubican en un área que -- está dentro de los coeficientes de variación correspondientes a la dosis de 1.25 y 20. Esto nos da una estimación del C.V. corregido de 9.004.

RADIOINMUNOANÁLISIS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE.

Los procedimientos utilizados para el radioinmunoanálisis de la Hormona Luteinizante, como los de las demás hormonas de naturaleza proteínica, son de características muy similares. Partiendo de este criterio y habiéndose descrito muy detalladamente en la sección anterior el radioinmunoanálisis de la Hormona Prolactina, en esta sección se presenta la misma secuencia descriptiva, pero sintetizándola y enfatizando los detalles que particularizan al radioinmunoanálisis de la Hormona Luteinizante.

Yodación.-

Se emplearon 5 microgramos de Hormona Luteinizante LH I-5, disueltos en 50 microlitros de PBS 0.1M, pH 7.2., a los cuales se les agregó 1 m Ci de I^{125} . Se inició la reacción por medio de la adición de 50 microgramos de cloramina T, y luego de agitación constante por 30 segundos, se detuvo la reacción de oxidación con la adición de 50 microgramos de Metabisulfito de Sodio-- obteniéndose una actividad específica de aproximadamente 98.8 -- microcuries por microgramo de hormona.

Preparación del primer anticuerpo (anti rLH-S8).-

Este anticuerpo viene en una dilución inicial de 1:18.75, y óptimamente trabaja a una dilución 1:180,000. Se prepararon -- alícuotas de 500 ul, con una dilución 1:120 a partir de la solución inicial. Estas fracciones se aforaron a 10 mililitros, -- previo a su uso en el análisis. Debe anotarse que se emplearon 100 ul de este reactivo para cada tubo.

Preparación del Estándar No Radiactivo.-

Se utilizó el estándar NIAMDD LH Rp-1 y se diseñó la curva estándar con cantidades crecientes que partían de 1.5625 y ascendían hasta 100 ng/100 ul.

Preparación del segundo anticuerpo.-

Ya ha sido explicada con anterioridad en secciones precedentes. Se utilizaron 100 microlitros por tubo de este reactivo, el cual había sido previamente aforado a una dilución inicial de 1:10.

Procedimiento del análisis.-

Luego de preparar la hormona marcada (con 12,000 cpm y -2% de SNC), se agregaron 100 ul de esta solución a 200 ul de estándar/6 muestra más 100 ul del anticuerpo específico anti rLH-S8. A continuación, se incubó la reacción por 24 horas, al cabo de las cuales se añadieron 100 ul de una dilución 1:20 del 2do. anticuerpo. Luego de 6 horas adicionales de incubación se detuvo la reacción por medio de la adición de 1 ml de agua fría por espécimen.- Se centrifugaron los tubos, se decantaron y se contó la radiactividad asociada a los precipitados. Se estimaron los resultados de manera similar a la descrita para la Hormona Prolactina.

EVALUACION .

RIA DE LH EN EL GRUPO No.1 (15 días).-

En este radioinmunoanálisis los índices de Control de Calidad no fueron de óptima calidad. Ellos son:

Valor de F	1.7456
Valor S y.x.	0.5383
Coefficiente de correlación	0.9201
Intercepto al origen	3.1324
Pendiente	-2.8779
Relación respuesta-error	4.2932
Sensibilidad del ensayo +2 DE 20 ng/ml	
Coefficiente de variación in- tranálisis	12.2857

Los Logits de las muestra tuvieron un promedio de 1.3391 ± 1.4409 , lo que los ubica en un rango de -0.1018 a $+2.78$. En este caso, vemos que el límite superior está fuera del límite establecido (-2 ; $+2$).

Los datos que se obtuvieron y que se tomarán en cuenta con las debidas reservas son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de LH (ng/ml)	29.29 ± 19.35	37.58 ± 28.39

Comentario: En este RIA, se obtuvieron datos que deberían ser - incluidos con cautela. Uno de los factores que influyó negativa mente en las determinaciones fué el bajo contenido de LH en estos animales, puesto que se utilizaron 100 microlitros de muestra por tubo. Luego de este análisis, se estableció que había que - utilizar al menos 200 microlitros de suero por tubo.

RIA DE LH EN EL GRUPO No.2 (15 días).-

Luego de los datos de RIA anterior, se diseñó un ensayo con - un volúmen final de incubación de 400 microlitros, en los cuales se incluyen 200 microlitros de muestra. Los parámetros de Control de Calidad fueron:

Valor de F	0.6834
Valor Sy.x.	0.6375
Coefficiente de correlación	0.8776
Intercepto al origen	3.3528
Pendiente	-2.6121
Relación respuesta-error	1.8918
Sensibilidad del ensayo ± 2 DE	6.1 ng/ml
Coefficiente de variación intranálisis	6.5318

Además de la mejoría substancial en casi todos los parámetros de control de la curva, los Logits de las muestras tuvieron un promedio de 1.9737 ± 0.4438 con un rango de $+ 1.5299$ a $+ 2.4175$. Si bien el límite superior de este rango es superior a $+2$, se debe indicar que solo 4 muestras se ubicaron en su cercanía.

Los datos que se obtuvieron fueron:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de LH (ng/ml)	19.86 ± 7.8	18.46 ± 5.19

HORMONA LUTEINIZANTE GRUPO No.3 (60 días).-

Los índices de control del ensayo son:

Valor de F	1.8363
Valor de Sy.x.	0.1426
Coefficiente de correlación	0.9894
Intercepto al origen	.6257
Pendiente	-2.1786
Relación respuesta-error	2.2455
Sensibilidad del ensayo +2 DE 3.5 ng/ml	
Coefficiente de variación intra-análisis	7.67

En este ensayo también se utilizaron 200 microlitros de muestra en un volumen de incubación final de 400 microlitros. Como se aprecia, es un análisis muy confiable. Además, los Logits de las muestras tienen un promedio de 1.3578 ± 0.4245 , lo que ubica a los especímenes muy dentro de los límites establecidos ($+2$; -2).

Se obtuvieron los siguientes valores:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de LH (ng/ml)	14.93 ± 2.76	31.52 ± 11.72

HORMONA LUTEINIZANTE GRUPO No. 4 (60 días).-

Estas muestras se analizaron conjuntamente con las del grupo anterior, por ello los índices de control del ensayo son los mismos. Los Logits de la muestras tienen un promedio de 1.2073 ± 0.6515 . Se encuentran en un rango de $+0.5558$ a $+1.8588$.

Los valores obtenidos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de LH (ng/ml)	13.46 ± 4.96	37.1 ± 18.5

RADIOINMUNOANÁLISIS DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE.

Como se ha mencionado previamente, los radioinmunoanálisis de las hormonas proteínicas son similares en diseño, diferenciando los solamente las características inherentes a los reactivos específicos. Sin embargo, en lo que se refiere al RIA de la Hormona Folículo Estimulante, se incluyeron ligeras variaciones tendientes a optimizar el análisis y basados en trabajos previos (12,22, 116).

Yodación.-

Este procedimiento se llevó a cabo mediante una variación del método de la Cloramina T. En primer lugar, todos los reactivos y soluciones fueron enfriados previos al proceso ($0-4^{\circ}\text{C}$). A 25-microlitros de un buffer de fosfatos 0.05M , pH 7.2., conteniendo 2.5 microgramos de FSH I-6, se les agregó 1 milicurie de I^{125} . - Se inició la reacción con la adición de 2.5 microgramos de Cloramina T en 10 microlitros de PBS 0.01M pH 7.4. Luego de 1 minuto de agitación constante en vórtex, se terminó la reacción por la adición de 50 microgramos de metabisulfito de sodio contenido en 50 microlitros de PBS 0.01M , pH 7.4. Los productos de la radio-yodación se separaron en una columna BioRad de 25×0.9 cms, conteniendo Sephadex G-100 previamente saturado con una solución

amortiguadora de fosfatos que contenía ASB al 5%. Se colocaron 40 fracciones de 10 gotas de cada una en tubos de 7 x 1 cm, con 200 microlitros de PBS 0.01M con ASB al 5% pH 7.4. La actividad específica obtenida fué de aproximadamente 95.5 microcuries por-microgramo de hormona.

Preparación de primer anticuerpo (anti-rFSH-S11).-

Este anticuerpo trabaja óptimamente a una dilución final de 90,000. Este reactivo se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M con EDTA y se agregaron 200 ul a cada tubo en el RIA.

Preparación del Estándar No Radiactivo (FSH Rp-1).-

Se dispuso para los análisis del estándar FSH Rp-1, el cual se disolvió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M con gelatina al 0.1% pH 7.4. Se diseñó una curva estándar con cantidades crecientes de la hormona, desde 10 hasta 800 nanogramos -- por tubo.

Preparación del segundo anticuerpo.-

La obtención de este reactivo ha sido descrita en las secciones anteriores. Debe indicarse que para este RIA en particular, la dilución inicial del antisuero, fué de 1:20, en PBS 0.05M, -- pH 7.2. Se utilizaron 200 ul por tubo, con un tiempo de incubación mayor que para los otros RIAs de hormonas proteínicas.

Procedimiento del análisis.-

En este radioinmunoanálisis se introducen algunas variantes - como se ha mencionado anteriormente. La razón de estos cambios debe ser atribuida a la búsqueda de una optimización en la sensibilidad y la precisión de los resultados. Se procedió de la siguiente manera:

a) Se incubaron a temperatura ambiente y por un tiempo de 24 horas los siguientes reactivos: 100 ul de FSH radiactiva (aproximadamente 15,000 cpm y SNC al 2%), 100 ul del primer anticuerpo y Hormona no radiactiva (FSH Rp-1), en cantidades crecientes. El

volúmen final de esta primera incubación fué de 600 microlitros.

b) Luego de transcurrido el período indicado, se agragaron 200-
ul del segundo anticuerpo y se incubó por 24 horas adicionales.-
Se detuvo la reacción por la adición de 2 mililitros de PBS 0.05M
pH 7.2 fríos a cada tubo. Inmediatamente se centrifugó el análi-
sis a 3000 rpm por 15 minutos, se decantaron los tubos y se con-
taron en un Espectrofotómetro para radiaciones gamma.

c) Se estimaron los resultados a partir de las cuentas por minu-
to obtenidas, usando la interpolación de dichos datos a una cur-
va estándar Logit-Log como se ha descrito previamente. De igual
manera, la validación de los resultados se hizo de acuerdo a cri-
terios preestablecidos (9).

EVALUACION.

RIA DE FSH EN EL GRUPO No. 1 (15 días).-

Los índices de Control de Calidad del ensayo son:

Valor de F	2.5034
Valor de S y.x.	0.3765
Coefficiente de correlación	0.9571
Intercepto al origen	5.3453
Pendiente	-2.5154
Sensibilidad del ensayo +2 DE	57.32 ng/ml
Coefficiente de variación in- tranálisis	11.02
Coefficiente de variación in- tranálisis corregido	7.4

Los Logits de las muestras tiene un promedio de 0.3271 ± 0.3022 ,
y en un rango de -0.0249 a $+0.6293$, lo que sitúa a estos especí-
menes en una zona ideal de la curva estándar. Los coeficientes-

de variación que corresponderían a estas muestras están considerados a partir de 40 ng. Si consideramos a esta última dosis como límite inferior, tendremos que el coeficiente de variación en análisis corregido es 7.4.

Los datos que se obtuvieron son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de FSH (ng/ml)	482.18 ± 119.36	590.11 ± 99.86

RIA DE FSH EN EL GRUPO No. 2 (15 días).-

Se realizó un RIA conjunto de los grupos 2,3 y 4. Los valores de control del ensayo son:

Valor de F	0.2406
Valor de S y.x.	0.3719
Coefficiente de correlación	0.9444
Intercepto al origen	5.0079
Pendiente	-2.4244
Relación respuesta-error	2.1783
Sensibilidad del ensayo +2 DE	33.1 ng/ml
Coefficiente de variación in-análisis	7.71

El promedio de los Logits de las muestras es de 0.6655 ± ---- 0.2902, el mismo que sitúa los especímenes entre +0.3753 y + 0.9557, en un rango muy apropiado y con coeficientes de variación muy -- aceptables.

Los datos obtenidos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de FSH (ng/ml)	730.98 ± 178.7	547 ± 99.5

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

HORMONARIA DE FSH EN EL GRUPO No. 3 (60 días).-

Los valores de Control de Calidad del análisis son los mismos que los anteriores, pues se hizo un RIA conjunto. El promedio de los Logits de la muestra es: 0.7790 ± 0.3287 , lo que ubica a los mismos en un rango de $+0.4503$ a $+1.1077$. Completamente dentro de los límites establecidos ($=2; -2$).

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de FSH (ng/ml)	432.8 ± 69.9	590.25 ± 174.9

RIA DE FSH EN EL GRUPO No. 4 (60 días).-

Como se ha mencionado, se hizo un RIA conjunto de los grupos 2, 3 y 4, por lo tanto, los parámetros de validación de este análisis ya se encuentran descritos. Adicionalmente, los Logits de las muestras tienen un promedio de 1.1165 ± 0.5411 , y están situados en un rango de $+0.5754$ a $+1.6919$. Los valores que se logran son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de FSH (ng/ml)	308.6 ± 119.8	495 ± 166.9

ANEXO No 2.

METODOLOGIA Y EVALUACION

- Testosterona Sérica (Ts)
- Testosterona Intratesticular (Ti)
- Estradiol (E₂)

RADIOINMUNOANALISIS DE TESTOSTERONA.

M E T O D O L O G I A .

Obtención de la Hormona Radiactiva.-

La hormona radiactiva se adquirió de Amersham (Inglaterra), - tal como se indica en la sección I. Tuvo una actividad específica de 80-100 Ci/mmol y se emplearon alícuotas que contenían ---- aproximadamente 10,000 cpm en cada tubo del análisis.

Preparación del Anticuerpo.-

Este anticuerpo fué provisto por el Match Reagent Program de la O.M.S. Esta reactivo viene en forma liofilizada y se reconstituye en 10 mililitros de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M con gelatina al 0.1% pH 7.3. Se utilizaron 100 microlitros del antisuero por cada tubo de ensayo.

Este anticuerpo fué generado en ovejas, usando testosterona 3 CMO-ASB como antígeno inductor. Se caracteriza por una unión -- cero esperada de 45-64% y la dilución final a la que se usa es - de 1:210,000. Las reacciones cruzadas que tiene este anticuerpo con Cortisol (0.0001%), ⁵Δandrostenediol (2.1%) y ⁴Δandrostenediona (0.8%), no son de relevancia. Aquellas con 5αdehidrotestosterona son del orden del 14% y con ⁵Δandrostenediol del 6% y fueron estimados a partir de las potencias relativas a un B/Bo - de 50%.

Preparación del Estándar No Radiactivo.-

Se utilizó un estándar con el cual se diseñó una curva desde 9.9, hasta 316.8 picogramos por mililitro. El compuesto se suspendió en una solución PBS 0.1M con 0.1% gelatina, pH 7.3 previo a su uso.

Preparación del Método de Separación de las Fases.-

Como se mencionó en la sección correspondiente, se escogió -- como Método de Separación de las Fases, al Sistema de carbón ---

dextrán. La preparación de los reactivos se hizo empleando 625-miligramos de carbón activado Norit-A y 62.5 miligramos de dextrán solución PBS 0.1M con 0.1% gel pH 7.3. Se emplearon 200 microlitros de esta suspensión por cada tubo del análisis.

Procedimiento del análisis.-

El método que aquí se describe es el procedimiento común, usado en nuestro laboratorio para la medición de las hormonas esteroideas en suero. Se realiza de la siguiente manera:

a) Se incuban por 24 horas y a 4°C los siguientes reactivos: -- 500 microlitros de los resuspendidos de las muestras, 100 microlitros de la hormona radiactiva conteniendo 10,000 cpm y 100 microlitros de antisuero.

b) Al cabo del período de incubación se agregan 200 microlitros de la suspensión de carbón dextrán, que fué preparado el día anterior al del ensayo, y se incuba el RIA por 30 minutos a 4°C.

c) Luego de esta incubación, se centrifugan los tubos a 2°C y a 3000 rpm por 15 minutos, se decanta el sobrenadante en viales de cristal, se agregan 5 mililitros de líquido de centelleo por espécimen, se agitan en vórtex por 1 minuto y se dejan reposar -- los recipientes en la obscuridad por lo menos 4 horas.

d) Transcurrido este lapso, se estiman las cpm de los viales en un Espectrofotómetro de centelleo líquido, con un tiempo de conteo de 2 minutos y se calculan los resultados mediante la interpolación de los mismos a una curva estándar Logit vs Log como se ha mencionado anteriormente.

EVALUACION.

RIA DE Ts EN EL GRUPO No. 1 (15 días).-

Los parámetros con los que se validaron este ensayo son:

Valor de F	4.425
Valor Sy.x.	0.0778
Coefficiente de correlación	0.9938
Intercepto al origen	2.6111
Pendiente	-1.8041
Relación respuesta-error	3.0069 pg/ml
Sensibilidad del ensayo +2 DE	6.96
Coefficiente de variación intranálisis	7.7842

A pesar de que el valor de la pendiente está bajo, se ve que los Logits de las muestras son aceptables, lo que sumado a los otros parámetros, hace a este RIA confiable. El promedio de los Logits es de -0.1655 ± 0.7339 , lo que ubica a las muestras practicamente en el centro del rango, entre $-0.8994 + 0.5684$.

RIA DE Ts EN EL GRUPO No. 2 (15 días).-

En este RIA se tuvieron los siguientes valores de control:

Valor de F	0.9769
Valor Sy.x.	0.9952
Coefficiente de correlación	0.9952
Intercepto al origen	2.852
Pendiente	-1.9060
Relación respuesta-error	3.0431
Sensibilidad del ensayo	9.6 pg/ml
Coefficiente de variación intranálisis	8.1

Como se aprecia, los parámetros son excelentes exceptuando a la Pendiente que es muy similar a la del anterior RIA. Por esta razón, se torna imperativo ubicar a los Logits de las muestras, -- los mismos que tiene un promedio de -0.3477 ± 0.7708 y se ubican en un rango de -1.1185 a $+0.4231$, localizado en el centro de los límites $(-2;+2)$. De esta manera, se ve que los resultados obtenidos son muy confiables.

Los datos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de Ts (pg/ml)	336.72 ± 270.4	505 ± 218.9

RIA DE Ts EN EL GRUPO No. 3 (60 días).-

Este es un RIA conjunto de los grupo 3 y 4. Sus parámetros de validación son:

Valor de F	1.5364
Valor Sy.x.	0.2196
Coefficiente de correlación	0.9613
Intercepto al origen	2.8308
Pendiente	-1.9419
Relación respuesta-error	3.3488
Sensibilidad del ensayo	10.8 pg/ml
Coefficiente de variación intranálisis	8.7552

En este análisis cabe la misma acotación hecha a la pendiente. -- Sin embargo, los Logits de las muestras tienen un promedio de -0.9385 ± 0.9067 , lo que ubica a los especímenes en un rango de -1.8452 a -0.0318 .

Los datos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de Ts (pg/ml)	317.34 ± 209.77	1475.2 ± 546.6

RIA DE Ts EN EL GRUPO No. 4 (60 días).-

Por ser un RIA conjunto con el anterior, los parámetros de validación son los mismos. El promedio de los Logits de las muestras es de -1.3762 ± 0.5014 lo que los ubica en un rango de ---- -1.8776 a -0.8748 . Los valores obtenidos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Valor de Ts (pg/ml)	731.7 ± 240.9	1644.6 ± 574.9

TESTOSTERONA INTRATESTICULAR.

En esta sección se reportan los datos en nanogramos/gramo de tejido testicular (ng/g).

RIA DE Ti EN EL GRUPO No. 1 (15 días).-

Los criterios de estudio de este RIA son:

Valor de F	3.3959
Valor Sy.x.	0.1049
Coefficiente de correlación	0.9891
Intercepto al origen	2.6046
Pendiente	-1.8249
Relación respuesta-error	3.0229
Sensibilidad del ensayo	7 pg/ml
Coefficiente de variación intranálisis	7.8

El promedio de Logits de las muestras es de -1.3781 ± 0.3876 , en un rango de -1.7657 a -0.9905 . Los datos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Test. Intratest.	42.2 ± 10.7	30.6 ± 8.4

RIA DE Ti EN EL GRUPO No. 2 (15 días).-

Los parámetros de validación de este RIA son:

Valor de F	2.6150
Valor Sy.x.	0.0913
Coefficiente de correlación	0.9934
Intercepto al origen	3.0762
Pendiente	-2.0535
Relación respuesta-error	3.3455
Sensibilidad del ensayo	13.9 ng/ml
Coefficiente de variación in tránalisis	8.66

Los Logits de las muestra tuvieron un promedio de -0.9363 ± 0.3942 , lo que los ubica en un rango de -1.3305 a -0.5421 .

Los valores así obtenidos son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Test. Intrates. (Ng/g)	24.27 ± 11.5	15.5 ± 5.31

RIA DE Ti EN EL GRUPO No. 3 (60 días).-

Los valores de estudio de este análisis son similares al anterior. Los Logits de las muestras tienen un promedio de -1.5566 ± 0.1143 que los ubica en un rango de -1.6709 y -1.4423 .

Los valores que se obtuvieron son:

	<u>Grupo Experimental</u>	<u>Grupo Control</u>
Test. Intratest.	32.93 ± 3.9	39.1 ± 2.1

RADIOINMUNOANALISIS DE ESTRADIOL.

Obtención de la hormona radiactiva.-

Como se mencionó en la sección I, el ^3H -Estradiol, se obtuvo de Amersham (Inglaterra). El compuesto tuvo una actividad específica de 80-100 Ci/mmol y se utilizaron 100 microlitros conteniendo aproximadamente 10,000 cpm por cada tubo. La hormona estuvo resuspendida en un buffer PBS 0.1M gel pH 7.3.

Preparación del antisuero.-

Al igual que los de otros esteroides, este reactivo fue donado por el Match Reagent Program de la O.M.S. El compuesto viene en forma liofilizada y se reconstituye en 10 mililitros de PBS -- 0,2M gel 0.1% pH 7.3 . Se utilizaron 100 microlitros por cada tubo del ensayo.

El antisuero en mención fue generado en conejos usando estradiol-6 CMO-ASB como inmunógeno. Tiene una unión cero esperada de 25 a 30% y se usa a una dilución final de 1:56,000. Las reacciones cruzadas de este anticuerpo son de escasa significación.- Es así que cruza el 0.01% con Cortisol, 0.3% con Estriol y 1-2% estrona. Estas respuestas fueron estimadas de las potencias --- B/BO 50%.

Preparación de la Hormona No Radiactiva.-

A partir del estándar se diseñó una curva cuyo punto mínimo fue de 6.4 y máximo fue de 204.8 picogramos por mililitro. El compuesto se resuspendió en una solución PBS 0.1M gel 0.1% pH 7.3 previo a su uso.

Preparación del Métodos de separación de las fases.-

Se procedió de manera similar a la que se describe para el RIA de testosterona mencionado en la sección precedente, tanto en lo que se refiere a los procedimientos de laboratorio, cuanto en lo que concierne al cálculo de los resultados.

EVALUACION .

Los parámetros de validación de la Curva Estándar estuvieron dentro de límites aceptables. No se reportaron los valores de las muestras, porque hubo un buen porcentaje de especímenes en los - cuales las concentraciones de Estradiol no eran detectables.

A N E X O N o . 3

ANALISIS DE RADIO-RECEPTOR PARA FSH EN TESTICULO (ARR-FSH)

M E T O D O L O G I A Y E V A L U A C I O N .

ANALISIS DE RADIO-RECEPTOR PARA FSH EN TESTICULO (ARR-FSH)

M E T O D O L O G I A

En estos ensayos se utilizó la Hormona FSH iodada por el método de la cloramina T, modificada de acuerdo a Findley (32). Se realizaron diversas iodaciones y se obtuvieron productos que tuvieron una actividad específica en un rango de 61.9 a 92.5 microcuries por microgramo. En lo que concierne al material empleado para los desplazamientos, se emplearon cantidades crecientes de FSH-RPI (desde 4.6875 hasta 300 ng). Los ensayos se hicieron -- como se ha descrito en la sección correspondiente, utilizando -- 100 ul de la preparación de receptores testiculares por tubo. -- Los resultados se calcularon utilizando el método de Scatchard - (107). Las proteínas se midieron por el método de Lowry -- (69).

E V A L U A C I O N .

ARR-FSH EN EL GRUPO No. 1 (15 días).-

En este grupo se analizaron 17 muestras experimentales y 12 - controles. Se hizo una primera evaluación y se estimaron los valores utilizando una calculadora Hewlett Packard HP-67.

En los grupos experimentales control, se obtuvieron los siguientes valores promedio:

EXPERIMENTALES (n=17)

.0011 ± .0003	.016 ± .0003	.071 ± .02
.0204 ± .006	.309 ± .006	.066 ± .02
.0378 ± .012	.604 ± .012	.062 ± .02
.0671 ± .019	1.199 ± .019	.056 ± .02
.121 ± .036	2.396 ± .036	.055 ± .02
.188 ± .06	4.83 ± .06	.039 ± .01
.267 ± .08	9.75 ± .08	.027 ± .01
.337 ± .10	19.68 ± .11	.017 ± .01

Regresión linear promedio:

$$NSUe 4.41 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$Kdc 6.43 \times 10^{-9} \text{ M}$$

CONTROLES (n=12)

.001 ± .002	.016 ± .002	.056 ± .016
.016 ± .005	.313 ± .005	.052 ± .016
.030 ± .009	.617 ± .009	.049 ± .017
.052 ± .02	1.215 ± .016	.043 ± .014
.091 ± .03	2.426 ± .03	.038 ± .013
.148 ± .05	4.869 ± .05	.030 ± .011
.192 ± .08	9.825 ± .08	.020 ± .01
.253 ± .08	19.76 ± .08	.013 ± .004

Regresión linear promedio:

$$NSUc 3.15 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$Kdc 5.8 \times 10^{-9} \text{ M}$$

- a) Coeficiente de correlación (I₁, S₁)= -0.9820037
 Coeficiente de correlación (I₂, S₂)= -0.9999994

b) Tabla de valores observados y calculados:

	<u>Unido</u>	<u>U/L(observado)</u>	<u>U/L(predicado)</u>	<u>Desviación Porcentual</u>
1	1.1 E-12	.071	6.95E-02	2.12
2	2.04E-11	.066	6.63E-02	0.20
3	3.78E-11	.062	6.33E-02	-1.67
4	6.71E-11	.056	5.82E-02	-3.43
5	1.21E-10	.051	5.02E-02	0.59
6	1.88E-10	.039	3.94E-02	-0.80
7	2.67E-10	.027	2.75E-02	-0.37
8	3.37E-10	.017	1.71E-02	-0.10

c) Además, tiene los siguientes datos estadísticos que se aplican a lo Unido como función de lo Libre:

Desviación porcentual promedio	-0.43
Desviación estándar de la desviación porcentual	1.64
Prueba de T para sesgo estadístico	-0.75
Varianza residual	5.07
Error RMS	2.25

Luego del estudio estadístico de los datos, se ve que el análisis es adecuado y tiene los siguientes valores:

Número de Sitios de Unión (corregido)	$.44 \pm 12 \times 10^{-13}$ mol.mg.prot. ⁻¹
Constante de disociación	6.43×10^{-9} M

Los datos del Grupo Control son:

a) Coeficiente de Correlación (I ₁ , S ₁)	-0.9905006
Coeficiente de Correlación (I ₂ , S ₂)	-0.9758059

b) Tabla de valores observados y calculados:

	<u>Unido</u>	<u>U/L Observado</u>	<u>U/L predecido</u>	<u>Desviación porcentual</u>
1	9 E-13	.56	.055	.92
2	1.61E-11	.052	5.2 E-02	-1.01
3	3.02E-11	.0496	4.98 E-02	-0.37
4	5.21E-11	.043	4.55 E-02	-5.48
5	9.07E-11	.038	3.88 E-02	-3.17
6	1.48E-10	.030	2.99 E-02	1.595
7	1.92E-10	.0196	.020	-4.14
8	2.53E-10	.0128	1.25 E-02	2.54

c) La siguientes estadísticas se aplican a lo Unido como una -- función de lo Libre:

Desviación Porcentual Promedio	-1.14
Desv. Est. de la desviación porcentual promedio	2.87
Prueba de T para sesgo estadístico	-1.12
Varianza residual	17.05
Error RMS	4.13

Luego de este análisis estadístico se ve que el ensayo es adecuado y tiene los siguientes datos:

Número de Sitios de Unión (corregido)	3.15×10^{-10} M
Constante de disociación (corregida)	5.8×10^{-9} M

d) Si tomamos en consideración que estas muestras tuvieron un -- contenido de proteínas de 3.84 ng/ml. tendremos que los datos -- promedio del examen de 12 muestras control son:

Número de Sitios de Unión	$.39 \pm .14 \times 10^{-13}$ mol.mg.prot. ⁻¹
Constante de disociación	5.8×10^{-9} M

ARR-FSH EN EL GRUPO No. 4 (60 días).-

Para las determinaciones en estas muestras se empleó un análisis similar al empleado en el grupo anterior. Se encontró que los valores fueron:

Grupo Experimental:

Número de Sitios de Unión: $.23 \pm .06 \times 10^{-13} \text{ mol.mg.prot}^{-1}$
Constante de disociación: $6.25 \pm .93 \times 10^{-9} \text{ M}$

Grupo Control:

Número de Sitios de Unión: $.24 \pm .04 \times 10^{-13} \text{ mol.mg.prot}^{-1}$
Constante de disociación: $5.90 \pm .6 \times 10^{-9} \text{ M}$

A N E X O N O . 4

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ABP EN TEJIDO EPIDIDIMARIO

M E T O D O L O G I A Y E V A L U A C I O N

7

DETERMINACION DE ABP EN CITOSOLES EPIDIDIMARIOS

M E T O D O L O G I A .

La Metodología se encuentra descrita con detalle en la Sección correspondiente. Todos los procedimientos se ajustaron a descripciones previas (2,44,66). Las proteínas se midieron por el método de Lowry (69).

E V A L U A C I O N .

La evaluación de los resultados, tuvo parámetros similares a los descritos para el ARR-FSH y todos los índices se encontraron dentro de límites aceptables.

BIBLIOGRAFIA .

- 1) Aragona, C., Freisen, H. (1975): Specific PRL binding sites in the prostate and testis of the rat. *Endocrinology*.
- 2) Bardin, C., Musto, N., Gunsalus, G., Kotite, N., Cheng, S., - Larrea, F., Becker, R. (1981): In *Ann. Review of Physiology*. -- 43:189.
- 3) Bartke, A. (1971): Effects of PRL and LH on the cholesterol -- stores in the mouse testis. *J. Endocrinol.* 49:317.
- 4) Bartke, A. (1971): Effects of PRL on spermatogenesis in hypo-- physcectomized mice. *J. Endocrinol.* 49:311 .
- 5) Bartke, A. et al. (1977): Effects of experimentally induced -- chronic hyperprolactinemia on Testosterone and Gonadotropin - levels in male rats and mice. *Endocrinology* 100:182.
- 6) Bartke, A., et al. (1977) Effects of PRL on pituitary and - testicular function in mice with hereditary Prolactin defi-- ciency. *Endocrinology* 101:1760.
- 7) Bartke, A. et al. (1984): Effects of estrogen induced hipep prolactinemia on endocrine and sexual functions in adult --- male rats. *Neuroendocrinology*. 39:126.
- 8) Bast, J., D, m Greenwald, G.S. (1974): Serum profiles of FSH, LH and PRL during the estrous cycle of the hamster. *Endocrinology*. 94:1295.
- 9) Bedolla, N.T., et al. (1984): Análisis de datos y control de-- calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de los resultados. *Rev. Invest. Clín. (Méx)* 36:179.
- 10) Berson, S.A., Yalow, R.S. (1959): Assay of plasma Insulin in -- human subjects by immunological methods. *Nature* 184:1948.

- 11) Bohnet, H., Friessen, H. (1976): Effect of PRL and GH on PRL and LH receptors in the dwarf mouse. *J.Reprod. Fert.* 48:307.
- 12) Bourguignon, J., Gerard, A., Franchimont, P. (1984): Age related differences in the effect of castration upon the hypothalamic LHRH content in male rats. *Neuroendocrinology.* 38:376.
- 13) Brown, P.S., et al. (1976): A radioligand receptor assay for FSH. *Acta Endocrinol (Copenh)* 82:673.
- 14) Castlow, M., McGuire, W. (1977): Autoradiographic localization of the binding of 125-I labelled PRL to rat tissues in vitro. *J.Endocrinol.* 75:221.
- 15) Cekan, S.Z. (1976): Reliability of steroid radioimmunoassay. *Acta Univ. Upsalien.* No. 14, p.1-48.
- 16) Cicero, T. et al. (1979): Endogenous opioids participate in the regulation of the hypothalamic-pituitary LH axis and Testosterone's negative feedback control of LH. *Endocrinology* 104:1286.
- 17) Clemens, J., et al. (1978): Evidence that Serotonin neurons stimulate secretion of PRF. *Life Sci.* 22:2209.
- 18) Coutifaris, C., Chappel, S.C. (1982). Intraventricular injection of FSH on estrus in phenobarbital treated hamsters through a central nervous system dependent mechanism. *Endocrinology.* 110:105.
- 9) Cramer, O., Parker, R., Porter, J. (1979): Secretion of DA into hypophysial portal blood by rats bearing PRL secreting tumors or ectopic pituitary glands. *Endocrinology.* 105:636.
- 20) Chang, P., Rubin, R., Yu, M. (1975): Optimal statistical design of RIA and competitive protein binding assay. *Endocrinology* 96:973.

- 21) Chappel, S.C. (1981): The presence of two species of FSH within hamster anterior pituitary gland as disclosed by Concanavalin A chromatography. *Endocrinology*. 109:935.
- 22) Chappel, S.C. et al. (1982): Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology*. 110:874.
- 23) Charreau, E. et al. (1977): PRL binding in rat testis: Specific receptors in interstitial cells. *Mol. Cell. Endocrinology*. -- 6:101.
- 24) Cheng, K.W. (1975): A receptor assay for FSH. *J. Clin. Endoc. Metab.* 41:581.
- 25) Diczfalusy, E., (1970): Research methods in Reproductive --- *Endocrinology. Act. Endoc. Suppl.* 147.
- 26) Drouva, S., Gallo, R. (1977): Further evidence for inhibition of episodic LH release in ovariectomized rats by stimulation of DA receptors. *Endocrinology*. 100:792.
- 27) Dupont, A., et al. (1977): Stimulation of PRL release in the rat by intraventricular injection of μ Endorphin and Met-Enkephalin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:76.
- 28) Enrich, P. (1900): On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Lond. (Biol.)* 66:424.
- 29) Everett, J.W. (1954): Luteotropic function of autographs of the rat hypophysis. *Endocrinology*, 54:685.
- 30) Fang, V., et al. (1974): Hypogonadism induced by a transplantable, PRL producing tumor in male rats: Hormonal-morphological studies. *Endocrinology* 95:991.

- 31) Ferland, L. (1978): Evidence for a role of Endorphins in ----- stress and suckling-induced PRL release in the rat. *Mol. Cell Endocrinol* 12:267.
- 32) Findley, W. Steinberger, A. (1983): A homologous radioreceptor for rFSH. *Endocrinology* 113:1081.
- 33) Freund, J. (1947): Some aspects of active immunization. *Ann. - Review of Microbiol.* 1:291.
- 34) Fuxe, K., et al. (1969): Castration, sex hormones and tubero-infundibular dopamine neurons. *Neuroendocrinology.* 5:107.
- 35) Fuxe, K., et al. (1976): In: *Subcellular mechanisms in Reprod. Neuroendocrinology.* Ed. by F. Naftolin. Elsevier Sci. Publ. Co. (Amst). p. 193.
- 36) Gallo, R. (1978): The effects of blockade of DA receptors on the inhibition of episodic LH release during electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology* 120:1026.
- 37) Gallo, R. (1980): Neuroendocrine regulation of pulsatile LH - release in the rat. *Neuroendocrinology* 30:122.
- 38) Grandison, L., et al. (1977): Inhibition by PRL of postcastration rise in LH. *Neuroendocrinology* 23:312.
- 39) Grandisson, L. Guidotti, A. (1977): Regulation of PRL release by Endogenous Opiates. *Nature* 270:357.
- 40) Gray, G., et al. (1980): Gonadotropin regulation in middle -- aged male rats. *Endocrinology* 107:2021.

- 41) Greibokk, T. et al. (1974): Purification of PRL inhibiting hormone and d-GHIF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:704.
- 42) Gudelsky, G. et al. (1976): Selective actions of PRL on catecholamine turnover in the hypothalamus and on serum LH -- and FSH. *Neuroendocrinology* 22:206.
- 43) Gudelsky, G. Porter, J. (1980): Release of DA from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after PRL or Haloperidol administration. *Endocrinology* 105:526.
- 44) Guevara Aguirre, J., Escudero, A. Schoener, G. Ullos, A., - Larrea, F. (1985): Efectos de PRL sobre la función del eje-hipotálamo-hipófisis-testículo en diferentes estadios de maduración sexual de la rata. *Rev. Invest. Clin. (Méx)* 37:225
- 45) Hafiez, A. Bartke, A. Lloyd, D. (1972): Role of PRL in the - regulation of testis function. *J. Endocrinol.* 63:223.
- 46) Hansson, V. et al. (1975): Comparison of ABP in rabbit testis and epididymis with a similar androgen binding protein - (te BG) in rabbit serum. *Mol. Cell. Endoc.* 3:120.
- 47) Ho, K., Smythe, G. Lazarus, L. (1984): Dopaminergic control of Gonadotropin secretion in normal women and patient with pathological hyperprolactinemia. *Cli. Endoc.* 20:53.
- 48) Hulse, G. Coleman, G. (1983): The effects of morphine sulphate on ovulation in the immature rat treated with PMSG. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19:269.
- 49) Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962): Reproduction of Iodine 131 labelled Growth Hormone of high specific activity. ---- *Nature*, 194:495.
- 50) Ieri, T. Chen. H., Meite, J. (1979): Effects of morphine and naloxone on serum PRL and LH levels in prepuberal male and - female rats. *Neuroendocrinology* 29:288.

- 51) Jhonson, J., et al. (1982): Inhibition of pulsatile LH release by morphine, microinjected into mesencephalic dorsal raphe. - Life Sci. 30:1473.
- 52) Kalra P., Kalra, S. (1985): Control of Gonadotropin secretion In "The Pituitary Gland". Ed. by H Imura Raver Press N.Y. pp. 189-220.
- 53) Kalra, S. et al. (1971): Effects of hypothalamic and preoptic electrochemical stimulation on Gonadotropins and PRL release in proestrus rats. Endocrinology 8:1150.
- 54) Kalra, S. et al. (1980): Effects of pentobarbital on hypothalamic catecholamines and LRH activities. Acta Endocrinol. --- (Copenh), 96:1.
- 55) Kalra, S. et al. (1981): Evidence for noradrenergic mediation of opioid effects on LH secretion. Endocrinology 104:776.
- 56) Kalra, S., Kalra, P. (1983): Neural regulation of LH secretion in the rat. Endoc. Rev. 4:311.
- 57) Kamberi, I., Mical, R., Porter, J. (1971): Effect of melatonin and serotonin on FSH and PRL release. Endocrinology ---- 88:1288.
- 58) Kato, Y., et al. (1973): Effects of synthetic TRH on plasma h-PRL levels in normal subjects and patients with Hypothalamo-pituitary disorders. Folia Endocrinol. Jpn. (Kyoto). 49:1215.
- 59) Kato, Y. et al (1978): Effects of Endorphins on PRL and GH -- secretion in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158:431.
- 60) Kato, Y. et al. (1980): Effect of synthetic Enkephalin analogue on PRL secretion in man and rats. In: Progress in Reprod. --- Biology Vol. 6, Ed. by P. Hubinont. Karger, Basel p. 54.

- 61) Kato, Y. et al. (1980): Role of VIP in regulating the PRL secretion in man and rats. In: *Endocrinology*, Ed. by Shizume Imura and Shimizu. Excerpta Med. Ams. p. 136.
- 62) Kato, Y. et al (1985): Regulation of PRL secretion,. In: *The Pituitary Gland*, Ed. by H. Imura. Raven Press, N.Y. pp. 261.
- 63) Ketelslegers, J.M., Catt, K.J. (1978): Follitropin receptors in rat testis. Characterization with enzymatically I-125 labelled h- Follitropin. *Biochem. Biophys. Acta* 541:360.
- 64) Klemcke, H., Bartke, A. (1981): Effects of chronic hyperprolactinemia on plasma Gonadotropin concentrations and testicular human hCG binding sites. *Endocrinology* 108:1763.
- 65) Landsteiner, K. (1920): Spezifische serumreactionen miteinfach zusammengestetzten sustanzen von bekannter konstitution. *Biochem. Z.* 104-280.
- 66) Larrea, F. et al. (1981): Origin of the heavy and light protomers of ABP from the rat testis. *J.Biol. Chem.* 256:1256.
- 67) Larrea, F., et al. (1983): Hypergonadotropic hypogonadism in an XX female subject due to 17,20 steroid desmolase deficiency. *Acta Endoc.* 103:400.
- 68) Leadem, C., Kalra, S. (1983): The effects of various opiate--receptor agonist on LH and PRL secretion in ovariectomized --rats. 65th. Ann. Meet. Endoc. Soc. p.163. (Abst).
- 69) Lowry, O.H. et al (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193:265.
- 70) Maghuim-Rogiter, J. et al. (1978): Study of Follitropin receptors in testis using a homologous system. *Eur. J. Biochem.* -- 86:121.

- 71) Matsushita, N., et al. (1983): Effects of VIP, TRH, GABA and DA on PRL release from superfused rat anterior pituitary ---- cells. Life Sci. 32:1263.
- 72) McCann, S. (1974): Regulation of FSH and LH. Handbook of Physiology. Ed. by Knobil and Sawyer. Vol. 4. p. 489.
- 73) McNeilly, A., et al. (1978): Inhibition of Gonadotropin secretion by induced hyperprolactinemia in the male rat. J. Endocrinol. 79:59.
- 74) McNeilly, A., et al. (1979): Modulation of PRL, LH and FSH secretion by LHRH and bromocriptine in the hypophysectomized -- pituitary grafted male rat and its effect on testicular LH receptors and Testosterone output. Biol. Reprd. 21:141.
- 75) Means, A.R., et al. (1976): FSH, the Sertoli cell and Spermatogenesis. Recent. Prog. Horm. Res. 32:477.
- 76) Means, A.R., et al. (1978): Hormonal regulation of the Sertoli cell. Int. J. Androl. (Suppl. 2) 2:403.
- 77) Meites, J., Clemens, J. (1972): Hypothalamic control of PRL - secretion. Vitam. Horm. 30:165.
- 78) Midgley, A.R., Niswender, A., Rebar, R. (1969): Principles of assessment of the reliability of RIA methods. Karol Sympos. - on Res. Met. in Reprod. Endocrinol. 1st. Symp: 163.
- 79) Milmore, J., Reece, R. (1975): Effects of porcine hypothalamic extract on PRL release in the rat. Endocrinology 96:732.
- 80) Moctezuma, O., Villanueva, C., Garza, J., Oliart, R., Larrea, F. (1984): Identificación y caracterización de los productos de radioidinación de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas. - Rev. Invest. Clín. (Méx) 36:13.

- 81) Morris, P., Saxena, B., (1980): Dose and age dependent effects of PRL on LH and PRL binding sites in rat Leydig cells homogenates. *Endocrinology*. 107:1639.
- 82) Motta, M., Martini, L. (1982): Effect of Opioid Peptides on Gonadotropin secretion. *Acta Endoc. (Copenh)* 99:321.
- 83) Muralidhar, K., et al. (1977): Inhibition of in vivo pituitary release of LH in lactating rats by exogenous PRL. *Endocrinology* 100:1137.
- 84) Musto, N., Gunsalus, G., Miljkovic, M. Bardin, W. (1977): *Endocrinology Res. Commun.* 4:147.
- 85) Musto, N., Gunsalus, G., Bardin, W. (1978): *Int. J. Androl.* - 2(Suppl),424.
- 86) Musto, N. Gunsalus, G., Bardin, W. (1980): *Biochemistry* 19:2853.
- 87) Negro Vilar, A., et al. (1979): Catecholaminergic modulation - of LHRH release by ME terminals in vitro. *Endocrinology* 104:-1749.
- 88) Neill, J.D. (1980): Neuroendocrine regulation of PRL secretion In: *Neuroendocrinology*, Vol. 6. Ed. by L.Martini and W. Ganong. Raven Press, N.Y. pp. 129.
- 89) Niall, H., et al. (1973): The chemistry of Growth Hormone and the lactogenic hormones. *Recent. Progr. Horm Res.* 29:387.
- 90) Nicoll, Ch. (1980): Ontogeny and evolution of Prolactine Functions. *Federation Proc.* 39:2563.

- 91) Oliart, R., Escorza, A., Domínguez, R., Larrea, F. (1985): -- Effects of Naloxone on pituitary Gonadotropine throughout --- sexual maturation in male and female rats. Rev. Invest Clin - (Méx) (In Press).
- 92) Panera, A., et al. (1980): Prolonged hyperprolactinemia in--- fluences endorphin and Met- Enkaphalin in the brain. Endocri nology 106:1804.
- 93) Patrìtti-Laborde, N., Odell, W. (1984): Effects of short term hyperprolactinemia in the endocrine reproductive system in -- male rabbits. Fertility and Sterility. 42:459.
- 94) Pérez-Palacios, G., et al. (1970): Radioiodinación de hormonas proteicas. Rev. Biol. Med. Nucl. 2:179.
- 95) Rajamieni, H., et al. (1974): Distribution of 125-I prolactin in mice and rat. Studies on whole body and microauto radio--- graphy. Horm. Res. 5:6.
- 96) Reichert, L.E., Bhalla, V.K. (1974): Development of a radioli gand tissue receptor assay for hFSH. Endocrinology 94:483.
- 97) Ritzen, M., Hansson, V., French, F. (1981): The Sertoli cell,- In "The Testis." Ed. by Burger. Raven Press, N.Y. pp.171-194.
- 98) Ríos, E., et al. (1974): Endocrine and metabolic studies in an XY patient with gonadal agenesis. J. Clin. Endoc. Metab. - 39:540.
- 99) Rivier, C., Vale W., Ling, N., Brown, M., Guillemin, R. (1977): Stimulation in vivo of PRL and GH secretion by Endorphin. --- Endocrinology 100:238.
- 100) Rodbard, D., et al. (1974): Statistical quality control of - Radioimmunoassay. J. Clin. Endoc. Metab. 39:540.

- 101) Rodbard, D., Hutt, D.M. (1974): Statistical analysis of RIA- and immunometric assays. In: RIA and related procedures. --- Vol. 1. Intern. Atom. Energy Agency, Vienna, p. 165.
- 102) Rodbard, D. (1978): Quality control for RIA. Vol.II, Intern.-Atom. Energy Agency, Vienna, p.21.
- 103) Ropert, J., Quigley, M., Yen, S. (1984): The dopaminergic --- inhibition of LH secretion during the menstrual cycle. Life - Sci. 34:2067.
- 104) Sairam, M.R. (1979): Evaluation of the bovine testicular radio receptor for pituitary FSH. Endocrinol. 82:253.
- 105) Samson, W., et al. (1983): PRL releasing activity of Porcine-Intestinal Peptide (PHI-27). Peptides, 4:817.
- 106) Sanborn, B., Elkington, J., Steinberger, E. (1975): Hormonal influences on the level of testicular androgen binding activity: Effect of FSH following hypophysectomy. Endocrinology --- 96:304.
- 107) Scatchard, G. (1949): The attraction of proteins for small -- molecules and ions. Ann, N.Y. Acad. Sci. 51:660.
- 108) Schally, A., et al. (1977): Isolation of GABA from pig hypothalamic and demonstration of its PIF activity in vivo and -- in vitro. Endocrinology. 100:681.
- 109) Schally, A. (1978): Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Science, 202:18.
- 110) Shaar, C., Clemmens, J., Dininger, N. (1979): Effects of VIP on PRL release in vitro. Life Sci. 25:2071.

- 111) Shimatsu, A., et al. (1983): PHI and VIP-like immunoreactivity coexist in rat hypophysial portal blood. *Neuroscience-Lett.* 43:259.
- 112) Sickle, M., et al (1981): Development changes in the hormonal regulation of rat testis Adenyl Cyclase. *Endocrinology* 109:1270.
- 113) Simpkins, J. Kalra, P., Kalra, S. (1980): Effects of Testosterone on Catecholamine turnover and LHRH contents in the basal hypothalamus and preoptic area. *Neuroendocrinology* 30:94.
- 114) Simpkins, J., Kalra, P., Kalra, S. (1980): Inhibitory effects of androgens on preoptic area dopaminergic neurons in castrated rats. *Neuroendocrinology.* 31:177.
- 115) Simpkins, J., Kalra, P., Kalra, S. (1983): Variable effects of Testosterone on Dopamine activity in several microdissected regions in the preoptic area and medial basal Hypothalamus. - *Endocrinology* 112:665.
- 116) Ulloa-Aguirre, A., Mejia, J., Guevara Aguirre, J., Larrea, F. (1985): Microheterogeneity of anterior pituitary FSH throughout sexual maturation of male rats. 67th, Annual Meeting of - the Endoc. Soc. (Balt. M.D.)Abstract #578.
- 117) Vaitukaitis, J., et al (1971): A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endoc. - Metab.* 33:988.
- 118) Valverde, C., Chiefflo, V., Reichlin, S. (1972):PRF in porcine and rat hypothalamic tissue. *Endocrinology*, 91:982.
- 119) Van Vugt, D., Bruni, A., Meites, J. (1978): Naloxone inhibition of stress induced increase in PRL secretion. *Life Sci.*- 22:85.
- 120) Von Graffenried, B., et al. (1978): Effects of the sympathetic Enkephalin analogue FK 33-824 in man. *Nature*, 272:729.

- 121) Vooget, J., Meites, J. (1971): Effects of an implant of PRL - in median eminence of pseudopregnant rats on serum and pituitary LH, FSH and PRL. *Endocrinology* 88:286.
- 122) Weiner, R., Bethea, C. (1981): Hypothalamic control of PRL -- secretion. In: *Prolactin*, Ed. by R. Jaffe. Elsevier North --- Holland, N.Y. p. 19.
- 123) Werner, S., et al. (1983): Effect of PHI-27 on PRL release in vitro. *Neuroendocrinology*. 37:476.
- 124) Winters, A., et al. (1975): Foetal plasma PRL levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41:626.
- 125) Winters, S., Loriaux, L. (1978): Suppression of plasma by PRL in the male rat. *Endocrinology* 102:864.
- 126) Woods, M., Simpson, M. (1961): Pituitary control of the testis of hypophysectomized rat. *Endocrinology* 69:91.
- 127) Wolf, P., et al. (1974): PRL and TSH release in man by synthetic pyroglutamy-histidyl-prolinamide. *Biochem. Biophys. --- Res. Commun.* 45:1033.
- 128) Zip, W., Payne, A., Kelch, R. (1978): PRL, GH and LH in the - maintenance of testicular LH receptors. *Endocrinology* 103:595.