

300627
31
203



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**“Determinación de la pulsatilidad
de LHbioactiva en varones con
oligoastenozoospermia idiopática antes
y después de un estímulo con GnRH”**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO
B I O L O G O
P R E S E N T A :
HELIDA SOTO CORIA

DIRECTOR DE TESIS:
Q. IRENE MONTALVO VELARDE



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.

1.- INTRODUCCION	pags.1
2.- GLOSARIO	4
3.- OBJETIVOS	5
4.- HIPOTESIS	6
5.- MARCO TEORICO		
5.1- Generalidades	8
5.2- Regulación hipotalámica de la hipofisis		...10
5.2.1- Mecanismo de acción de GnRH		...12
5.3- Relación estructura-función de las gonadotropinas		...13
5.4- Mecanismos de acción de las gonadotropinas hipofisarias		...16
5.5- Testículo		...19
5.5.1- Estructura de los túbulos seminíferos		...20
5.6- Características morfológicas de las células esteroideogénicas		...24
5.7- Biosíntesis de testosterona		...25
5.7.1- Metabolismo periférico de testosterona		...28
5.8- Regulación hipotálamo-hipofisis-célula de Leydig		...29
5.9- Patología		...31
6.- DISEÑO DEL EXPERIMENTO		
6.1- Cálculo del tamaño de muestra		...38
6.2- Pacientes		...39
6.2.1- Criterios de inclusión		...40
6.3- Obtención de muestras		...41
6.4- Procesamiento de muestras		...43
6.5- Bioensayo en células de Leydig		...44
Figura 1		
6.6- RIA		...47
Figura 2		
6.7- Metodología estadística		...50
6.7.1- Descripción de variables		...53
7.- RESULTADOS		
7.1- Gráficas		
7.1.1- Curva estándar promedio de RIA		...61
7.1.2- Curva estándar promedio de LHbio		...62
7.1.3- Gráfica promedios basales		...63
7.1.4- Gráficas pacientes sanos		
7.1.5- Gráficas pacientes enfermos		
7.2- Coeficientes de variación		...64
7.3- Descripción de resultados		...65
8.- DISCUSION		...66
9.- CONCLUSIONES		...69
10.- ANEXOS (técnicas)		...70
11.- APPENDICE (todos los resultados)		...80
12.- BIBLIOGRAFIA		...87

1.- INTRODUCCION

Los estudios realizados entre 1978-1985 en aproximadamente 7250 parejas estériles en diversas regiones del mundo, empleando como instrumento de evaluación el protocolo para el estudio integral de la pareja estéril propuesto por la OMS, señalan que en el 45% de estas parejas la esterilidad es atribuible al factor masculino. Este y otros estudios han permitido clasificar la esterilidad masculina en 3 grupos:

- 1.- Factor pretesticular : Alteraciones hipotálamo-hipofisiarias.
- 2.- Factor testicular: Alteraciones genéticas y /o adquiridas que afectan total o parcialmente la gónada.
- 3.- Factor posttesticular: Alteraciones o ausencia de los conductos eferentes u obstrucción de los mismos, así como también infecciones, alteraciones inmunológicas y trastornos eyaculatorios.

Estos factores dan como resultado alteraciones en el número, morfología, metabolismo y capacidad fertilizante de los espermatozoides (1 , 2), pudiéndose presentar una o más de éstos simultáneamente.

De acuerdo a estas alteraciones se clasifica de manera más específica la esterilidad.

cómo :Oligozoospermia:concentración espermática baja <20x10

cél/ml

Teratozoospermia:morfología anormal > 60%

Astenozoospermia:movilidad disminuida < 40%

Y las posibles combinaciones de éstas como es la oligoastenozoospermia: concentración baja y movilidad disminuida (3).

La oligoastenozoospermia idiopática constituye la causa más frecuente de esterilidad masculina, los sujetos que la presentan tienen alteraciones en el número y movilidad espermáticas. Por otra parte los análisis hormonales convencionales como el radioinmunoensayo (RIA) no detectan alteraciones aparentes del sistema hipotálamo-hipófisis-testículo, de aquí que se le denomine idiopática o inexplicable (15,16). Sin embargo, aún cuando los niveles hormonales basales de estos pacientes son similares a los de sujetos fértiles, se requiere profundizar en el estudio de la liberación pulsátil de las gonadotropinas, ya que este modo de liberación es una característica fisiológica necesaria para que se lleve a cabo de manera adecuada la espermatogénesis (4,5). Además en estos pacientes resulta de suma importancia la determinación de la actividad biológica de las hormonas hipofisiarias ya que pueden existir alteraciones significativas en este parámetro cuando se comparan con los valores de los sujetos sanos.

El propósito de este estudio, es contribuir a encontrar la causa de esta enfermedad, por lo que este estudio tiene como finalidad

elucidar una entidad de la cual, no se tiene mucho conocimiento, como es la oligoastenozoospermia idiopática, pues hasta ahora el pronóstico y tratamiento de la esterilidad masculina de esta naturaleza son limitados, con este estudio se pretende una mejor comprensión de los mecanismos que regulan el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-testículo ofreciendo mejores perspectivas para los pacientes.

2.- GLOSARIO

FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
TSH	Hormona estimuladora de tiroides
hCG	Hormona gonadotropina coriónica
T	Testosterona
E2	Estradiol
CPM	cuentas por minuto
xg	tantas veces la gravedad de la tierra
MIX	3-isobutil- 1 metil xantina
PBS	amortiguador de fosfatos
RIA	radioinmunoanálisis
NIDDK-hLH-1-3	nombre comercial estándar de LH, potencia biológica 5900 UI/mg
OMS	Organización Mundial de la salud
ABP	Proteína de unión de andrógenos

3.- OBJETIVOS

Objetivo General :

Estudiar las características de la secreción pulsátil de la hormona LH bioactiva en un grupo de varones con oligoastenozoospermia idiopática.

Objetivos Específicos :

1.- Determinar la concentración de LH bioactiva en 72 muestras de suero obtenidas durante 12 horas en un grupo de varones con oligoastenozoospermia idiopática.

2.- En este grupo analizar la respuesta de la hipófisis ante un estímulo exógeno con hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en términos de la liberación de LH bioactiva.

3.- Realizar los mismos estudios(puntos 1,2) en un grupo de varones sanos con el propósito de comparar los resultados de ambos grupos.

4.- HIPOTESIS

1.- La pulsatilidad de la secreción de LH bioactiva es diferente entre varones fértiles y los varones estériles con oligoastenozoospermia idiopática.

2.- El estímulo exógeno con GnRH provoca una respuesta distinta en ambos grupos de pacientes , en cuanto a la secreción pulsátil de LH bioactiva.

5.- MARCO TEORICO

5.1- Generalidades

5.2- Regulación hipotalámica de la hipófisis

5.2.1- Mecanismo de acción de GnRH

5.3- Relación estructura-función de las gonadotropinas

5.4- Mecanismos de acción de las gonadotropinas hipofisarias

5.5- Testículo

5.5.1- Estructura de los túbulos seminíferos

5.6- Características morfológicas de las células esteroideogénicas

5.7- Biosíntesis de testosterona

5.8- Regulación hipotálamo-hipófisis- célula de Leydig

5.9- Patología

5.1 - Generalidades

Las dos principales funciones del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en el hombre son la de producir hormonas esteroideas que determinan las características sexuales secundarias y la producción de gametos sanos. Las dos actividades principales del testículo son: biosíntesis de andrógenos en las células de Leydig y la espermatogénesis que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. El hipotálamo y la hipófisis participan en la regulación de estas funciones por medio de la secreción de GnRH y las gonadotropinas (LH Y FSH) respectivamente. Por lo tanto para comprender la fisiología reproductiva del hombre es necesario examinar el eje hipotálamo-hipófisis-testículo tanto de forma individual como en conjunto.

El estudio de la fisiología reproductiva es complejo por lo que es necesario utilizar herramientas cada vez más sofisticadas. Actualmente se usan ensayos biológicos para LH y hCG en suero empleado células intersticiales de rata (in vitro), que son altamente sensibles a gonadotropinas y responden produciendo testosterona, cuando se incuban con baja concentración de LH y hCG. Estos bioensayos permiten medir la actividad biológica de LH circulante en suero bajo cualquier circunstancia fisiológica. Por lo tanto la combinación

de bioensayo y RIA permiten el cálculo de relaciones de bioactividad e inmunoreactividad que son de utilidad para detectar cualquier cambio que se asocie a alguna patología en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

5.2 - Regulación hipotalámica de la hipófisis

El hipotálamo es el componente neural que regula la secreción de las glándulas endocrinas y a su vez es regulado por éstas. El hipotálamo libera, entre otras a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), éste es un decapeptido, que es sintetizado en neuronas del área preóptica del hipotálamo medio y liberado en la eminencia media, en donde pasa a la sangre del sistema portal hipotálamo/hipofisiario y llega a la hipófisis (ver figura 4). El GnRH estimula tanto la liberación de la LH como la de la FSH. Esta acción se logra mediante su unión a receptores específicos de alta afinidad, localizadas sobre las membranas plasmáticas de las células gonadotrópas de la hipófisis.

La secreción del GnRH es pulsátil lo que es indispensable para mantener la secreción de las células blanco.

Este decapeptido es liberado hacia la circulación portal en pulsos que ocurren cada 70 a 90 minutos (20). Sin embargo tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos dependen de las condiciones fisiológicas. El efecto de un pulso de GnRH en la hipófisis condiciona la respuesta a un segundo pulso.

En estudios (in vivo) han demostrado que la respuesta de LH en una segunda inyección de GnRH con intervalo de 1 hora es mayor que la primera (25).

El GnRH tiene en la sangre una vida media corta estimada en aproximadamente 2 a 5 minutos. Por lo tanto, la hipófisis está expuesta a altas concentraciones de GnRH por períodos cortos de tiempo.

El patrón pulsátil de la liberación de GnRH es esencial en la regulación de la secreción de FSH y LH. Mientras que la exposición constante a GnRH resulta paradójicamente en efectos inhibitorios en la secreción de gonadotropinas (20).

El GnRH como sus análogos han sido usados tanto para promover como inhibir la fertilidad tanto en el hombre como en la mujer. Los análogos tienen la capacidad de unirse al receptor y producir la respuesta bioquímica, mientras los antagonistas se unen al receptor, pero no producen respuesta bioquímica.

La manera en que estrógenos y testosterona regulan la respuesta de GnRH todavía no está definida, ha sido difícil identificar el sitio de producción de GnRH (25).

Fig. 4 HIPOTALAMO - HIPOFISIS

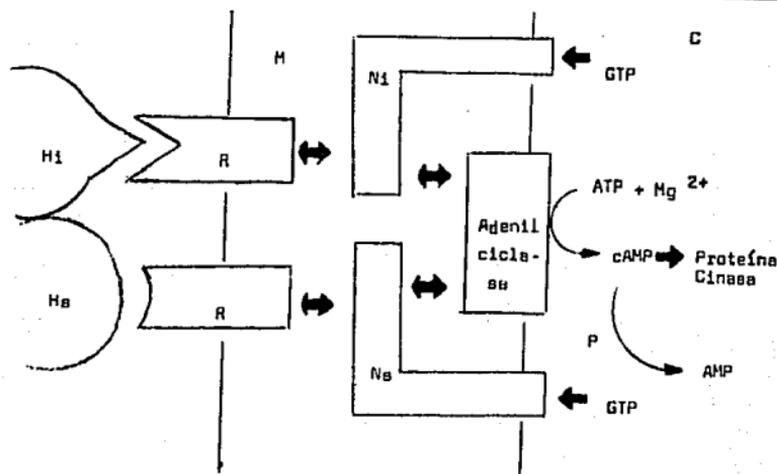
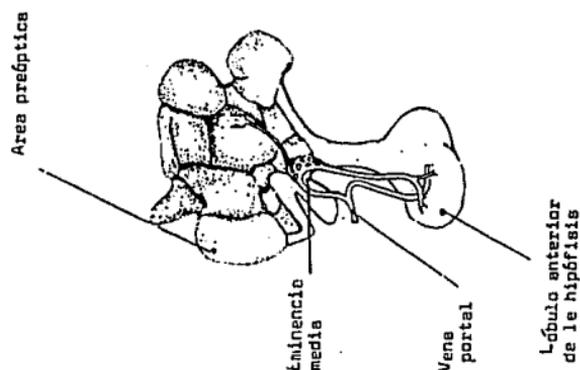


Fig. 6 H_i :hormona inhibidora, H_e :hormona estimuladora, R :receptor, M :membrana, C :citoplasma, P : fosfodiesterasa, N_i :proteína inhibidora, N_e :proteína estimuladora

5.2.1 - Mecanismos de acción de GnRH

La acción del GnRH en la hipófisis tiene por la unión de éste a receptores específicos de la membrana de las células gonadotropas (ver figura 9).

La unión del GnRH induce la agregación del receptor lo cual provoca Ca^{2+} y la unión del complejo GnRH-receptor a la proteína de la membrana Gs. Esto último induce la actividad enzimática de la fosfolipasa "C" (PLC) que a su vez provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol de la membrana (PIP2) para formar los segundos mensajeros fosfatidilinositol trifosfato (IP3) y el diacil glicerol (DAG).

El DAG activa a la proteína cinasa c (PK-C) que a su vez regula la síntesis de las gonadotropinas y su glucosilación. También induce la formación de más receptores a GnRH "up regulación".

El IP3 moviliza el Ca^{2+} intracelular y abre los canales de Ca^{2+} . El aumento del Ca^{2+} intracelular induce la salida de las gonadotropinas preformadas.

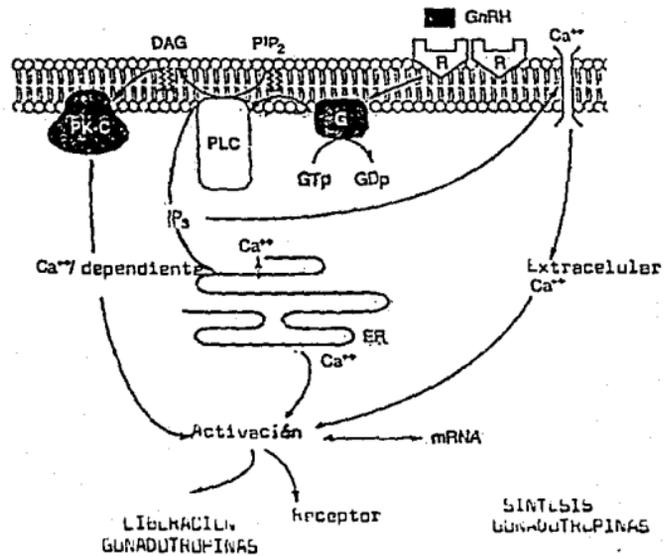


Fig. 9 Mecanismo de acción GnRH

5.3 - Relación estructura-función de las gonadotropinas

Este grupo de hormonas protéicas LH,FSH así como la hCG tienen en común dos cadenas aminoácidos denominadas cadenas alfa y beta asociadas de manera no covalente. Las cadenas alfa de estas proteínas contienen 92 aminoácidos, cuya secuencia es idéntica para las tres hormonas. Las diferencias sustanciales existen en sus respectivas cadenas beta, las cuales tienen distintas secuencias de aminoácidos que las distinguen una de otra (20).

Estudios indican que las subunidades α de las glicoproteínas que son idénticas en las especies tienen mucha importancia en cuanto a unión y acción biológica y que las subunidades β sirven -- principalmente para inducir cambios conformacionales de las sub-- unidades α y para dar especificidad a cada hormona, para su interac-- ción con el receptor (24).

Por su contenido de carbohidratos (20%) estas proteínas se conocen como glucoproteínas, (20) los grupos de carbohidratos están presentes en lugares específicos en cada subunidad y son importantes en la acción biológica y metabólica (25). La subunidad beta de La LH contiene un grupo de oligosacáridos unidos en forma covalente a estos aminoácidos.

Debido a la presencia de cinco pares de uniones disulfuro en las subunidades alfa y seis pares en las subunidades beta, las

hormonas gonadotrópicas son marcadamente globulares . La alteración de estas uniones por oxidación con ácido perbórmico o su reducción con agentes como el ditiotreitól, impide tanto la unión a los receptores específicos como la expresión de su actividad biológica (20).

La LH es la más estable de las glicoproteínas y su estructura y función ha sido la más analizadas, el peso molecular de la LH es aproximadamente 28000 y de la FSH es 33000 y el peso molecular de la subunidad es 14000. La diferencia en sus pesos moleculares se -- debe a la heterogeneidad de los grupos de carbohidratos y a los aminoácidos.

La composición de los carbohidratos determina el punto isoeléctrico, los grupos de carbohidratos que tienen la LH son: manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, N acetilgalactosamina y ácido siálico. En general las formas alcalinas de LH tienen mayor actividad biológica en bioensayos (in vitro) pero también son degradadas más rápido de la circulación. Las isoformas más ácidas son menos activas (in vitro) , pero también son más lentas en su degradación y actividad (in vivo).

El tiempo de las glicoproteínas en la circulación es influenciada por su contenido de ácido siálico y es de más tiempo para aquellas con más ácidos siálicos.

Después de una desialización enzimática, la mayoría de las glicoproteínas son rápidamente eliminadas de la circulación por el hígado.

Se ha visto que la LH y la FSH retienen su afinidad de unión a receptores después de haber sido retirados sus carbohidratos pero su habilidad para estimular la adenilciclase se ve disminuida (25).

La actividad de las glicoproteínas no se debe sólo a la conformación de una subunidad, sino que las dos subunidades prestan actividad biológica (26).

5.4.- Mecanismos de acción de las gonadotrinas hipofisiarias

Las hormonas de naturaleza protéica (LH y FSH), producto de la síntesis y la secreción de la glándula hipofisiaria ejercen sus efectos en el testículo mediante su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular de la célula de Leydig, mecanismo que constituye el primero de una serie de eventos que son necesarios para la expresión biológica a nivel celular.

Durante la pubertad, el sistema endócrino es de suma importancia en la inducción de las características propias del sexo , finalidad que requiere de la instalación de mecanismos finos de regulación entre la glándula hipofisiaria y las gónadas. Las gonadotropinas hipofisiarias (LH y FSH) representan, en ambos sexos, el principal estímulo para el desempeño de las funciones de la gónada.

En la membrana plasmática de las células de Leydig se han demostrado receptores a la LH (20).

El hecho de que ocupen sólo un pequeño porcentaje de los receptores de LH en la célula de Leydig es adecuada para producir una respuesta completa. Este fenómeno se observó al incubar testículo y células de Leydig pero también se aplica in vivo y puede que se aplique a una acción normal de hormonas peptídicas. La presencia de tal exceso de receptores de LH en la superficie de la célula de Leydig tiene como función aumentar la sensibilidad a la

respuesta celular a bajas concentraciones de gonadotropinas. Además sirven también como reservas de receptores ya que un gran número son internados y degradados después de la unión hormona-receptor (25).

La señal bioquímica generada y secundaria a la formación del complejo hormona-receptor se traduce generalmente en la estimulación de la adenilciclase y en la acumulación de AMP cíclico intracelular (20) (ver figura 5).

La enzima adenilciclase es la responsable de la formación de AMP cíclico, en este proceso participan dos tipos de proteínas N : una estimuladora N_s y una inhibidora N_i , las cuales se unen a dos tipos de receptores específicos (ver figura 6). La proteína estimuladora o N_s se une al receptor conocido como R_s , mientras que la N_i se une al receptor R_i . El Mg y GTP son necesarios para la transformación de la molécula N a su forma activa. La unión de una molécula con el receptor R_s induce un cambio conformacional en éste último, que le permite interactuar con la proteína adyacente N_s sensibilizándola al GTP que proviene del interior de la célula. La unión del GTP a la proteína N_s induce en ésta un cambio conformacional que activa a la enzima responsable de la formación del AMP cíclico, la adenilciclase. La actividad del complejo N_s GTP termina con la hidrólisis del GTP por la enzima GTPasa.

En el caso de la unión de una hormona a los receptores denominados R_i induce una nueva conformación de la proteína N_i que también se activa al unirse al GTP pero en este caso se inhibe la enzima adenilciclase (19).

La concentración de AMP cíclico intracelular es de aproximadamente 10^{-6} M ésta aumenta en respuesta al estímulo hormonal y disminuye por efecto de enzimas denominadas fosfodiesterasas (3'5' cíclico 5' nucleotídico hidrolasas) que hidrolizan el enlace éster de la posición 3', formado 5' monofosfato (5'AMP). La fosfodiesterasa es estimulada por iones calcio produciendo la hidrólisis del AMP cíclico .La fosfodiesterasa se inhibe por un grupo de moléculas (xantinas) naturales como son el caso de la teofilina y la cafeína y algunas sintéticas como MIX. Estos alcaloides prolongan la actividad del AMP cíclico al disminuir su hidrólisis (20).

Una vez formado, el AMP cíclico internaciona con la enzima proteína cinasa presente en el citoplasma. La cinasa está formada por dos subunidades diméricas una reguladora y una catalítica (19). La unión del AMP cíclico a éstas provoca la disociación de las 2 subunidades. La subunidad catalítica es la responsable de los mecanismos de fosforilación de las proteínas celulares, sus acciones inmediatas son: Transporte de iones, metabolismo de carbohidratos y esteroidogénesis y sus acciones posteriores son: síntesis de RNA y proteínas, crecimiento celular, síntesis de DNA y división celular. En el testículo, una de las acciones de las proteínas cinasas dependientes del AMP cíclico es la estimulación de la actividad de ciertas enzimas, como las hidrolasas de los ésteres del colesterol libre que son utilizadas en la biosíntesis de la testosterona.

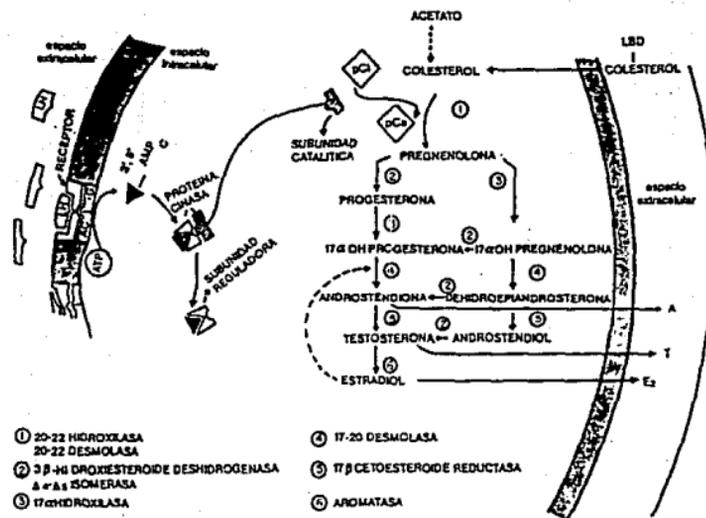


Fig. 5 Mecanismo de acción de LH a nivel de célula de Leydig para la inducción de síntesis de testosterona

5.5.- Testículo

Los testículos están localizados fuera de la cavidad abdominal en el escroto el cual no sólo sirve de protector sino también ayuda a mantener la temperatura testicular 2°C por debajo de la temperatura abdominal. Tres membranas comprenden la cápsula testicular a) Túnica vaginalis b) Túnica albugínea c) Túnica vasculosa . La extensión de la tunica albugínea en los testículos a manera de septo fibroso resulta en la formación de aproximadamente 250 lóbulos piramidales en donde cada uno contiene enrollados túbulos seminíferos. Estas estructuras constituyen del 80 al 90 de la masa testicular . Los túbulos seminíferos además de ser la parte más voluminosa de los testículos son responsables de la producción de aproximadamente 30 millones de espermatozoides por día durante la vida reproductiva del hombre.

5.5.1.- Estructura de los tubos seminíferos

Las células de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y fibroblastos están dispersos entre los túbulos seminíferos (19) (ver figura 3).

Los túbulos seminíferos contienen gran número de células germinales pequeñas denominadas espermatogonias, situadas en dos o tres capas a lo largo del borde externo del epitelio tubular.

Durante la primera etapa de la espermatogénesis las espermatogonias primitivas, localizadas inmediatamente junto a la membrana basal, se dividen para formar células algo más diferenciadas, las espermatogonias del tipo B. Después de varias divisiones adicionales estas células acaban por producir espermatocitos primarios de gran tamaño, que son los precursores de los espermatozoides. Durante varias semanas cada espermatocito primario se divide para formar dos espermatocitos secundarios, que después se dividen de nuevo para formar cuatro espermátides. Cada una de ellas cambia poco a poco durante las semanas siguientes hasta convertirse en un espermatozoide (vía mitosis). Cuando se divide cada espermatocito primario para formar dos espermatocitos secundarios, la división celular no es del tipo ordinario (mitosis), sino que se divide por meiosis quedando 23 cromosomas impares en cada espermatocito secundario.

A continuación, al dividirse cada espermatocito secundario para formar dos espermátides, se reproduce ahora cada cromosoma impar, y cada uno de los cromosomas nuevos pasa hacia una espermátide secundaria. Por tanto, cada espermátide retiene un juego completo de 23 cromosomas impares, a este proceso se le conoce como meiosis. El intervalo desde el principio de la espermatogénesis hasta la liberación de espermatozoides maduros en el lumen tubular es de aproximadamente 74 días (18).

Los túbulos seminíferos en el adulto tienen un promedio de 165 μ m de diámetro están compuestos por células de Sertoli y células germinales. Las células de Sertoli están en la base de la membrana y forman uniones con otras células de Sertoli. Estas uniones impiden el paso de proteínas del espacio intersticial al lumen de los túbulos seminíferos estableciendo una barrera. Las células de Sertoli rodean a las células germinales en desarrollo y proveen a estas un ambiente esencial para su diferenciación. Se ha observado que las células de Sertoli son las responsables del movimiento de las células germinales desde la base del túbulo hasta cerca del lumen para la liberación de espermatozoides maduros, también activan la fagocitosis de células dañadas.

Ante la respuesta a la FSH, las células de Sertoli secretan ABP que es una proteína con gran afinidad por los andrógenos. Por lo que provee una alta concentración de testosterona en el lumen tubular, lo cual es necesario para que se lleve a cabo de manera adecuada el proceso de espermatogénesis.

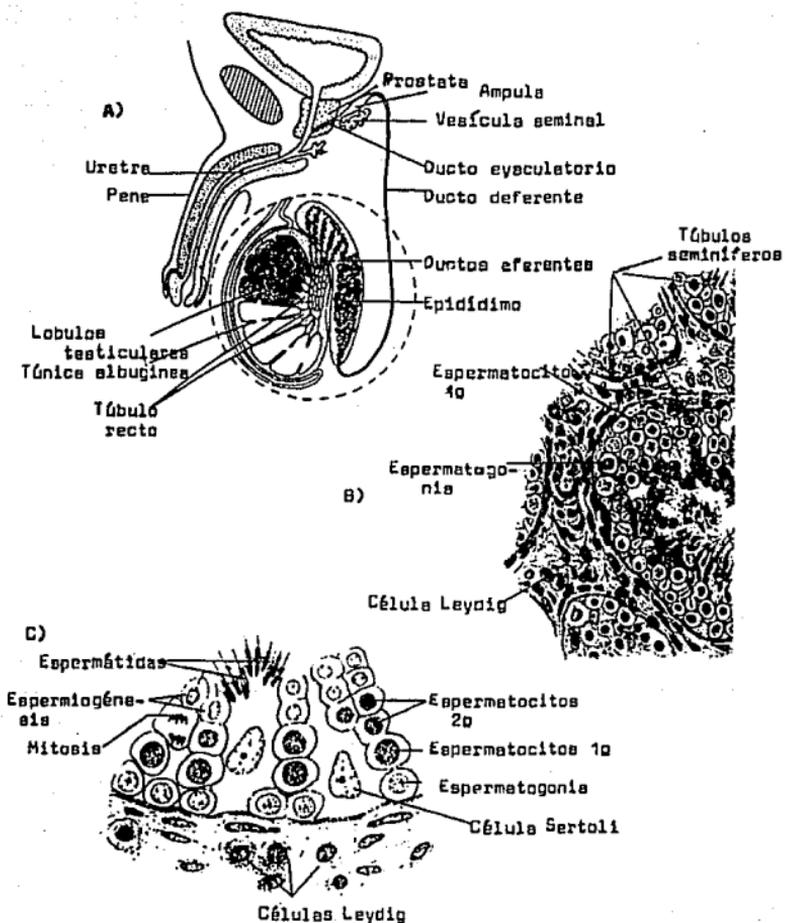


Fig. 3 A) Aparato reproductor masculino con testículo a diferente escala. B) Corte de testículo. C) Túbulo seminífero

Los espermatozoides son transportados a través de los ductos eferentes a un sólo tubo , el epidídimo por presión de fluidos testiculares , movilidad ciliar y contracción de los ductos eferentes, durante los aproximadamente 12 días que requiere para - transitar a través del epidídimo , el espermatozoide sufre cambios morfológicos y funcionales esenciales que le confieren la capacidad para fertilizar el óvulo . El espermatozoide almacenado en el epidídimo entra a los conductos deferentes, cuya longitud es de 35- 50 cm y por movimientos peristálticos empuja el contenido dentro del ducto eyaculatorio. Los ductos eyaculatorios reciben fluidos que provienen de las vesículas seminales y contienen sustancias como azúcares , proteínas y minerales (19). Estos ductos terminan en la uretra los espermatozoides que llegan a este punto no están listos para fecundar , necesitan un cambio que ocurre en el aparato reproductor femenino en donde adquiere la capacidad fertilizante (capacitación) (25).

(ver figura 3) Las células de Leydig que se encuentran en las áreas intersticiales rodeando a los túbulos seminíferos cuya característica de diferenciación con otras células son sus inclusiones de lípidos (ésteres del colesterol que son fuente para la biosíntesis de esteroides) al ser estimuladas por la LH secretan testosterona que es de importancia en la espermatogénesis.

Existen 3 esteroides de gran importancia en el testículo que son : testosterona, dihidrotestosterona y estradiol.

La testosterona es necesaria para que se lleve a cabo la

espermatogénesis además de proveer las características sexuales masculinas.

La dihidrotestosterona fomenta la espermatogénesis además de ser más activa que la testosterona.

El estradiol se debe a la transformación periférica de la testosterona y sólo el 10% es de origen testicular, además de ser clave en el control de retroalimentación de esteroides en el hipotálamo (19).

5.6.- Características morfológicas de las células esteroideogénicas

Las células de Leydig se originan a partir de células del mesénquima y se les encuentra en el tejido intersticial que rodea a los túbulos seminíferos.

Las células de Leydig son poligonales, de núcleo grande y ovoide, en el que se encuentran uno o dos nucleolos prominentes. El hallazgo estructural más importante en la ultraestructura de la célula de Leydig es el abundante retículo endoplásmico liso, lo que es característico de las células esteroideogénicas.

Las células de Leydig permiten la secreción aproximada de 10,800 moléculas de testosterona por segundo.

Las mitocondrias de las células de Leydig del humano y del roedor son de tamaño moderado, contienen láminas y cisternas tubulares características de las células productoras de esteroides.

Otro dato estructural característico de las células productoras de esteroides es la presencia de cuerpos o gotas de lípidos.

Las inclusiones de lípidos corresponden a ésteres de colesterol que al ser hidrolizados por esterases solubles, son fuente de colesterol libre para la biosíntesis de esteroides.

En el humano, cerca del 95 % de la testosterona circulante proviene de las células de Leydig (20).

5.7.- Biosíntesis de testosterona

La biosíntesis de novo de los andrógenos ,como la de todas las hormonas esteroides , se inicia a partir de acetato y utiliza invariablemente el colesterol como intermediario aunque debe señalarse que los órganos esteroidogénicos, que son los sustratos anatómicos en la biosíntesis de andrógenos, tienen además la capacidad de utilizar el colesterol circulante como precursor en la formación de hormonas con actividad androgénica.

El primer paso en la ruta de biosíntesis de los andrógenos lo constituye la conversión, a nivel mitocondrial de colesterol o pregnenolona , que tiene como paso limitante la hidroxilación enzimática en C-20 (configuración a). Como ya se mencionó , este paso limitante es selectivamente activado en el testículo del adulto por la LH de la hipófisis anterior , mientras que durante la vida embrionaria es activada por la hCG de origen trofoblástico. Aunque diferentes desde el punto de vista químico e inmunológico, ambas hormonas glicoprotéicas tienen un modo idéntico de acción, el cual es mediado por un receptor con gran afinidad para LH y /o hCG, localizados en la membrana plasmática de las células productoras de andrógenos.

La biotransformación de pregnenolona a androstenediona y testosterona en los mamíferos puede proceder a través de dos

diferentes rutas o vias metabolicas dependiendo del órgano endócrino y / o de la especie. Estas vías se han designado como $\Delta 5$ y $\Delta 4$ según la localización del punto de insaturación (doble enlace) de los compuestos intermediarios (ver figura 7).

Por medio de una serie de estudios metabólicos con esteroides isotópicamente marcados ,se ha podido establecer que la biosíntesis de testosterona , a partir de pregnenolona en las células de Leydig del testículo humano , opera fundamentalmente , aunque no en forma exclusiva,por la vía de los $\Delta 5$.El primer paso en esta secuencia biosintética es la 17α - hidroxilación de la pregnenolona que es inmediatamente seguida de la ruptura de su cadena lateral, un hecho que es mediado por la acción de la $17,20$ desmolasa y de la 17α -hidroxilasa (ver figura 7), la acción secuencial de estas dos enzimas microsomales dependientes de NADPH y oxígeno, condiciona la formación de dehidroepiandrosterona (DHA),un compuesto de 19 átomos de carbono (por la pérdida de la cadena lateral) que aún conserva el doble enlace entre los carbonos 5 y 6 ($\Delta 5$) y el grupo hidroxilo en el carbono 3 , presentes en la molécula de la pregnenolona.

La reducción en C-17 de la cetona de la dehidroepiandrosterona por acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa , localizada en el citosol y dependiente de NADP ,da lugar a la formación del $\Delta 5$ -androstendiol. Esta reacción enzimática es reversible y su dirección esta determinada por el pH.

El paso final lo constituye la biotransformación del $\Delta 5$ -

androstendiol a testosterona , que es catalizada por el sistema enzimático Δ 5-3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3-cetoesteroide Δ 5- isomerasa ,que se localiza en la fracción microsomal.

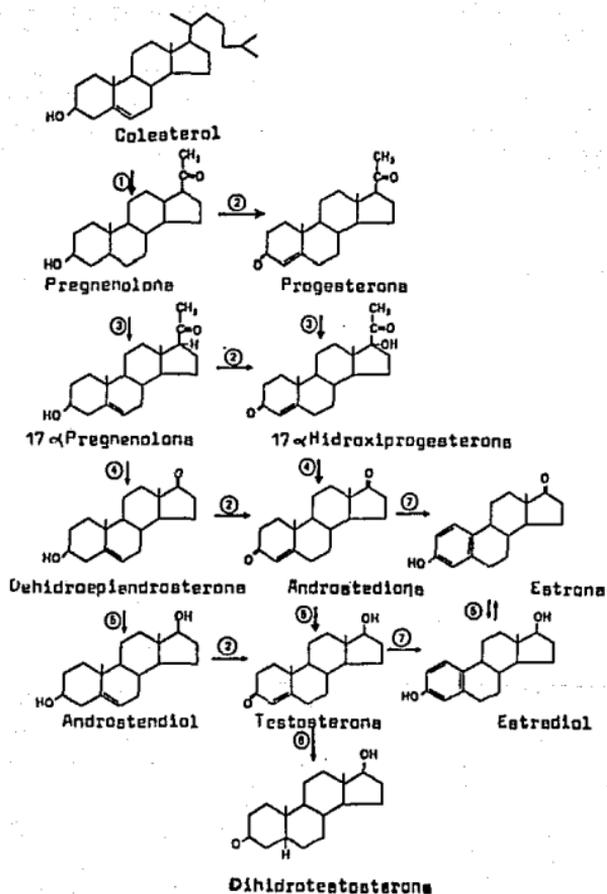
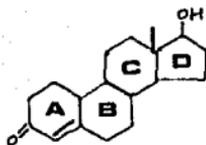


Fig. 7 Biosíntesis de testosterona ① 20,22-desmolasa ② 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Δ^5, Δ^4 -isomerasa, ③ 17-hidroxi laasa ④ 17,20-desmolasa, ⑤ 17-cetoreductasa, ⑥ 5 α reductasa, ⑦ aromatasa

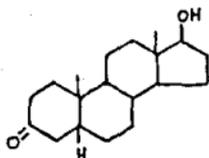
5.7.1 Metabolismo periférico de testosterona

Una vez que la testosterona ha sido secretada al torrente circulatorio , a través del cual alcanza su organo blanco , la molécula está expuesta a cambios en su estructura ,mediados por la acción de varios sistemas enzimáticos que influirán notablemente en la expresión de su actividad biológica. Estas modificaciones estructurales ocurren fundamentalmente en uno de los extremos de la molécula , el anillo A.(Por la importancia de su significado fisiológico nos referiremos a dos cambios metabólicos sobre la molécula de la testosterona,que ocurren (extragonadalmente) a nivel de su órgano blanco periférico) :

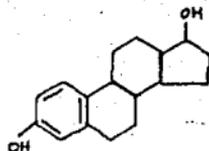
a) Los procesos de reducción el anillo A que conducen a la formación de 5α - dihidrotestosterona (DHT posee una potencia andrónica mayor que la testosterona por lo que llegó incluso a postularse que la testosterona era en realidad una prehormona) y otros metabolitos de gran potencia biológica y b) La aromatización de su anillo neutro A que conduce a la biosíntesis de estrógenos, el de mayor importancia estradiol que regula el control de retroalimentación de hormonas esteroideas en tejidos no-endócrinos (17).



TESTOSTERONA



DIHIDROTESTOSTERONA



ESTRADIOL

5.8.- Regulación hipotálamo-hipófisis-célula de Leydig

(ver figura 8) Como ya se mencionó el hipotálamo sintetiza a un decapeptido el GnRH y se secreta de forma pulsátil en la vena portal. Después de llegar a la hipófisis el GnRH se une a las gonadotropos y estimula la liberación de la FSH y LH a la circulación. La LH es tomada por las células de Leydig, donde se une a receptores específicos. Esto da lugar a la activación de la adenilciclase y a la generación de AMPcíclico y de otros mensajeros que su respuesta termina en la secreción de esteroides (T y E2). La elevación de estradiol tiene efecto inhibitorio en la hipófisis tanto del LH y FSH, mientras la testosterona a nivel de hipófisis inhibe a la LH pero estimula FSH. El efecto inhibitorio de los andrógenos en el hipotálamo es mediado por estradiol. La FSH se une a receptores específicos en la célula de Sertoli y estimula la producción de proteína de unión de andrógenos. La FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis, se ha visto que la maduración de los espermatozoides requiere no sólo FSH sino también testosterona. La mayor acción de la FSH en la espermatogénesis es vía la estimulación de proteínas de unión de andrógenos, que permite a una alta concentración intratubular de testosterona. Existe evidencia que otra sustancia, inhibina es secretada por células de Sertoli. Esta activa principalmente a nivel de la hipófisis, donde

inhibe la secreción de FSH . No se sabe si la inhibina ejerce una retroalimentación negativa en el hipotálamo . La testosterona , la dihidrotestosterona y estradiol son capaces de inhibir la secreción de FSH (19).

La consideración cuidadosa del mecanismo de retroalimentación negativa descrito, pone de manifiesto que el factor importante que debe someterse a regulación no suele ser la magnitud secretada de la hormona , sino más bien el grado de actividad del órgano blanco; por tanto , sólo cuando esta última se incrementa hasta un nivel apropiado , se volverá lo bastante poderosa la retroalimentación hacia la glándula para disminuir la secreción ulterior de la hormona .Si el órgano blanco reacciona pobremente a la hormona ,la glándula endócrina continuará secretándola hasta que el órgano blanco alcance por último el nivel apropiado de actividad , pero a expensas de una secreción excesiva de la hormona (18).

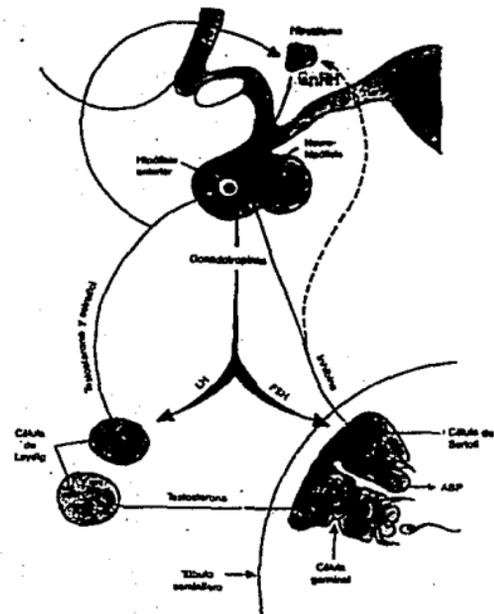


Fig. 8 Relación funcional del eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

5.9.- Patología

De acuerdo con la definición propuesta por el Programa de Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud , la infertilidad, es la incapacidad de la pareja para lograr el embarazo después de un año de búsqueda consciente del mismo . En un estudio proyectivo en aproximadamente 5000 parejas en diversas regiones del mundo , empleando como instrumento de evaluación un mismo protocolo, se estableció , que el 45% de las parejas estudiadas , la infertilidad era atribuible a disfunciones del factor masculino.

La investigación del varón infértil requiere de un proceso de sistematización, con el objeto de optimizar el tiempo y los recursos disponibles por el médico y el paciente para establecer el diagnóstico.

La estrategia para investigar el potencial del sujeto en estudio, se basa en los datos que se obtienen en los antecedentes personales y hereditarios, los hallazgos de la exploración clínica, y las pruebas de laboratorio.

El análisis del eyaculado es el punto principal para iniciar la integración de un diagnóstico descriptivo . Así dependiendo de las características organolépticas y microscópicas del semen , se clasifican las muestras y por lo tanto al sujeto de estudio.

Los parámetros de evaluación del eyaculado

incluyen ,volumen,color, turbidez, licuefacción,pH,concentración de iones , de azúcares , y de enzimas . En el análisis microscópico,la ausencia o la presencia de espermatozoides, su número total y relativo al volumen,su grado y porcentaje de motilidad , su pH ,su morfología y el porciento relativo al total de cada una de las formas, es lo que finalmente describe a una muestra de semen .Genéricamente se describen las características del eyaculado como sigue :

valores normales de las variables del semen
humano OMS (1987)

Volumen	>2ml
pH	7.2-7.8
Cuenta espermatozoides	>20x10 ⁶ ml
Motilidad	>50% grado III
Morfología	>50% formas ovales
Vitalidad	>50% formas vivas
Leucocitos	<1x10 ⁶ ml
Zinc	>2.4 µMol
Acido cítrico	>52 µMol
Fructosa	>13 µMol
Aglutinación	<10%

Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta para la correcta interpretación de un análisis del semen, es el tiempo y la

forma de colección de la muestra . Se deben hacer al sujeto de estudio, las siguientes recomendaciones generales:Tener abstinencia sexual de por lo menos 3 días previos a la colección de la muestra , obtener el semen por masturbación y no por coito interrumpido , colectar todas las fracciones del eyaculado en un frasco estéril de plástico , mantener el recipiente a temperatura ambiente y depositarlo en el laboratorio para su análisis no después de una hora de haber sido obtenida la muestra .

Debido a la gran variabilidad en las características del semen , es recomendable que el estudio del eyaculado se realice en por lo menos 3 ocasiones con un intervalo de 15 días entre cada una de ellas ,y que las conclusiones que se deriven del análisis sea un promedio de las observaciones. La nomenclatura de las alteraciones más frecuentes encontradas en el análisis del semen es la siguiente :

Normozospermia	eyaculado normal
Azospermia	ausencia de espermatozoides
Oligospermia	concentración espermática <20x10 ⁶ células
Astenospermia	<50% motilidad grado III
Teratospermia	<50% formas normales
Necrospermia	<50% formas vivas
Aspermia	ausencia de eyaculado

Y las posibles combinaciones de estos.

Para fines prácticos , se consideran tres aspectos como los

fundamentales en el estudio de la función reproductiva : 1) La integridad anatómica 2) La regulación endócrina y 3) La funcionalidad sexual (21).

Causas de infertilidad

Endócrinas :

Desórdenes hipotálamo-hipofisarios

Desórdenes testiculares

Defectos de acción androgénica

Hipertiroidismo

Hipotiroidismo

Insuficiencia adrenal congénita

Hiperplasia adrenal

Enfermedades sistémicas

Defectos en la espermatogénesis:

Síndrome de inmovilidad ciliar

Inducidos por drogas

Deficiencia en túbulos seminíferos

Obstrucción de ductos :

Congénita

Adquirida

Enfermedades de vesícula seminal

Enfermedades de próstata

Varicocele

Eyaculación retrógrada

Anticuerpos en espermatozoides plasma seminal

Defectos en el pene

Disfunción sexual

Idiopática (no se conoce su causa)

La oligospermia o azospermia de causa no conocida se asocia con valores basales hormonales normales . Dos subtipos se han descrito:

- 1) Bloqueo de maduración de células germinales
- 2) Hipospermatogénesis general.

El examen clínico no revela ninguna anormalidad ; el tamaño los testículos es normal, en la biopsia testicular, sólo una mínima hialinización peritubular o elementos normales peritubulares . Hipergonotropismo subclínico se presenta en el 30 % de los pacientes demostrando aumento exagerado de FSH y LH después de la administración exógena de GnRH.

Muchos tratamientos se han propuesto como:

- 1) Inducción de testosterona o algun andrógeno que provoque azospermia.
- 2) Administración de gonadotropinas o GnRH.
- 3) El uso de citrato de clomifeno o tamoxifen para estimular la secreción endógena de gonadotropinas.
- 4) Administración de dosis bajas de mesterolona (un andrógeno sintético oral).
- 5) El uso de un inhibidor como testolactona.

Se ha observado un aumento del 20% al 40 % de las cuentas espermáticas pero ninguno ha sido capaz de establecer los beneficios de los tratamientos.

Además en estos pacientes resulta de suma importancia la determinación de la actividad biológica de las hormonas hipofisarias durante ciertos períodos de tiempo ya que pueden existir alteraciones significativas en este parámetro cuando se comparan con los valores de los sujetos sanos.

6.- DISEÑO DEL EXPERIMENTO

6.1.-Cálculo del tamaño de muestra

6.2.-Pacientes

6.2.1- Criterios de inclusión

6.3.-Obtención de muestras

6.4.-Procesamiento de muestras

6.5.-Bioensayo en células de Leydig

6.5.1.-Esquema

6.6.-RIA

6.6.1.- Esquema

6.7.-Metodología estadística

6.7.1.- Descripción de variables

6.1.- Cálculo del tamaño de muestra

El cálculo de la muestra se obtuvo mediante siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

en donde n = tamaño de la muestra

z = coeficiente de confiabilidad

σ = desviación estándar de la muestra

d = intervalo de confianza

El valor de σ se estimó a partir de estudios semejantes publicados con anterioridad.

El valor de d se obtuvo de la siguiente formula :

$$d = z \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

en donde $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ es el error estándar tomado de esos estudios

y el valor de z es igual a 1.96 que corresponde al coeficiente de confiabilidad al 95 %.

Variables	z	σ	d	n
LH-B	1.96	2.73(mUI/ml)	1.4(mUI/ml)	15

6.2.- Pacientes

GRUPO 1: 15 Varones fértiles.

GRUPO 2: 15 valores estériles con oligoastenozoospermia idiopática.

Evaluados de acuerdo a los siguientes criterios:

Varón fértil: individuo sano que haya procreado un hijo en los 3 años previos al estudio y que el resultado de 2 espermato - bioscopías se encuentren dentro de los límites considerados como normales por la OMS.

Varón con oligoastenozoospermia idiopática: individuo sin patología aparente que comprometa el eje hipotálamo-hipófisis-testículo y que el resultado de 2 espermato bioscopías reporten concentración espermática menor a 20×10^6 cél./ml y movilidad celular menor a 40%

6.2.1.- Criterios de inclusión de los pacientes

(ambos grupos)

- 1.- Edad entre 25 y 40 años.
- 2.- Sanos de acuerdo a examen físico e historia clínica.
- 3.- Sin tratamiento terapéutico.
- 4.- Espermocultivo negativo.
- 5.- Obesidad no mayor al 30% del peso ideal.

Procedimiento:

Cada uno de los varones participantes , proporcionó 2 muestras de semen con un intervalo de 15 días, obtenidas por masturbación después de tres días de abstinencia sexual, a cada una se le realizó una espermotobioscopia, siguiendo los criterios de la OMS (3).

Para obtener las mediciones basales de LH bioactiva a cada paciente se le extrajeron 3 muestras de sangre con intervalos de media hora entre cada una , las cuales se configuraron para obtener los sueros , congelándose a -4°C para su posterior análisis.

6.3.- Obtención de las muestras

Los 30 pacientes se internaron en el Instituto Nacional de Perinatología, durante el periodo comprendido entre 20:00 hrs del viernes y las 20:00 hrs del sábado.

Los pacientes ingresaron una noche anterior al estudio, con el propósito de la adaptación física. La obtención del suero se efectuó a través de un catéter insertado en una de las venas cubitales, el estudio comenzó a las 8:00 a.m. del sábado, tomando 6 ml de sangre cada 10 min durante 12 hrs, durante este tiempo los pacientes se desplazaron libremente en el área e ingirieron sus alimentos normalmente, el estudio finalizó a las 20:00 p.m. del sábado.

Para evaluar la respuesta de la hipófisis al estímulo con GnRH en cuanto al incremento en la secreción de hormona luteinizante bioactiva (LHb), al término de las primeras 8 hrs de obtención de las muestras sanguíneas se administraron a los pacientes 2 dosis de 10 mg de GnRH por vía intravenosa, con un intervalo de 2 hrs entre cada una y se continuó con el muestreo de sangre durante 4 hrs más, con la misma periodicidad. Después de la recolección de muestras, los pacientes fueron dados de alta, previa valoración médica completa. El volumen total de sangre obtenido de cada paciente fue de 432 ml (9,10).

Conforme se fueron obtenidos las muestras , se fueron centrifugando para extraer los sueros ,los cuales se congelaron a -70°C en alícuotas de 1.5 ml aprox. de cada muestra hasta que se efectuó el análisis.

6.4.- Procesamiento de las muestras

Las 72 muestras cada una con su duplicado de un mismo paciente se analizaron en el mismo ensayo para eliminar la variación interensayo.

La concentración de LH bioactiva en suero, se evaluó utilizando el bioensayo de la producción de testosterona , por células intersticiales de rata (TCIR) , seguida de la determinación de testosterona por RIA .(ver anexo 1 y 2).

6.5.- Bioensayo de LH en células de Leydig

Para el bioensayo de LH se siguió la técnica descrita por Dufau y col. (1976). El ensayo consiste en extirpar quirúrgicamente los testículos de 5 ratas macho adultas (3 meses o de 250g aprox.) a los cuales se les quita la túnica albugínea que los envuelve y posteriormente se disecciona y elimina la arteria principal. (ver anexo 1)

Se digieren en medio Dulbecco con albúmina 0.1% y colagenasa (de *Clostridium histolyticum* 14.88 U/ml) en un baño de agua a 37 °C con sistema de agitación, de 180 ciclos/min durante 15 min. Una vez transcurrido este tiempo, se filtra con una malla de nylon (250µm) para eliminar los túbulos seminíferos y el resto de tejido no disgregado y se lava añadiendo el doble de medio Dulbecco para eliminar el exceso de colagenasa, y se centrifuga a 150 Xg durante 10 min.

Finalmente el precipitado se resuspende en medio que contiene 0.125 µm de MIX, guardando una proporción de 1ml de medio por cada 0.1 ml de paquete celular aproximadamente, y se filtra nuevamente con una malla de nylon (100µm) para eliminar los acúmulos celulares.

Para contar las células y determinar su viabilidad, se toman 200 ul de la suspensión celular, previamente diluida 1:10, se adicionan

0.3 ml de medio y se tifen con 500 μ l de una solución azul trypano al 0.4 % y se cuenta en una cámara de Neubauer.

La suspensión final se diluye para tener una concentración aproximada de $1-2 \times 10^6$ células/ml.

Para la incubación se toman alícuotas de 100 μ l de la suspensión celular previamente filtrada, y se colocan en frascos de 10 ml que contienen medio Dulbecco con albúmina 1% y MIX . 1 mM, a cada frasco se añaden 100 μ l de cada muestra de suero problema o estándar , el volumen final de incubación tanto para las muestras como para los estándares y los controles es de 2.2 ml, cada muestra y estándar se elabora por duplicado.

Para la curva estándar de LH se usó NIDDK-hLH-1-3 en PBS a diferentes concentraciones 5,15,25 y 50 mUI/ml , como se indica en el anexo 1.

A cada estándar se le agregó suero inactivo para mantener las mismas condiciones que en el suero sanguíneo.

Se usó suero de mujer con concentración baja de LH , como control ,el cual se colocó por duplicando en 2 distintas posiciones en el ensayo.

La incubación se realiza en un baño a 37°C con agitación de 60 ciclos /min, durante 3 hrs., una vez transcurrido este tiempo los medios se centrifugan a 2500 X g durante 15 min y el sobredante se guarda a -20°C para posteriormente determinar la concentración de testosterona por RIA.

La concentración de LH de las muestras problema, se determina de la curva estándar (testosterona vs LH). La sensibilidad que tiene el bioensayo es de 0.4 mUI de LH.

Se llevó a cabo un control de calidad con los resultados de la LH en los sueros control, para conocer las variaciones intra e interensayo. Se calcula la media de los valores del suero control, si más de uno de los valores se alejan del valor promedio (calculado a partir de 10 bioensayos previos) por más de 2 desviaciones estándar, se rechaza el bioensayo y se repite.

El análisis también se rechaza cuando el coeficiente de variación intraensayo es mayor del 20 % (11), ver figura 1.

(ver técnica anexo 1)

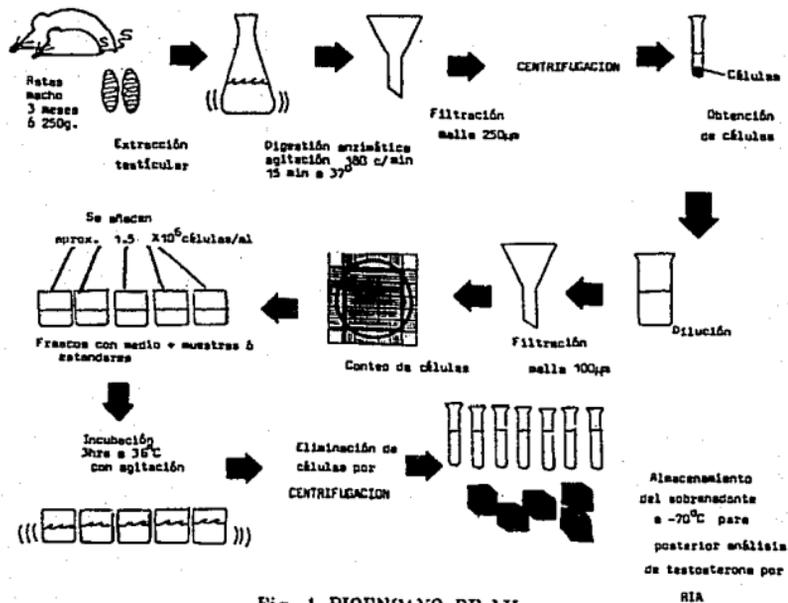


Fig. 1 BIOENSAYO DE LH

6.6.- RIA

El radioinmunoensayo se basa en la competencia entre un antígeno marcado con un isótopo radiactivo y otro que no lo es de la misma naturaleza química, por sitios específicos de anticuerpo, formando complejos antígeno-anticuerpo. Esta reacción se describe por la siguiente expresión:

antígeno + anticuerpo específico-----> complejo antígeno
anticuerpo

Ag + Ac -----> AgAc

antígeno radiactivo + anticuerpo específicos -----> complejo
antígeno
anticuerpo
radioactivo

Ag* + Ac -----> Ag*Ac

La fracción Ag-Ac* es dependiente de la cantidad de antígeno no radiactivo. La concentración de antígeno en muestras desconocidas se determina midiendo la fracción Ag-Ac* obtenida por incubación de varias cantidades conocidas de antígeno no radiactivo con la misma cantidad de anticuerpo (curva estándar).

La sensibilidad es del orden de 10 fmoles/litro. La especificidad es dependiente de la capacidad del antisuero para reconocer la

estructura del antígeno (13). (ver anexo2)

La radiactividad se detecta con un contador de radiciones gamma.

En el presente estudio se trata de medir la testosterona (producida por las células de Leydig en el bioensayo de LH)usando un antígeno específico para éste.

Como trazador radioactivo se utiliza testosterona marcada con I^{125}

La única marca que se detecta es la que proviene del complejo anticuerpo-testosterona marcada , siendo la cantidad de radioactividad medida en CPM, inversamente proporcional a la testosterona presente en las muestras problema.

Para conocer el porcentaje de unión del anticuerpo así como la unión inespecífica de la marca se colocan los siguientes controles:

Cuentas totales (CT) :cantidad total de marca en CPM (T*) que se añade ,es la misma en todos los tubos del RIA.

Unión inespecífica (UNE) : cantidad de T* que permanece en el tubo unida de manera inespecífica ya que no está presente el anticuerpo Esta debe ser menor del 5% de la CT , debe ser restada a todas las otras CPM.

Unión máxima (Bo) : cantidad total de T* que se unió al anticuerpo, aqui no existe testosterona fría.El Bo debe ser 30-60 % de la CT.

Se elabora una curva estándar concentraciones de 0,2,1,4,8 y 16 ng/ml de Testosterona.

Se añade marca y sueros de acuerdo con la técnica (ver anexo 2).

Las CMP de cada estándar es inversamente proporcional a su concentración de testosterona.

El cálculo para obtención de las concentraciones problema consiste en hacer una transformación logística como sigue :

$$Y = \frac{100 (b - UNE)}{(Bo - UNE)}$$

$$\text{Logit } Y = \text{Ln } (Y / 100 - Y)$$

en donde b son las CPM de cualquier estándar o problema, Bo es la unión máxima en CPM y UNE es la unión inespecífica también en CPM, los datos se grafican de acuerdo a la fórmula siguiente :

$$\text{Logit } Y = m \log x + a \dots\dots\dots 1$$

X = Conc. de testosterona de los problemas

La concentración de testosterona de los problemas se calculan por medio de la curva de regresión 1 en donde se interpolan los datos de Logit Y previamente calculados para cada muestra desconocida (14).

Todos los cálculos se realizaron con ayuda de un gran programa para computadora PC IBM compatible denominado RIA-logit. (ver figura 2).

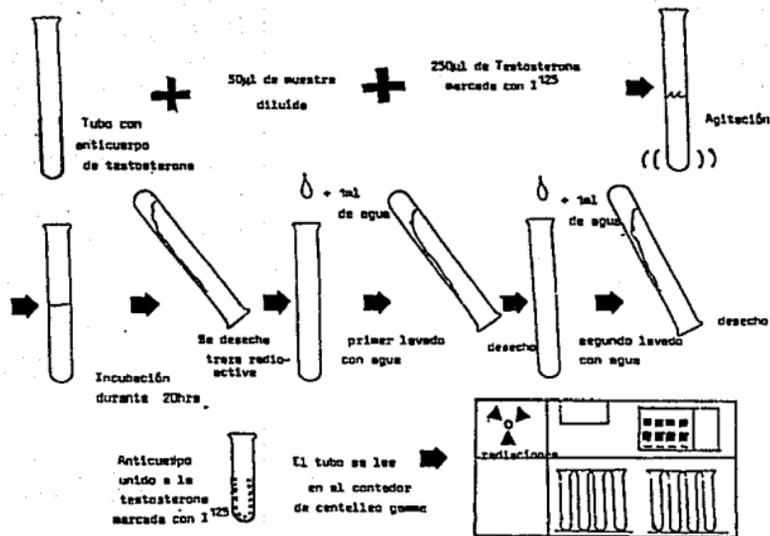


Fig. 2 RADIOINMUNOANALISIS

6.7.- Metodología estadística

Los métodos estadísticos usados para el siguiente trabajo fueron : La prueba de rangos con signo de Wilcoxon y la prueba de Mann Whitney para dos muestras independientes , las cuales están dentro del grupo de pruebas No Paramétricas. Las pruebas No Paramétricas son técnicas alternativas para datos que no dan supuestos de normalidad y son de utilidad para tamaños de muestra pequeños como en este caso.

La prueba de Wilcoxon es una prueba para datos apareados , adecuada para el caso de dos medianas en un mismo individuo : que en este trabajo corresponden a antes y después de recibir una dosis de GnRH .

La prueba de Mann Whitney es también una prueba de rangos para comparar dos poblaciones vía sus medianas , por lo cual en este caso se usó para comparar la población de enfermos con la de sanos.

La descripción de las pruebas se da a continuación :

PRUEBA DE RANGOS DE WILCOXON

Esta prueba se usa cuando se tienen observaciones apareadas $(x_1, y_1); (x_2, y_2); \dots (x_n, y_n)$ de una variable donde :

x : es la variable antes de la primera inyección con GnRH

y : x es la variable después de la primera inyección con

GnRH.

Se calculan los cambios de antes a después es decir para cada pareja (X_i, Y_i) , se calcula $D_i = Y_i - X_i$ y se asignan rangos a los valores absolutos de las D_i 's. Los supuestos de esta prueba son :

- 1) Cada D_i es una variable aleatoria continua
- 2) La distribución de cada D_i es simétrica
- 3) Las D_i son independientes
- 4) Las D_i tiene la misma mediana
- 5) La escala es la menos de un intervalo en las D_i

Las hipótesis o contrastes de hipótesis factibles son sobre la mediana de las D_i 's

H_0 = hipótesis nula H_a = hipótesis alternativa MD = Medianas

- A) $H_0 : MD=0$ VS $H_a : MD \neq 0$
- B) $H_0 : MD \leq 0$ VS $H_a : MD > 0$
- C) $H_0 : MD \geq 0$ VS $H_a : MD < 0$

donde en A , se tiene el caso bilateral y en B y C los casos unilaterales . La hipótesis alternativa en A puede interpretarse como "Las X son distintos de la Y es decir , hay cambios de antes a después de la inyección ," en el caso de B como "Las Y son mayores que las X o sea existe respuesta al momento de la inyección" y en el caso C como "Las X son mayores que las Y por tanto no hay respuesta"

En esta prueba desaparecen los empates es decir los casos en que $X_i = Y_i$.

Ahora bien, si se define R_i (rango) como :

$R_i = 0$ si $Y_i < X_i$ ($D_i < 0$)

rango asignado a (X_i, Y_i) si $Y_i > X_i$ ($D_i > 0$)

El estadígrafo de prueba es $W = R_i$

el cual se compara con los valores tabulados de Wilcoxon para decidir si se rechaza o no la hipótesis nula elegida.

PRUEBA MANN WHITNEY

Esta prueba se utiliza para comparar dos poblaciones independientes usando sus rangos. El estadístico es la suma de los rangos de una de las muestras, después de que los rangos han sido asignados a las dos muestras combinadas es decir, se tienen dos muestras: $X_1, X_2 \dots X_n$ de una población y $Y_1, Y_2 \dots Y_n$ de otra población. Se asignan rangos $1, 2, \dots, n + m$ a las observaciones. Sean $R(X_i)$ y $R(Y_i)$ los rangos asignados a X_i y Y_i respectivamente.

Las suposiciones son:

- 1) Ambas muestras son independientes
- 2) Las muestras son variables aleatorias continuas
- 3) La escala de medición es la menos ordinal

Las hipótesis factibles de probarse son:

H_0 = hipótesis nula H_a = hipótesis alternativa

- A) $H_0 : M_X = M_Y$ VS $H_a : M_X \neq M_Y$
B) $H_0 : M_X \geq M_Y$ VS $H_a : M_X < M_Y$
C) $H_0 : M_X \leq M_Y$ VS $H_a : M_X > M_Y$

En el caso de A, se tienen caso bilateral, la hipótesis alternativa se puede interpretar como las dos poblaciones son independientes.

El estadígrafo de prueba es:

$$T = \frac{R(X_i) - \frac{n(n+1)}{2}}$$

el cual al calcularse se compara con los valores tabulados de Mann-Whitney para decir si se rechaza o no la H_0 de la hipótesis elegida y el nivel de significancia usado.

6.7.1.- Descripción de variables

En el presente trabajo , se llevó acabo un análisis estadístico (Prueba de Mann Whitney) de las muestras basales anteriores al estudio (ver 6.6) del promedio de los duplicados entre pacientes sanos y enfermos.

A continuación se presentan las tablas de relización de los mismos.

BASALES

ENFERMOS	SANOS	R(e)	R(S)
4.3756		1	
5.8927		2	
	6.2583		3
	7.3147		4
	7.5898		5
8.0359		6	
	8.5449		7
8.5565		8	
	9.0153		9
10.5787		10	
11.0907		11	
	11.3978		12
11.995		13	
	12.0844		14
	12.2604		15
	13.3135		16
	13.7542		17
	14.1674		18
	15.5603		19
	15.7238		20
17.9936		21	
18.3456		22	
19.4462		23	
21.0864		24	
21.1888		25	
	23.0419		26
24.2621		27	
	25.0667		28
27.0697		29	
	SUMA		213
	TC		108
	TALFA		60
	T1-ALFA/2		150
	NO SE RECHAZA		

Al término del estudio , se realizaron 6 pruebas de Wilcoxon para los casos que se describen a continuación para X y Y tanto en muestra de enfermos como en la de sanos , es decir , 12 pruebas en total.

Caso 1.- Cuando X: LHBio antes de estimular con GnRH
Y: LHBio 10 min. después de la primera inyección

Caso 2.- Cuando X: LHBio antes de estimular con GnRH
Y: LHBio 20 min. después de la primera inyección

Caso 3.- Cuando X: LHBio antes de estimular GnRH
Y: LHBio una hora después de la primera inyección

Caso 4.- Cuando X: LHBio del punto máx. antes de estimular con GnRH
Y: LHBio del punto máx. después de estimular con GnRH.

Caso 5.- Cuando X: LHBio del punto mín. antes de estimular con GnRH
Y: LHBio del punto mín. después de estimular con GnRH.

Caso 6.- Cuando X: LHBio del punto máx. en el primer estímulo
Y: LHBio del punto máx. en el segundo estímulo

A continuación se presentan las tablas de realización de los mismos.

Se llevaron a cabo 5 pruebas de Mann Whitney para comparar sanos (Y) y enfermos (X), Los casos se describen a continuación:

CASO 1.- X:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a los 10 min. después en los pacientes enfermos.
Y:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a los 10 min. después en los pacientes sanos.

CASO 2.- X:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a los 20 min. después en los pacientes enfermos.
Y:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a los 20 min. después en los pacientes sanos.

CASO 3.- X:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a la hora después en los pacientes enfermos.
Y:Dif. entre el punto antes de la primera inyección y a la hora después en los pacientes sanos.

CASO 4.- X: Dif. entre el punto máx. antes de estimular y el punto máx. después de estimular en pacientes enfermos.
Y:Dif. entre el punto máx. antes de estimular y el punto máx.antes de estimular y el punto máx.después de estimular en pacientes sanos.

CASO 5.- X: Dif. entre el punto mín. antes de estimular y el punto mín. después de estimular en pacientes enfermos.
Y: Dif. entre el punto mín. antes de estimular y el punto mín. después de estimular en pacientes sanos.

CASO 6.- X:Dif.entre el punto máx. del segundo estímulo y el primero en enfermos.
Y:Dif.entre el punto máx. del segundo estímulo y el primero en sanos.

A continuación se presentan las tablas de realización de los mismos.

AGUIRA MARR WITNEY

t 8:00-7:50

ENFERMOS	SANOS	R(e)	R(s)
7.88			1
17.15			2
	18.57		3
	18.65		4
	19.03		5
	21.5		6
	24.79		7
	25.07		8
25.49			9
27.09			10
	28.19		11
	31.67		12
	37.54		13
38.91			14
40.78			15
	41.77		16
41.97			17
	45.55		18
	49.33		19
52.65			20
52.86			21
	58.39		22
	59.5		23
	70.25		24
79.44			25
87.76			26
99.6			27
	SUNA		187
	TC		109
	T ALFA/2		50
	T 1-ALFA/		130
	NO RECHAZO		
M(e)	41.375		
r(s)	31.679		

t 8:10-7:50

ENFERMOS	SANOS	R(e)	R(s)
18.09			1
	18.7		2
	25.1		3
	29.83		4
36.27			5
37.56			6
	39.19		7
	39.83		8
	40.64		9
	44		10
	47.04		11
	48.65		12
	49.66		13
50.31			14
	51.71		15
	58.73		16
	64.84		17
65.65			18
73.56			19
	76.1		20
	79.35		21
	80.3		22
	84.63		23
	89.31		24
103.83			25
	103.96		26
105.73			27
172.67			28
	SUNA		215
	TC		124
	T ALFA/2		55
	T 1-ALFA		140
	NO RECHAZO		
M(e)	73.56	M(s)	43.85

t 8:50-7:50

ENFERMOS	SANOS	R(e)	R(s)
19.56			1
	16.22		2
	15.83		3
	22.36		4
23.41			5
23.54			6
	24.42		7
	25.13		8
	25.72		9
	31.47		10
34.16			11
	35.21		12
35.48			13
35.51			14
	36.16		15
	49.1		16
41.92			18
	42.7		19
45.46			20
	56.03		21
	56.35		22
	73.97		23
	80.05		24
81.93			25
82.24			26
100.13			27
105.04			28
136.69			29
	SUNA		239
	TC		134
	T ALFA/2		60
	T 1-ALFA/		150
	NO RECHAZO		
M(e)	41.01	M(s)	35.21

PRUEBA MANN WITNEY

MAXIMOS ENFERMOS SANOS				MINIMOS ENFERMOS SANOS				MAX 1Y 2 ENFERMOS SANOS			
	R(e)	R(s)			R(e)	R(s)		R(e)	R(s)		
7.2		1		-2.22				-0.24		0	
10.26			2	3.27				0.89			2
20.38		3		4.78				1.85		3	
25.64			4	7.66				-1.89		0	
26.26			5		9.98				2.15		5
29.69			6		12.86				2.35		6
31.52			7		13.32			2.7		7	
34.08			8	15.23					3.46		8
35.43		9			15.54			5.55		9	
35.89			10		16.97			-6.45		0	
38.89			11		18.78			6.82		11	
39.15		12			19.36				-7.13		0
40.97		13		19.63					8.44		13
41.21			14		22.25			8.49		14	
45.58			15		22.61			12.18		15	
57.99		16			24.38				12.65		16
58.64		17			25.36			-12.71		0	
62.19			18	25.46					12.71		17.5
67.81		19		25.84					12.72		19
71.81			20	27.22					15.47		20
76.63		21		30.92					16.32		21
87			22	33.12					-16.93		0
92.7			23		34.04				19.7		23
93.32		24		35.75					20.02		24
94.86		25			38.55				-26.85		0
95.3		26		41.14				45.99		26	
100.23			27		49.56			50.04		27	
140.74		28		52.3				69.91		28	
218.72		29			60.81			-96.02		0	
SUMA		243		SUMA		208		SUMA		140	
TC		138		TC		103		TC		35	
T ALFA/2		60		T ALFA/2		67		T ALFA/2		69	
T 1-ALFA/		150		T 1- ALFA		143		T 1-ALFA/		150	
NO RECHAZO				NO RECHAZO				RECHAZO			
M(e)	67.81	M(s)	38.89	M(e)	25.65	M(s)	22.25	M(e)	7.65	M(s)	12.71

7.- RESULTADOS

7.1- Gráficas

7.1.1- Curva estándar promedio de RIA

7.1.2- Curva estándar promedio de LHbio

7.1.3- Gráfica promedios basales

7.1.4- Gráficas pacientes sanos

7.1.5- Gráficas pacientes enfermos

7.2- Coeficientes de Variación

7.3- Descripción de resultados

CURVA ESTANDAR PROMEDIO RIA

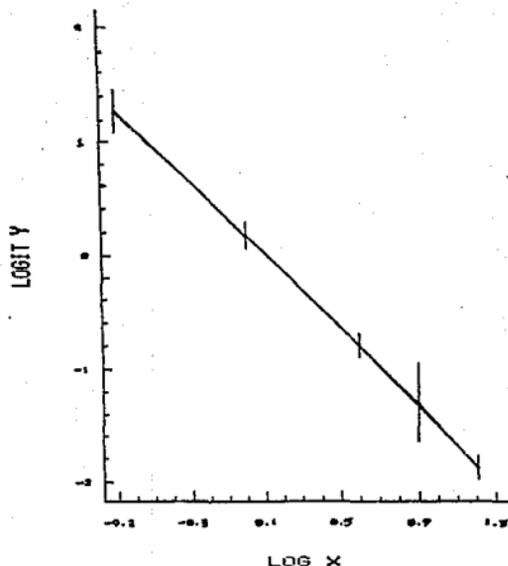


Fig. 7.1.1

Cada punto de la curva representa el promedio y desviación estandar de 58 radioinmunoanálisis. Los valores de logit se calcularon como se describe en el capítulo 6.6. Las concentraciones de Testosterona (x) empleadas fueron: .2, 1, 4, 8, 16 ng/ml. Los valores de $m = -1.6534 \pm 0.1039$, $b = 0.1708 \pm 0.1051$ y $R = -0.9978 \pm 0.0028$.

La curva anterior es una representación de la forma en que se comportaron cada una de las curvas estándar del RIA y coincide con la reportada en la bibliografía, en la figura 7.1.2 que es la curva estándar del bioensayo se observa un aumento proporcional de testosterona al aumento de LHbioactiva y tiene a saturarse después de los 30 mUI/ml LHbio .

En la gráfica 7.1.3 que muestra las mediciones basales previas al estudio en donde la cantidad de LHbioactiva tanto en los pacientes sanos como enfermos es muy homogénea, no hay diferencias. Estas mediciones se hicieron con la finalidad de observar lo difícil que ha sido elucidar esta enfermedad y esto también lo demuestran las gráficas de pulsatilidad de cada paciente, pues éstas son muy distintas inclusive hay diferencias entre pacientes sanos y enfermos, la diferencia es más notable en los enfermos.

Se intentó la posibilidad de hacer subgrupos de los grupos ya establecidos, pero como la cantidad de pacientes era muy pequeña pues no es estadísticamente significativo y no se llevó a cabo este procedimiento.

CURVA ESTANDAR PROMEDIO LHBIO

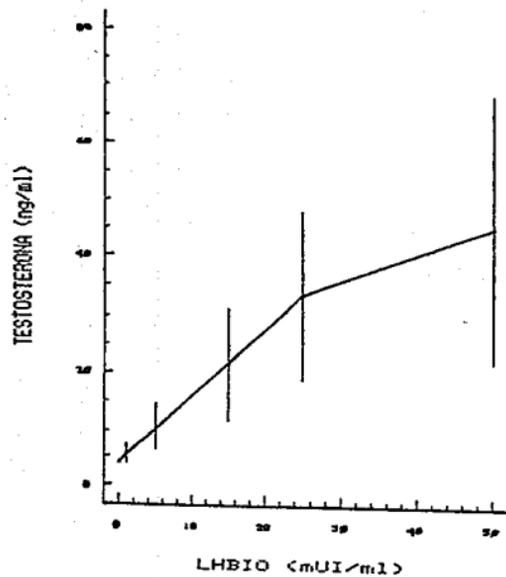


Fig. 7.1.2

Cada punto de la curva representa el promedio y desviación estandar de cada duplicado de 28 bioensayos, vease capítulo 6.4

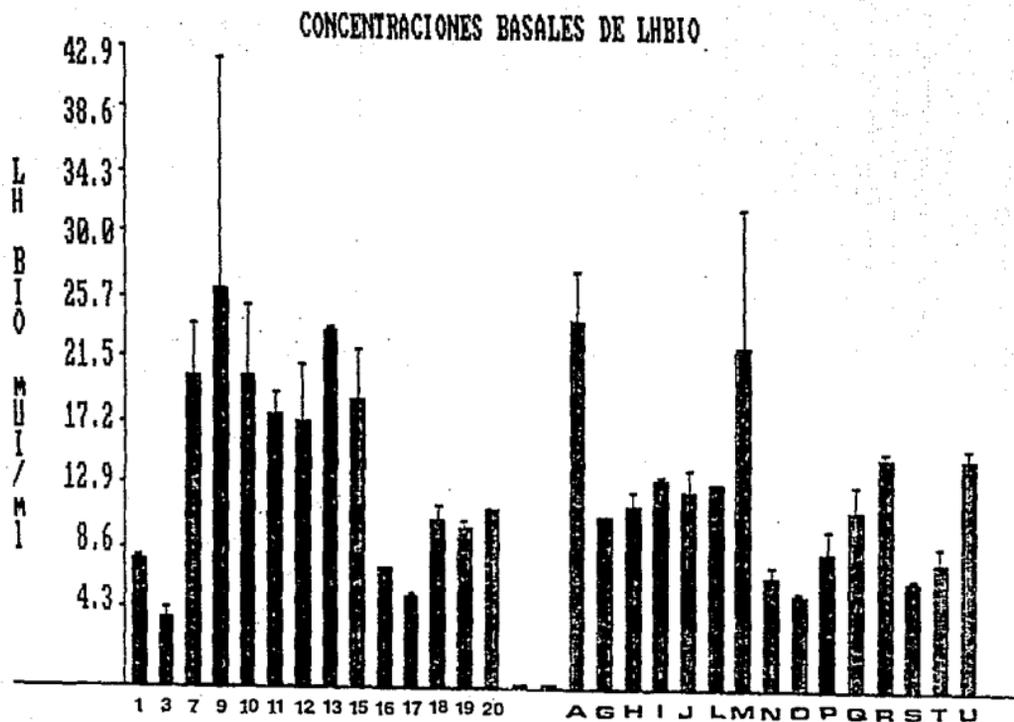
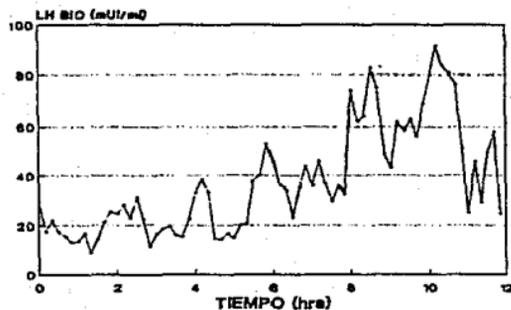


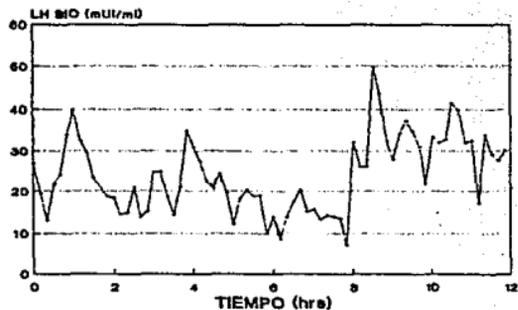
Fig. 7.1.3

Las barras representan la concentración de LH bioactiva basal en pacientes enfermos (números) y en pacientes sanos (letras) véase capítulo 6.2.1. Cada valor indica el promedio y la desviación estandar de los duplicados en el bioensayo.

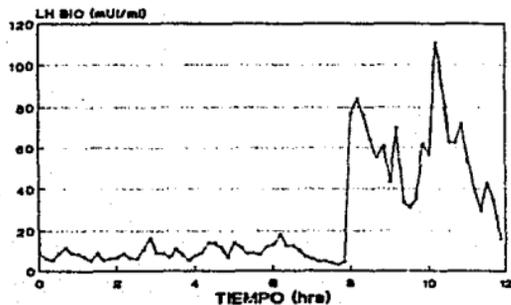
PACIENTE "A" LHbloactiva



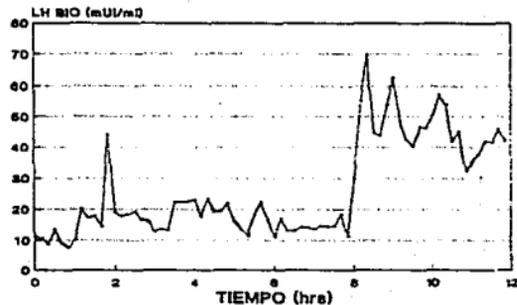
PACIENTE "G" LHbloactiva



PACIENTE "H" LHbloactiva

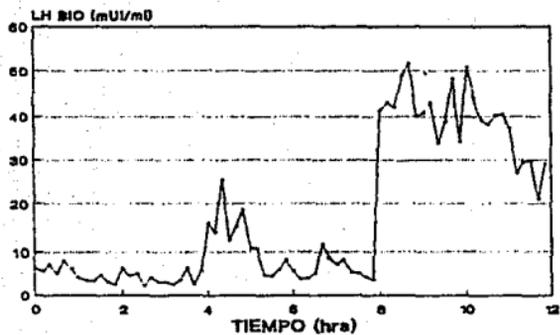


PACIENTE "I" LHbloactiva

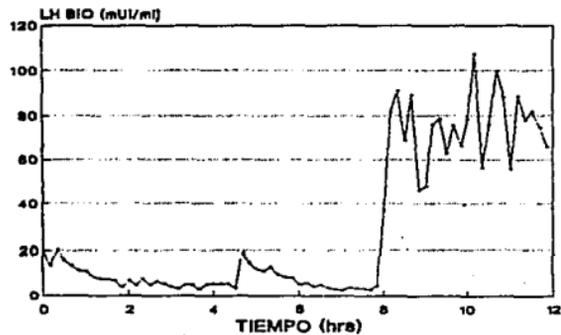


7.1.4 GRAFICAS PACIENTES SANOS

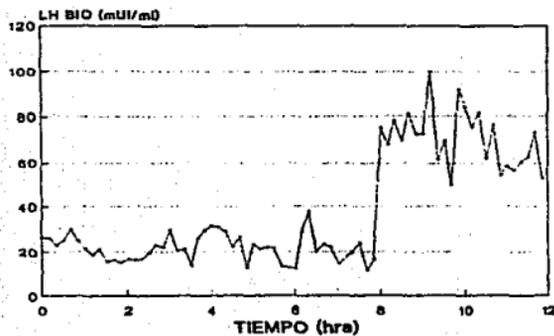
PACIENTE "J" LHbloactiva



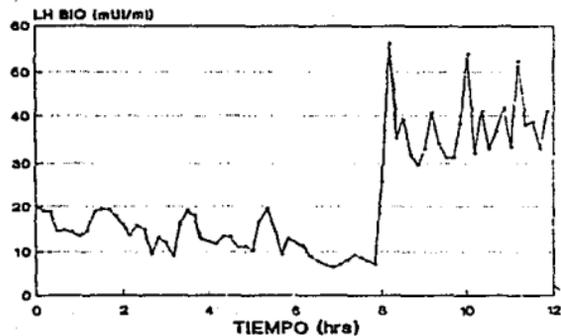
PACIENTE "L" LHbloactiva



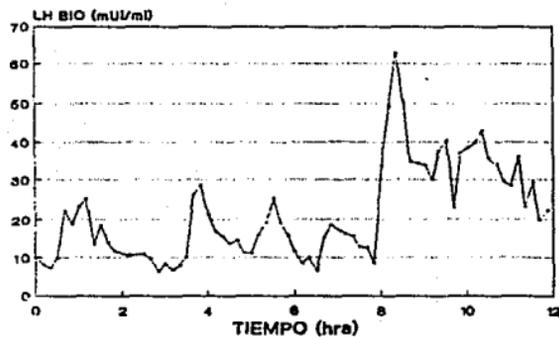
PACIENTE "M" LHbloactiva



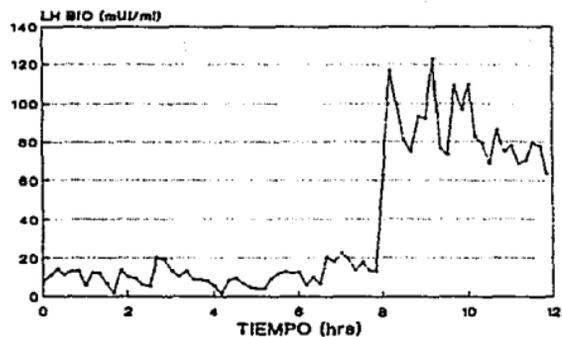
PACIENTE "N" LHbloactiva



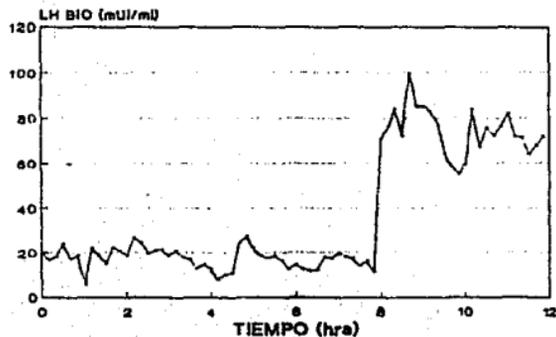
PACIENTE "O" LHbloactiva



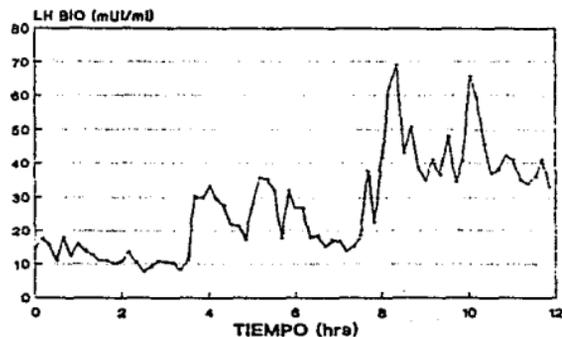
PACIENTE "P" LHbloactiva



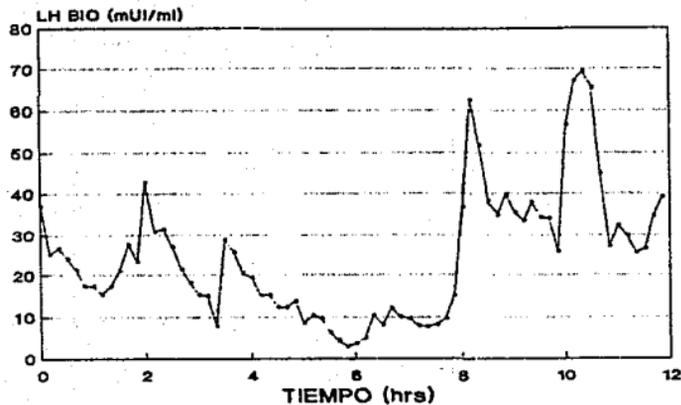
PACIENTE "R" LHbloactiva



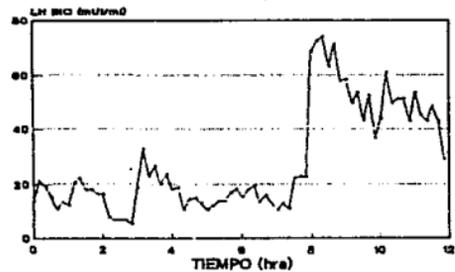
PACIENTE "Q" LHbloactiva



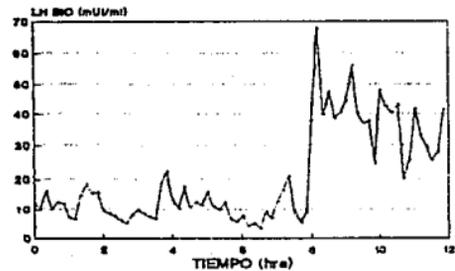
PACIENTE "S" LHbloactiva



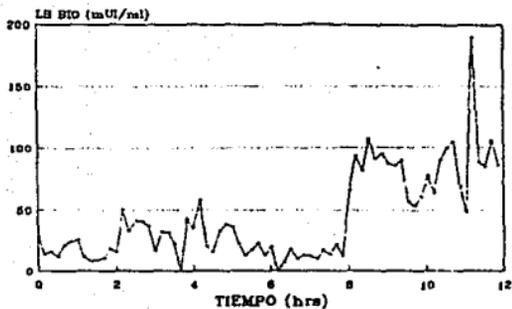
PACIENTE "U" LHbloactiva



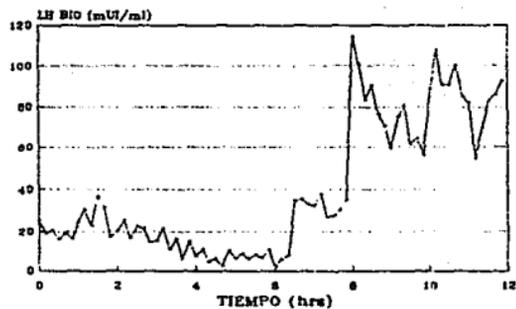
PACIENTE "T" LHbloactiva



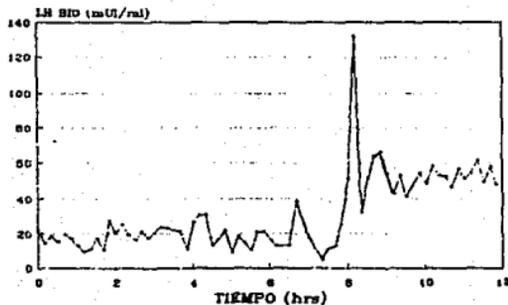
PACIENTE "1" LHbioactiva



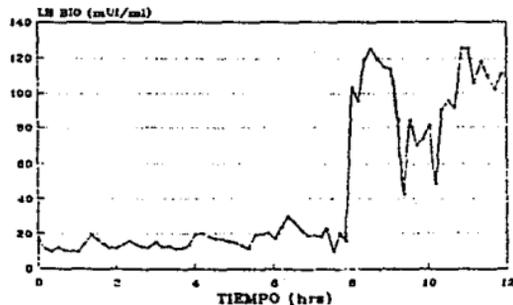
PACIENTE "3" LHbioactiva



PACIENTE "7" LHbioactiva

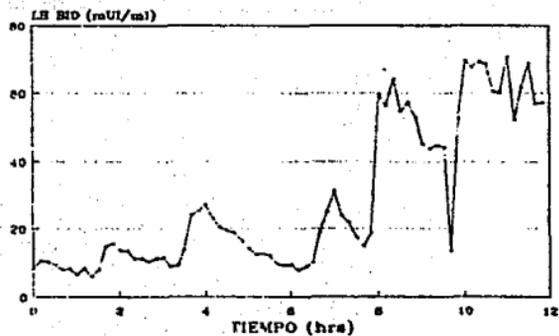


PACIENTE "9" LHbioactiva

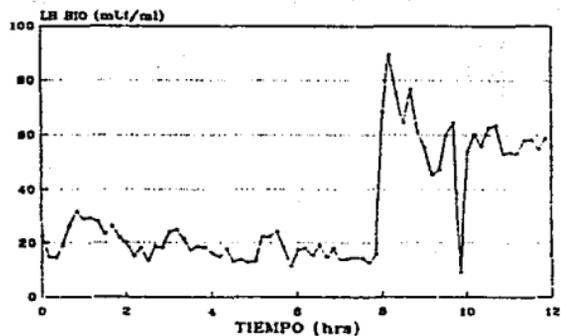


7.1.5 GRAFICAS PACIENTES ENFERMOS

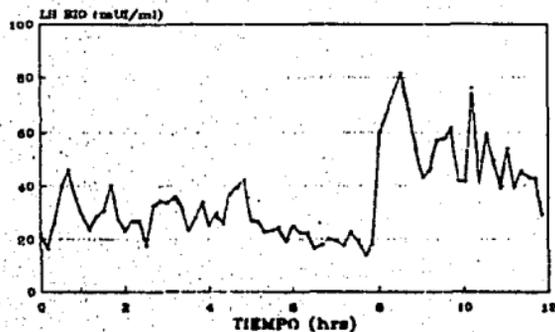
PACIENTE "10" LHbioactiva



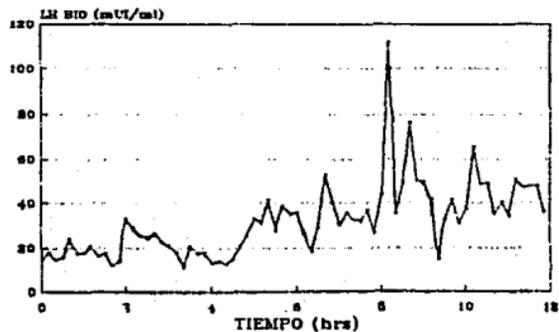
PACIENTE "12" LHbioactiva



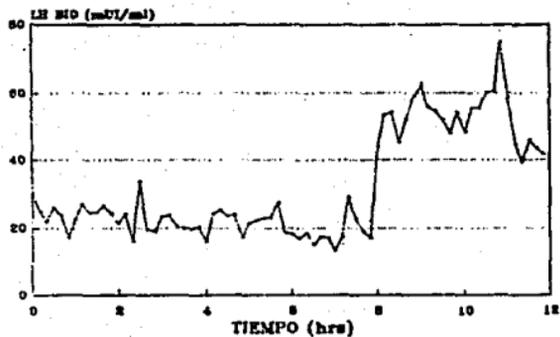
PACIENTE "13" LHbioactiva



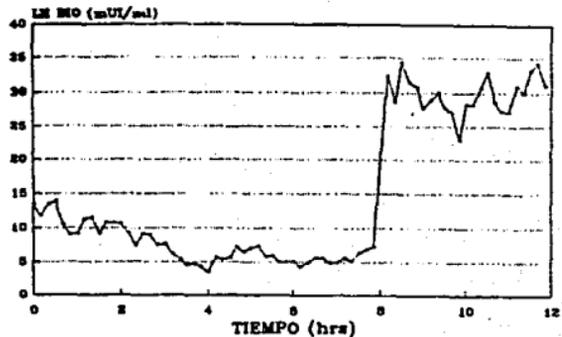
PACIENTE "15" LHbioactiva



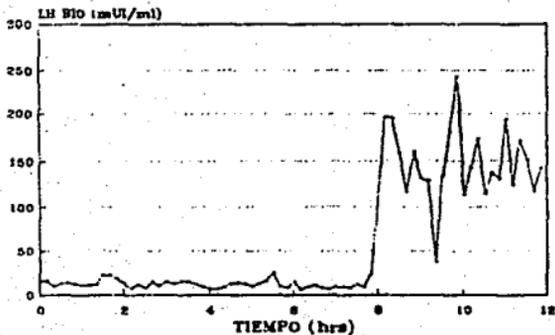
PACIENTE "11" LHbioactiva



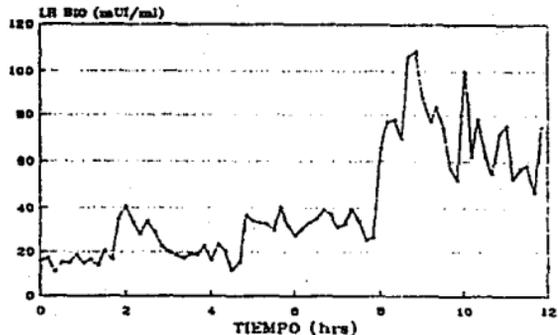
PACIENTE "16" LHbioactiva



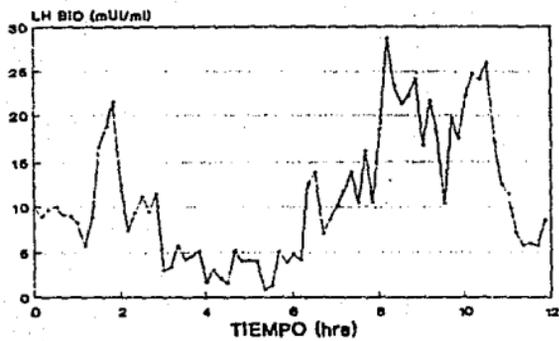
PACIENTE "17" LHbioactiva



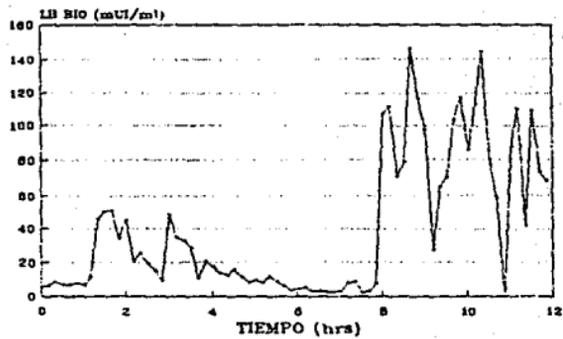
PACIENTE "18" LHbioactiva



PACIENTE "19" LHbioactiva



PACIENTE "20" LHbioactiva



7.2.- COEFICIENTES DE VARIACION

Se obtuvieron los siguientes coeficientes de variación de los sueros control (SC) :

INTERENSAYO

n = 19

Coefficiente de variación = 20.0338

INTRAENSAYO

n = 19

Promedio general = 25.6263

Sx general = 3.4768

Coefficiente de variación

general = 13.56

El cálculo de los datos se hizo de acuerdo a (Bedolla et al 14).

7.3.- Descripción de resultados

En la prueba de Mann Whitney previa al estudio en cuento al promedio las pruebas basales no existió diferencia significativa con un alfa = 0.05

De las 12 pruebas de Wilcoxon para los casos 1,2,3,4 y 5 tanto para pacientes sanos como enfermos hay diferencia significativa con un alfa = 0.05 y para el caso 6 tanto para pacientes sanos como enfermos no hay diferencia significativa con un alfa = 0.05.

De las 5 pruebas de Mann Whitney para el caso 1,2,3,4 y 5 no hay diferencia significativa con un alfa = 0.05 y para el caso 6 hay diferencia significativa entre ellas con alfa = 0.05.

8.- DISCUSION

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron , se interpretan de la siguiente manera : el hecho de que en las pruebas de Wilcoxon para los 1,2,3,4 y 5 en enfermos y sanos en donde existe diferencia significativa quiere decir que al ser estimulados con una dosis de GnRH existe respuesta tanto a los 10 min., 20 min. y una hora después , así como en el punto mínimo del intervalo de tiempo sin estimular y el punto mínimo después de estimular y el punto máximo del intervalo de tiempo sin estimular y el punto máximo después de estimular, esto pudiera dar lugar a pensar que si se compararan estos mismos casos entre sanos vs. enfermos (Prueba Mann Whitney) podrian dar alguna diferencia pero al efectuarlas no dio así, esto quiere decir que las dos poblaciones son muy semejantes entre si. Velduhis et . al. dicen observar una respuesta 10 min., después de inyectar 10mg de GnRH en pacientes -- sanos y esto se comprueba en el estudio.

Para el caso 6 en la prueba de Wilcoxon tanto para sanos como enfermos no hubo diferencia, esto quiere decir que el primer estímulo al llegar a su punto máximo es igual al segundo estímulo al llegar a su punto máximo, pero al ser comparados sanos vs enfermos estos son diferentes en cuanto a la amplitud de la respuesta al primer y segundo estímulo con GnRH (Prueba Mann Whitney caso 6), indicado lo siguiente: No obstante, aunque no existe una alteración evidente en relación a los mecanismos hipotálamicos que conducen a

la liberación de GnRH y como consecuencia de LHbioactiva, si existe diferencia entre pacientes sanos y enfermos en la hipófisis al estímulo de GnRH, ya que es mayor la respuesta en el caso de los pacientes enfermos.

Existe diferencia entre los pacientes sanos y los enfermos cuanto a la sensibilidad al estímulo de GnRH, en donde la respuesta es mayor en el caso de los enfermos.

Es posible que esta diferencia se pueda explicar por una alteración en los niveles de esteroides que actúan a nivel de la hipófisis, que afectan la sensibilidad de esta al estímulo de GnRH.

Los resultados del presente trabajo son preliminares ya que es necesario que sean analizados por un método de desconvolución de parámetros múltiples en el cual se mide frecuencia, duración, amplitud del pico, así como el tiempo de vida media, de la eliminación y la secreción de las hormonas los cuales dan una mayor profundidad al análisis. No se llevo a cabo en este trabajo por ser un análisis matemático complicado pero los resultados ya están siendo analizados en el laboratorio del Dr. Velduhis quien ha estado perfeccionando este tipo de análisis.

La información que se tiene acerca de estos pacientes es muy poca y actualmente se han seguido estudiando a estos pacientes. El Dr. Velduhis sugiere una serie de mediciones de diferentes hormonas que están involucradas en el eje hipotálamo-hipófisis y sus diferentes relaciones para profundizar en la patología de esta enfermedad.

Este estudio es parte de un proyecto en donde se midieron las

siguientes hormonas además de LH bioactiva que fueron: testosterona, LH inmunoreactiva y FSH la primera medida en México y las otras dos en Estados Unidos.

El propósito de que se midieran estas hormonas, es porque todas están relacionadas unas con otras en el funcionamiento del eje-hipotálamo-hipófisis.

9.- CONCLUSIONES

- 1.- Si existe diferencia entre pacientes sanos y enfermos.
- 2.- La diferencia esta en la respuesta ante GnRH que fue mayor en pacientes enfermos.

Se lograron alcanzar los objetivos e hipótesis planteadas.

Estos resultados seguirán un análisis de desconvolución y serán comparados con los resultados de las otras hormonas y se harán relaciones entre ellas para averiguar y elucidar el origen de la enfermedad, como se pudo observar, el presente trabajo es muy extenso y aunque los resultados sean preliminares, se hizo este análisis con el propósito de dar una idea para el seguimiento de los resultados finales. Se espera que el presente trabajo sea un estímulo para un estudio más profundo y un reto para las próximas generaciones.

10.- ANEXOS

ANEXO 1

BIOENSAYO DE LH EN CELULAS INTERSTICIALES (LEYDIG) DE RATA

PRINCIPIO :

Las células intersticiales testiculares (células Leydig) responden a las gonadotropinas bioactivas (LH,hCG) produciendo testosterona.

Animales usados :Se usan ratas macho de raza Wistar de 250g de peso o de 90 días.

Reactivos :

- Medio Dulbecco
- Albúmina de suero bovina
- Colágenasa
- MIX
- Estándar de LH (NIDDK-hLH-1-3 en PBS)
- Azul trypano
- Eter etílico
- Alcohol
- Bicarbonato de sodio

Soluciones :

- Solución libre de Ca y Mg pH=7.4
- NaCl 2g.
- KCl 0.1g.

- NaHCO 0.087g.
- Glucosa 0.25g.
- Vol.Final 250ml
- Azul trypano 0.4%
- Bicarbonato de sodio 1%

Preparación del medio Dulbecco/Albúmina :

Las cantidades pesadas de Dulbecco y albúmina se disuelven en agua bidestilada con cuidado de no hacer espuma (la espuma daña las células) y antes de llegar al volumen final se ajusta el pH a 7 con NaHCO 3 1%, preparado éste se adicionan las cantidades correspondientes para disolver la colagenasa como la xantina, esto se hace con la ayuda de un agitador magnético.

Preparación de estándares :

Se utiliza como estándar NIDDK-hLH-1-3 en PBS (amortiguador de fosfatos), se utilizan alícuotas con conc. de 100 UI/ml, de ésta se parte para elaborar y la curva estándar.

- 1.- Se toman 50 µl de la alícuota con conc. 100 UI/ml + 4.950 µl de medio Dulbecco. Conc. del estándar es 1000 mU/ml.
- 2.- Se toman 200 µl del estándar 1 + 1.800 µl de medio. Conc. del estándar es 100 mU/ml.
- 3.- Se toma 1ml del estándar 2 + 1ml de medio. Conc. del estándar es 50 mU/ml.
- 4.- Se toman 500 µl del estándar 3 + 500 µl de medio .Conc. del estándar es 25 mU/ml.
- 5.- Se toman 300 µl del estándar 3 + 700 µl de medio. Conc. del estándar es 15 mU/ml.

- 6.- Se toman 100 μ l del estándar 3 + 900 μ l de medio. conc. del estándar es 5 mU/ml.
- 7.- Se toman 200 μ l del estándar 6 + 800 μ l de medio . conc. del estándar es 1 mU/ml.

Material :

- 1 caja de Petri de 90 x 15 mm (para colocar los testículos)
- 160 frascos con tapón capacidad 10 ml.
- 2 mallas (Mesh)
- 10 tubos cónicos con tapón de 15 ml.
- 2 pipetas Pasteur de diferentes diámetros (previamente flameadas, para evitar rompimiento de células).
- puntas para micropipetas
- 2 matraces Elermeyer de 500 y 250 ml.
- 2 vasos de pp. de 250 ml., 1 vaso de pp. de 2 lts o recipiente similar y 2 vasos de pp. de 100ml.
- 6 tubos de ensaye (para la curva estándar).

Equipo :

- 1 baño con agitación (Dubnoff)
- 1 centrifuga clínica de mesa
- 1 microscopio de luz con objetos de 10x y 40x.
- Material de cirugía y microcirugía
- 1 hemacitómetro
- Micropipetas

PROCEDIMIENTO :

La solución de medio Dulbecco se puede filtrar en condiciones estériles usando filtros milipore de 0.45 u. En estas condiciones la solución se puede almacenar durante 3 semanas a -4°C .

La solución de colagenasa se hace el mismo día del experimento y se guarda a 4°C hasta su uso.

OBTENCION DE CELULAS

Las ratas se anestesian con éter, tomándolas de la cola e introduciéndolas en un vaso de 2 Lts, con algodón impregnado de éter, e inmediatamente se tapa el vaso. Una vez anestesiadas se sacrifican, y se moja la región púbica con alcohol.

Se corta la piel utilizando las pinzas de ratón y las tijeras grandes, posteriormente se corta el músculo tomándolo con las pinzas medianas y usando las tijeras medianas. Finalmente los testículos se extraen, y se colocan en una caja de Petri con solución libre de calcio, con las tijeras y pinzas de microcirugía se limpian retirando la túnica albugínea, se disecciona la arteria principal cuidando de no romperla, se transfieren a otra caja de petri con medio Dulbecco.

Después de obtener los testículos el procedimiento debe ser rápido.

Una vez reunidos los 4 testículos, se transfieren a una matraz que contienen la solución de colagenasa, el matraz se tapa y se coloca en un baño con agitación a 37°C durante 15 min.

Transcurrido este tiempo, la suspensión se hace pasar a través de un embudo que contiene la malla Mesh (250 µm), esto se hace con el fin de eliminar los túbulos y ahí mismo se hace pasar el doble de volumen de medio Dulbecco, se recibe el filtrado en un vaso de pp., el objeto de esto es diluir la colagenasa y por otro lado se lava el tejido para obtener el mayor número de células posibles.

El volumen filtrado se transfiere a 4 tubos cónicos, los cuales se tapan y centrifugan a 150 x g durante 10 min., posteriormente se desecha el sobrenadante y la pastilla celular se resuspende con la pipeta Pasteur, primero la de mayor diámetro en medio que contiene 0.125 mM de MIX, guardando una proporción de 1ml de medio por cada 0.1ml de paquete celular aproximadamente y se filtra nuevamente con una malla Mesh (100 µm) para eliminar los acúmulos, y se mantienen en agitación lenta.

Conteo de células :

Para contar las células, se transfiere 0.5ml de azul trypano al 4% a un tubo y se adiciona 0.3 ml de medio y se coloca 0.2 ml de suspensión celular (diluidas previamente 1/10 el factor de dilución es 50).

Usando un pipeta Pasteur se transfiere una pequeña cantidad de la suspensión celular con azul trypano a las cámaras del hemocitómetro tocando los extremos de la cubierta para que se llene la cámara por capilaridad.

Comenzando por la cámara 1 se cuentan las células viables (no teñidas) del cuadro de 1mm, repetir procedimiento para las cámara 2.
 Células/ml = Promedio de las 2 cámaras x 50 x 10⁴

Se incuban entre 1 y 2 x 10⁶ células/ml. aprox.

PROTOCOLO DE TRABAJO

Tubo #	D/A/X	Susp.célular	Estándar o muestra	Suero estándar
1-2	2ml	100ul	-	100 ul
3-4	1.9ml	"	100 ul E1	"
5-6	"	"	" E2	"
7-8	"	"	" E3	"
9-10	"	"	" E4	"
11-12	2 ml	"	" M1	-
13-14	"	"	" M2	-
15-16	"	"	" M3	-
17-18	"	"	" M4	-
etc				
157-158	"	"	" SC	-

Se colocan sueros de control (SC) a la mitad del ensayo y al final.

La incubación se lleva a cabo en un baño con agitación a 37 ° C durante 3 hrs. Transcurrido el tiempo las suspensiones celulares se transfieren a tubos de ensayo y se centrifugan a 2500 xg durante 15 min. Finalmente el sobrenadante se transfiere a tubos de ensayo los cuales se tapan y se guardan a -20 ° C para posterior análisis de testosterona por RIA.

ANEXO 2

RIA DE TESTOSTERONA

Se usó un kit de testosterona marca DPC (diagnostic products corporation), Cout-A-Count.

PRINCIPIO :

El kit se basa en que el anticuerpo específico se encuentra inmovilizado en la pared del tubo de propileno. Se utiliza testosterona marcada con I^{125} que compete con la testosterona producida en el bioensayo. El tubo es decantado para separar el complejo de la fracción libre y los tubos son contados en un contador gamma. La cantidad de testosterona presente es determinada por una curva estándar.

Material:

- 1.- Tubos de propileno con anticuerpo (deben mantenerse en refrigeración).
- 2.- Testosterona marcada con I^{125} (deben mantenerse en refrigeración).
- 3.- Estándares de testosterona

Tipo	Conc. de testosterona ng/ml
A	0
B	0.2
C	1
D	4
E	8
F	16

Equipo :

Contador de radiación gamma.

PROTOCOLO DE TRABAJO :

Se efectúan las diluciones correspondientes de cada muestra como sigue: basal y estándares 1/5, el de mayor concentración 1/6, de la muestra 1 a la 49 1/4. también los SC, de la 50 a la 72 1/6.

Diluciones 1/4 50 μ l de muestra + 150 μ l de medio.

Diluciones 1/5 50 μ l de muestra + 200 μ l de medio

Diluciones 1/6 50 μ l de muestra + 250 μ l de medio

Se colocan 50 μ l de los estándares por duplicado, en los tubos de propileno, al igual que 3 sueros controles con cantidades baja, media y alta de testosterona proporcionados por el Instituto de Nutrición.

Se procede a colocar 50 μ l de cada muestra de bioensayo diluida en los tubos de propileno, después se les adiciona 250 μ l de traza radioactiva (testosterona marcada I ¹²⁵), al terminar de colocar la traza al último tubo, se agitan en un vortex, se tapan y se dejan incubando 20 hrs, a temp. ambiente, después de transcurrido este tiempo se vacía la traza y se enjuagan los tubos 2 veces con 1ml de agua, se secan bien los tubos a manera de que la cantidad de agua residual sea mínima, para posteriormente ser contados en el contador gamma.

Antes de poner los tubos en el contador gamma, se colocan 2 tubos de propileno únicamente con traza radioactiva (cuentas totales), se procede a colocar la curva estándar y finalmente las muestras, como las muestras son 72 por duplicado + el duplicado del RIA, se coloca a la mitad del ensayo otra curva estándar.

Después de obtener las CPM (cuentas/min) se hace un ajuste de la curva de tipo logarítmico en donde $X = \log x$ y $Y = \log y$, después para conocer las conc. de testosterona de cada muestra, se efectúa un cálculo de regresión lineal de X y Y (véase RIA).

Los cálculos se realizaron con ayuda de un programa para computadora PC IBM compatible denominado RIA-Logit.

La precisión del kit es el 0.04ng/ml.

11.- APPENDICE

tiempo	pac1	pac3	pac7	pac9	pac10	pac11	pac12	pac13	pac15	pac16	pac17	pac18	pac19	pac20
0.00	29.07	25.54	22.14	15.56	8.61	38.02	22.50	21.68	14.59	13.49	15.53	15.98	10.06	5.41
0.17	14.45	19.03	14.16	11.30	10.74	24.92	14.90	16.39	17.00	11.90	15.64	17.10	8.70	6.90
0.33	16.59	20.09	20.41	9.71	10.40	22.00	14.70	25.90	14.51	12.42	10.00	11.12	9.60	0.87
0.50	12.19	16.24	15.15	11.67	9.46	26.16	10.08	39.46	15.73	13.94	12.48	15.10	10.01	6.03
0.67	22.34	19.59	17.07	10.20	7.90	23.01	26.16	46.04	24.20	10.55	13.04	14.04	9.07	7.07
0.83	25.50	16.34	15.76	10.05	0.27	17.30	31.43	35.07	17.74	9.01	12.74	10.63	0.90	0.07
1.00	24.27	24.05	12.02	9.47	6.59	23.00	20.47	20.14	17.94	9.19	10.72	14.97	0.21	6.79
1.17	12.37	30.59	9.21	13.53	0.41	27.20	20.76	23.53	20.95	11.30	11.49	16.44	5.72	11.70
1.33	0.55	23.01	10.00	19.50	5.99	24.68	27.00	20.30	16.33	11.51	12.24	13.06	0.81	45.79
1.50	9.35	36.03	17.16	16.65	0.01	24.07	23.33	30.64	17.67	9.10	22.26	20.45	16.59	50.45
1.67	11.61	31.46	10.56	13.57	14.66	26.73	26.00	40.29	11.07	10.07	22.71	16.42	10.64	51.24
1.83	10.71	17.10	27.45	11.01	15.59	24.56	21.93	27.45	13.90	10.73	16.47	34.91	21.52	34.31
2.00	16.04	20.39	20.51	11.43	13.70	21.59	20.14	23.21	32.72	10.67	13.10	40.77	12.52	44.94
2.17	50.50	25.70	25.44	13.56	13.42	24.17	15.37	26.67	20.93	9.27	7.32	33.59	7.35	21.01
2.33	33.40	16.65	19.49	15.46	11.29	16.01	10.10	21.66	25.66	7.50	11.77	27.97	9.36	25.05
2.50	37.59	23.01	16.46	13.31	11.26	33.02	13.61	17.00	24.74	9.15	0.26	34.06	11.12	19.37
2.67	31.31	21.77	21.45	12.25	10.42	19.66	10.77	32.55	26.47	9.02	14.13	29.06	9.47	15.25
2.83	34.16	14.40	17.59	12.06	11.39	19.17	10.16	34.44	22.90	7.40	10.30	22.42	11.50	9.30
3.00	17.01	15.25		14.60	11.60	23.50	23.90	33.63	21.21	7.61	14.74	20.01	2.97	40.00
3.17	33.01	21.57	23.75	12.15	0.07	23.76	24.09	35.71	10.21	6.21	11.93	10.77	3.40	34.94
3.33	32.64	10.69	23.20	12.64	9.29	20.61	21.35	31.07	11.62	5.42	15.66	17.27	5.74	32.62
3.50	23.33	16.33	22.13	11.06	13.75	20.07	17.40	23.29	20.92	4.56	15.42	19.14	4.22	20.29
3.67	0.00	5.00	21.00	11.49	24.02	19.07	10.79	27.65	17.04	4.74	12.55	10.60	4.61	10.92
3.83	43.00	14.07	9.57	12.93	25.26	20.33	10.20	33.60	17.07	4.31	9.23	22.53	5.13	20.34
4.00	35.07	7.13	27.16	19.45	27.12	16.20	16.33	35.04	13.21	3.43	7.12	16.30	1.75	17.30
4.17	57.55	10.79	30.79	20.20	23.05	24.47	15.06	29.55	14.02	5.66	6.57	23.41	3.03	13.04
4.33	21.19	4.65	31.04	10.26	20.51	25.57	17.59	25.06	12.63	5.35	0.79	20.43	0.24	10.71
4.50	16.42	6.25	12.76	16.83	19.34	23.07	12.93	36.95	15.07	5.62	12.74	11.72	1.50	15.01
4.67	33.75	2.63		16.03	10.70	24.17	13.93	39.59	20.05	7.20	13.75	15.21	2.50	11.56
4.83	30.99	10.04	21.09	15.17	16.56	17.23	12.73	42.51	25.73	6.46	12.55	36.99	4.03	0.45
5.00	37.51	0.03	9.20	14.49	14.29	21.50	13.43	26.79	32.00	7.07	10.06	34.32	4.10	9.75
5.17	23.65	0.56	10.45	12.77	12.56	22.40	22.35	25.90	31.43	7.32	12.00	33.37	4.00	7.00
5.33	14.64	5.00	15.07	11.35	12.66	23.00	22.23	22.65	41.50	5.79	15.47	32.91	0.09	11.93
5.50	19.03	7.95	10.40	19.00	11.25	23.25	24.00	23.10	27.03	5.09	24.05	29.90	1.34	0.90
5.67	23.20	6.15	21.10	19.90	9.62	27.67	10.26	24.32	30.69	4.96	9.66	40.41	5.04	6.20
5.83	13.77	10.39	21.33	20.07	9.19	10.01	11.43	19.41	34.91	5.00	0.01	32.10	3.94	4.03
6.00	20.43	2.11		16.03	9.53	10.19	17.60	24.05	35.76	5.11	14.94	27.33	4.75	4.77
6.17	0.00	5.44	12.07	22.90	7.01	17.05	10.00	22.33	26.04	4.26	6.65	30.00	4.14	5.36
6.33	7.30	7.02		30.33	0.02	10.46	15.50	22.39	10.40	4.93	9.41	33.19	12.66	3.26
6.50	10.03	35.13	13.24	26.74	10.04	15.30	19.26	17.10	29.00	5.69	11.20	35.14	13.93	3.52
6.67	10.39	35.62	30.42	21.75	10.96	17.30	14.97	10.42	53.11	5.50	0.37	39.00	7.00	2.90
6.83	13.69	33.32		10.09	25.00	17.20	10.00	20.29	40.45	4.09	6.27	37.32	0.57	2.93
7.00	12.21	32.34	17.65	10.72	31.47	13.55	13.91	19.63	30.20	4.90	9.44	31.43	10.20	3.10
7.17	9.92	30.15		10.00	23.04	17.23	14.35	17.05	35.60	5.64	9.52	33.05	11.05	0.33
7.33	17.70	27.37	4.91	02.65	21.91	29.12	14.74	22.55	32.46	5.21	7.00	39.62	13.90	0.03
7.50	13.71	20.00	11.16	9.71	17.50	22.94	14.51	19.47	32.00	6.37	12.10	34.32	10.49	2.10
7.67	23.06	30.50	12.74	20.45	14.00	10.91	12.03	14.00	30.70	0.91	9.19	25.11	16.13	3.41
7.83	12.95	35.34	26.01	15.36	10.07	17.09	15.06	10.10	27.12	7.23	23.22	26.65	10.62	7.06
8.00	65.02	114.70	51.50	103.15	59.66	44.19	60.51	60.07	44.27	0.00	0.00	65.57	10.51	107.46
8.17	102.27	101.00	131.75	95.67	56.44				111.75	32.34	195.90	76.97	20.77	111.69
8.33	00.71	03.26	04.14	119.74	64.10	54.24	75.77		35.43	20.70	195.30	77.93	23.51	70.01
8.50	101.41	00.12	51.79	125.39	54.79	45.20	64.54	01.40	49.53	34.32	150.71	69.16	21.27	70.76
8.67	00.59	76.44	63.00	120.01	57.32	52.21	76.67	60.49	76.43	31.45	117.41	106.19	22.17	146.10
8.83	05.20	70.02	66.12	115.50	53.03	50.02	61.33	53.62	50.54	30.70	159.91	100.59	24.19	116.09

litapo	pac1	pac3	pac7	pac9	pac18	pac11	pac12	pac13	pac15	pac16	pac17	pac18	pac19	pac20
9.00	85.71	59.35	54.62	114.46	45.12	61.99	55.54	43.82	49.84	27.77	132.33	87.83	16.78	97.72
9.17	91.49	73.37	42.98	95.15	43.66	55.85	45.66	46.36	41.92	28.91	123.25	76.68	21.63	27.65
9.33	88.82	84.87	53.81	42.59	44.70	54.60	47.62	57.21	14.90	29.97	37.19	83.52	18.15	64.77
9.50	62.86	61.54	41.26	83.83	44.10	52.10	59.42	57.90	32.71	27.75	133.66	73.70	10.44	70.13
9.67	59.21	64.27		76.66	13.66	47.96	64.77	61.62	41.77	27.16	180.39	56.85	19.64	103.87
9.83	68.58	55.89	55.12	73.58	52.61	54.13	9.28	41.88	38.75	23.06	243.57	52.27	17.47	117.43
10.00	76.91	84.67	48.96	85.64	69.40	48.46	53.95	41.73	37.46	28.36	114.19	100.10	22.25	85.43
10.17	63.62	107.96	58.64	48.28	67.81	55.54	68.19	75.93	65.76	28.32	142.95	61.97	24.74	113.61
10.33	89.02	98.72	53.62	98.36	69.26	55.59	55.46	41.79	49.83	38.88	172.97	78.11	24.19	144.25
10.50	99.73	98.57	52.92	93.62	68.69	68.19	62.65	53.41	49.16	32.87	115.19	61.51	26.82	76.94
10.67	105.82	108.45	46.57	91.53	68.62	68.69	63.59	49.61	35.18	28.77	137.19	54.87	17.12	58.58
10.83	68.55	84.99	57.38	125.57	68.16	74.78	53.87	39.39	48.48	27.31	131.64	71.41	12.58	8.00
11.00	48.45	82.03	51.68	125.63	70.63	58.69	53.61	54.00	34.19	27.32	193.53	75.13	11.63	87.19
11.17	194.29	54.41	54.73	185.78	52.41	44.68	52.97	39.71	58.62	38.97	124.71	52.86	7.16	110.88
11.33	87.47	78.83	61.84	118.42	61.78	39.48	57.73	45.59	47.35	38.83	178.85	56.96	5.78	42.89
11.50	93.29	82.68	49.88	118.48	68.88	45.97	58.88	43.73		33.19	151.35	58.27	5.99	189.89
11.67	186.14	85.79	58.24	182.88	57.89	43.51	54.71	43.80	47.95	34.23	117.57	46.88	5.67	72.96
11.83	98.99	92.38	48.48	111.12	57.42	41.78	58.74	29.24	36.38	31.07	141.53	74.44	8.55	68.11

tiempo	pacR	pacG	pacH	pacI	pacJ	pacK	pacL	pacM	pacN	pacO	pacP	pacQ	pacR	pacS	pacT	pacU
0.00	29.13	26.89	9.86	11.11	6.67	19.88	26.41	28.22	9.87	7.57	14.86	19.50	37.07	12.40	13.98	
0.17	17.56	19.31	6.20	10.55	5.74	14.34	26.15	10.96	8.20	10.96	17.50	16.71	25.26	10.13	21.21	
0.33	21.95	13.17	5.40	8.67	7.31	20.47	23.01	18.74	7.41	14.30	15.36	18.02	26.74	16.58	19.34	
0.50	17.43	21.68	8.82	13.44	5.30	16.21	24.08	14.67	9.80	11.54	11.85	24.02	24.13	10.30	15.09	
0.67	15.77	23.92	11.43	8.88	8.13	13.93	30.20	14.86	22.48	13.23	17.81	17.30	21.36	12.73	10.56	
0.83	13.12	34.00	8.64	7.57	6.43	11.88	25.03	14.45	18.76	13.44	12.66	18.60	17.41	12.11	13.18	
1.00	13.67	39.57	8.60	10.89	4.31	11.26	21.44	13.48	23.34	5.61	16.83	5.51	17.42	7.25	11.91	
1.17	16.84	32.48	6.95	20.15	3.61	8.07	18.60	14.70	25.41	12.59	13.83	22.80	15.40	6.68	20.23	
1.33	9.10	29.29	5.24	17.41	3.40	8.01	21.06	18.98	13.50	12.15	12.55	18.84	17.39	14.69	22.34	
1.50	14.90	23.18	8.71	17.93	4.94	8.08	15.46	19.43	18.43	6.64	10.97	14.83	21.15	18.24	17.65	
1.67	21.67		5.38	14.72	3.22	7.30	16.13	19.30	13.81	1.00	10.96	22.19	27.59	15.43	17.97	
1.83	25.32	10.83	6.33	44.10	2.60	4.15	15.00	17.09	11.67	13.50	10.12	20.78	23.50	15.69	16.10	
2.00	24.68	18.27	6.74	19.17	6.51	7.47	16.47	16.20		10.24	10.81	18.61	42.69	9.38	16.29	
2.17	27.95	14.55	8.71	18.82	4.76	5.06	16.05	13.76	10.62	9.33	13.50	25.90	30.90	8.31	7.62	
2.33	22.88	14.87	6.39	18.54	5.29	8.20	16.79	15.96		6.24	10.56	24.43	31.51	7.28	6.50	
2.50	30.70	20.98	6.19	19.31	2.26	5.25	19.40	15.12	10.81	5.40	7.84	19.44	27.84	4.85	6.51	
2.67	22.80	13.98	10.66	17.82	4.37	6.84	22.94	9.56	6.68	20.40	9.16	20.94	21.48	5.89	6.43	
2.83	11.24	15.22	16.48	15.97	3.23	5.60	21.96	13.15	6.46	19.36	10.81	21.55	18.23	8.19	4.92	
3.00	16.23	24.60	9.08	12.94	3.27	4.45	29.89	12.16	8.32	13.45	10.71	18.82	15.26	9.08	18.63	
3.17	18.45	24.87	9.80	13.70	2.67	3.37	20.66	9.01	6.82	10.57	10.45	20.82	15.04	8.51	32.54	
3.33	19.72	18.75	6.61	13.27	3.72	5.62	21.84	15.94	8.07	13.19	1.83	17.89	7.91	7.54	22.80	
3.50	16.28	14.45	10.73	22.30	6.50	5.14	13.64	19.10	10.85	8.80	11.10	26.87	28.84	6.72	26.21	
3.67	15.47	21.06	8.15	22.51	2.70	3.25	26.11	18.12	26.16	8.92	30.34	13.85	25.70	18.50	19.81	
3.83	22.57	34.90	5.30	22.62	6.01	5.63	29.46	13.05	20.64	8.13	29.97	14.60	20.46	22.28	23.49	
4.00	32.75	30.89	7.63	23.27	15.86	5.66	31.87	12.46	21.43	5.77	33.24	12.69	19.29	13.43	17.66	
4.17	38.31	27.51	8.95	17.92	14.02	5.82	31.20	11.77	16.85	1.65	29.68	8.38	15.20	10.29	18.74	
4.33	33.01	22.69	13.98	23.46	25.52	5.74	29.82	13.55	15.44	7.94	27.84	19.19	15.32	17.37	18.74	
4.50	14.76	20.70	13.72	19.21	12.34	3.60	22.28	13.46	13.66	9.48	21.97	10.75	12.37	10.86	14.39	
4.67	14.61	24.20	11.55	19.57	15.27	18.77	26.27	10.95	14.42	6.61	21.25	24.57	12.44	12.45	14.92	
4.83	16.81	19.69	6.59	21.90	10.67	15.15	12.53	11.33	11.14	4.74	17.16	27.47	13.85	11.52	13.83	
5.00	15.00	12.25	13.97	16.22	10.62	12.56	23.39	10.29	11.10	4.19	20.88	22.12	8.69	15.96	10.55	
5.17	20.87	18.16	11.73	13.77	10.59	11.30	21.22	16.81	15.86	4.18	35.52	18.55	10.55	10.99	12.82	
5.33	20.79	20.26	8.66	11.40	4.84	13.33	22.09	19.61	19.11	9.12	35.06	17.50	9.85	9.95	13.75	
5.50	37.78	18.91	8.49	18.28	4.70	10.17	21.82	15.20	25.40	11.70	31.97	10.44	6.43	12.33	13.74	
5.67	40.24	19.83	8.87	22.44	6.24	9.00	13.30	9.44	19.24	12.75	17.82	15.99	4.51	6.40	16.94	
5.83	53.81	9.96	12.93	16.63	8.33	8.53	13.02	15.66	11.97	31.88	12.64	3.00	5.99	10.35		
6.00	45.82	13.93	13.88	11.23	6.02	5.61	12.11	12.23	11.55	12.92	26.91	14.57	3.81	7.70	15.31	
6.17	36.29	8.77	10.13	17.07	4.01	6.38	29.01	11.44	8.63	5.00	26.94	12.69	5.10	4.17	18.14	
6.33	33.60	13.91	12.52	13.10	4.13	4.50	38.02	8.97	9.91	9.83	18.26	11.82	10.57	5.24	19.42	
6.50	23.10	17.55	12.60	13.12	5.44	5.21	20.21	7.92	6.70	6.68	10.53	12.13	8.23	3.30	13.62	
6.67	35.24	20.38	10.29	14.33	11.46	4.00	23.37	6.98	15.30	20.72	15.86	17.89	12.20	9.01	16.83	
6.83	43.98	15.25	7.18	14.17	8.74	3.26	22.00	6.50	18.74	10.89	19.31	17.47	10.17	7.02		
7.00	35.84	15.75	6.00	13.65	7.46	2.74	14.30	7.16		22.53	16.73	19.71	9.00	12.85	18.32	
7.17	46.09	13.45	4.53	14.88	8.36	4.02		16.82	19.72	13.97	17.83	8.05	16.69	12.89		
7.33	36.81	14.34	4.99	14.58	5.60	3.60	19.91	9.44	15.55	13.66	15.31	17.28	7.83	20.79	10.77	
7.50	29.41	14.12	4.83	14.62	5.36	3.00	23.87	8.76	12.66	17.96	10.43	14.15	8.25	8.65	22.20	
7.67	35.66	13.65	3.11	10.32	4.52	2.94	11.39	7.95	12.52	13.69	37.52	16.23	9.78	5.26	22.94	
7.83	32.20	7.26	4.61	11.25	3.78	5.11	16.64	7.27	8.60	13.13	22.58	11.45	15.22	9.00	22.61	
8.00	73.97	32.85	76.87	29.83	41.32	36.79	75.03	25.93	33.68	62.46	41.61	70.95	36.72	37.07	68.16	
8.17	62.03	25.36	83.98	55.25	42.97	81.22	68.35	56.12	49.24	117.89	62.41	76.29	62.26	67.87	72.28	
8.33	64.26	26.04	75.95	69.75	42.03	98.55	70.42	35.38	62.73	99.55	69.84	83.74	51.61	39.69	73.75	
8.50	82.91	49.84	64.09	44.71	48.86	88.65	70.20	39.19	50.59	81.07	43.10	71.94	30.09	47.56	63.21	
8.67	74.89	43.63	54.94	44.02	51.79	80.67	81.35	31.60	34.77	74.69	50.86	49.29	34.74	38.59	71.15	
8.83	49.83	32.40	60.98	53.95	39.96	46.28	72.68	29.63	34.33	93.19	38.81	85.43	39.64	40.53	57.83	

tiempo	pacR	pacQ	pacH	pacI	pacJ	pacL	pacK	pacW	pacD	pacP	pacO	pacR	pacS	pacT	pacU
9.00	43.32	27.84	43.39	62.68	48.78	45.10	72.83	33.86	33.86	92.39	34.86	85.00	33.38	44.44	58.48
9.17	61.75	34.26	69.72	48.58	42.94	76.11	100.21	48.78	38.84	122.76	41.89	82.81	33.29	56.07	49.57
9.33	58.39	37.37	33.91	42.56	33.83	78.44	61.85	34.23	37.58	76.13	36.54	76.87	37.68	40.38	53.48
9.50	62.89	34.71	38.91	48.41	38.81	62.92	69.82	31.38	48.39	73.14	48.85	64.42	34.39	36.94	43.33
9.67	56.18	31.82	35.59	46.95	48.15	75.86	49.94	31.29	23.23	103.53	34.43	58.33	34.86	37.74	52.43
9.83	68.73	21.78	62.14	46.42	34.17	66.89	91.38	38.26	37.82	96.85	40.81	55.88	25.96	24.79	36.72
10.00	88.81	33.42	56.84	58.72	58.98	78.57	83.89	53.77	38.36	118.84	65.58	59.21	56.88	47.85	43.98
10.17	91.91	31.93	118.83	57.18	44.85	107.48	75.42	32.19	39.51	82.64	59.21	83.82	67.84	42.43	61.84
10.33	63.92	32.78	98.49	54.88	39.16	56.45	81.24	41.83	43.83	78.99	45.74	67.33	69.39	48.24	49.64
10.50	80.76	41.48	63.87	41.77	38.13	76.38	62.18	33.11	35.59	68.11	36.93	75.64	65.37	43.88	51.27
10.67	76.26	35.89	62.84	45.23	48.18	59.61	76.35	36.78	33.82	86.39	37.86	71.88	45.85	28.36	51.18
10.83	51.25	11.93	72.82	32.21	48.50	87.66	54.48	41.69	29.52	74.88	42.15	76.13	27.28	25.73	43.14
11.00	25.87	32.49	53.81	35.18	37.29	55.59	58.55	33.58	28.66	77.65	48.95	81.96	32.31	41.46	53.64
11.17	45.81	17.24	39.97	37.49	27.89	88.13	56.63	52.21	36.87	68.48	34.83	71.98	29.89	33.18	45.39
11.33	29.85	33.93	29.81	42.89	29.69	78.83	88.78	38.85	23.44	69.98	33.96	71.36	25.61	29.21	43.11
11.50	49.79	29.24	42.85	41.82	29.89	81.57	62.81	38.59	29.33	78.98	35.84	64.87	26.59	25.72	48.48
11.67	58.86	27.56	34.86	45.99	21.85	74.98	73.86	33.12	19.78	77.48	41.87	68.11	34.68	28.87	43.87
11.83	24.64	38.18	15.98	42.68	29.89	66.82	53.28	48.86	22.48	63.65	33.28	72.88	39.17	41.32	29.31

Enferas

diferencias	pac1	pac3	pac7	pac9	pac10	pac11	pac12	pac13	pac15	pac16	pac17	pac18	pac19	pac20
t 8:00-7:50	52.86	79.44	25.50	87.79	40.79	27.10	52.65	41.97	17.16			38.91	7.89	99.60
t 8:50-7:50	82.25	35.48	40.11	100.13	34.16	41.93	45.47	35.52	23.42	23.55	136.69	81.93	13.57	109.84
t 8:10-7:50	89.32	65.66	105.74	88.31	37.57	36.27	73.56		84.64	25.11	172.67	50.32	18.10	103.84
dif sñinos	140.74	76.63	93.33	95.30	39.15	40.88	57.99	35.44	58.64	20.38	218.72	67.81	7.20	94.86
dif sñinos	41.15	32.30	27.22	33.12	7.66	25.84	-2.23	15.24	3.28	19.64	30.92	35.75	4.78	25.47

Sanos

diferencias	pacA	pacG	pacH	pacI	pacJ	pacL	pacM	pacN	pacO	pacP	pacQ	pacR	pacS	pacT	pacU
t 8:00-7:50	41.77	24.79	72.26	18.50	37.54	31.68	58.40	18.66	25.08	49.34	19.03	59.50	21.51	28.80	45.55
t 8:50-7:50	16.83	25.14	56.37	42.70	36.18	41.17	56.04	22.36	25.73	80.06	16.23	73.98	24.42	31.47	35.22
t 8:10-7:50	29.83	18.71	79.37	44.00	39.19	76.11	51.71	48.85	40.65	103.96	39.84	64.84	47.05	58.79	49.67
dif sñinos	38.90	18.27	92.78	25.64	26.27	87.00	62.19	35.90	34.00	109.23	31.52	71.82	26.78	45.59	41.21
dif sñinos	15.55	9.98	12.87	22.26	18.79	34.05	38.55	19.37	13.33	60.82	25.36	49.57	22.61	16.97	24.39

Enferas

absolutos	pac1	pac3	pac7	pac9	pac10	pac11	pac12	pac13	pac15	pac16	pac17	pac18	pac19	pac20
t 8:00-7:50	52.86	79.44	25.50	87.79	40.79	27.10	52.65	41.97	17.16			38.91	7.89	99.60
t 8:50-7:50	82.25	35.48	40.11	100.13	34.16	41.93	45.47	35.52	23.42	23.55	136.69	81.93	13.57	109.84
t 8:10-7:50	89.32	65.66	105.74	88.31	37.57	36.27	73.56		84.64	25.11	172.67	50.32	18.10	103.84
dif sñinos	140.74	76.63	93.33	95.30	39.15	40.88	57.99	35.44	58.64	20.38	218.72	67.81	7.20	94.86
dif sñinos	41.15	32.30	27.22	33.12	7.66	25.84	2.23	15.24	3.28	19.64	30.92	35.75	4.78	25.47

Sanos

absolutos	pacR	pacG	pacH	pacI	pacJ	pacL	pacM	pacN	pacO	pacP	pacQ	pacR	pacS	pacT	pacU
t 8:00-7:50	41.77	24.79	72.26	18.50	37.54	31.68	58.40	18.66	25.08	49.34	19.03	59.50	21.51	28.80	45.55
t 8:50-7:50	16.83	25.14	56.37	42.70	36.18	41.17	56.04	22.36	25.73	80.06	16.23	73.98	24.42	31.47	35.22
t 8:10-7:50	29.83	18.71	79.37	44.00	39.19	76.11	51.71	48.85	40.65	103.96	39.84	64.84	47.05	58.79	49.67
dif sñinos	38.90	18.27	92.78	25.64	26.27	87.00	62.19	35.90	34.00	109.23	31.52	71.82	26.78	45.59	41.21
dif sñinos	15.55	9.98	12.87	22.26	18.79	34.05	38.55	19.37	13.33	60.82	25.36	49.57	22.61	16.97	24.39

12.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Comhaira F.H; de Kretser D.M;Farley T.M.M;Rowe P.J(eds):Towards more objetivity in diagnosis and managemet of male infertility,Int. J.Androl.Suppl 7,1987.
- 2.- Calamera J.C;Brugo Olmedo S.;Nicholson R.F:Metodología diagnós-tica del factor masculino En:Avances en Reproducción Humana Asch R. Acosta A.(eds). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires 1990 pag. 262-271.
- 3.- World Health Organization : WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interacion. Cambridge Univ.Press 1987.
- 4.- Lipner H: Mechanism of mammalian ovulation En:The Physiology of Reproduction. Knobil E.;Neil J. (eds) Raves Press Ltd;New Yoyk 1988 pag. 447-488.
- 5.- Bardin C. W . The neuroendocrinology of male reproduction En: Neuroendocrinology, Krieger D.K.; Hughes J.C. (eds) Sunderland M.A, Singuer associate inc 1980 pag. 239-250.
- 6.- Carrere C.A.:Factor masculino En:Avances en reproducción humana Asch R; Acosta A. (eds) Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires 1990 pag. 272-295.
- 7.- Veldhuis J.D ;Evans W.S ;Urban R.J; Rogol A.D; Johnson M.L : Physiologic attributes of the LH pulse signal in the human cross-validation studies in men.J.Androl 9,1988. pag.69-77.

- 8.- Graquilli V.A;Vermeulen A: Leydig cell fuction in infertile men with idiopathic oligospermic infertility.J.Clin. Endocrinol. Metab. 1988,66 :62-67.
- 9.-Tsatsoulis A.;Shalet S.M;Tabol A.;Robertson W.R:Quantitative and qualitative changes in LH secretion following pulsatile GnRH therapy in man with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, Clin. Endocrinol.Metab.1987,30:167-175.
- 10.-Veldhuis J.D . ; Johnson M.L ;Dufau M.L:Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low dose exogenous gonadotropin releasing hormone pulses in man J. Clin.Endocrinol. Metab.. 1987,64 :1275-1282.
- 11.- Dufau M.l;Pock R;Neubauer A.;Catt K.J:In vitro bioassay of LH in human serum: The rat interstitial cell testosterona (RICT) assay J.Clin.Endocrinol.Metab.1976,42 : 958-969.
- 12.-Petraglia F:Beta endorphin in the hypothalamus-pituitary-adrenal and gonadal axis.Serono symposia from Raven Press 1988, 52: 287-299.
- 13.-Leonard M.Freeman;M. Donald Blafox. Radioinmunoassay,Grune and Stratton,1975 New York, USA.
- 14.- Rev.Inv.Clinica(index),1984 México,36 :17-192.
- 15.- Chavarría M. E, Díaz-Sánchez V,Mc Lachlan R.I,Villegas H,Reyes A: Concentración de inhibina, hormonas esteroides y gonadotropinas en el suero sanguíneo de varones fértiles y estériles y su relación con la función testicular.Ginec.Obstet.Mex. (aceptado para publicación , Marzo 1991).

- 16.- Morrow A.F, Baker H.W.G, Burger H.G:Diferent testosterone and LH relationships in infertile men.J. Androl. 1986, 7: 310-315.
- 17.- Hicks Gómez J. J., Díaz Zagoya J.C.Bioquímica e Inmunología , Facultad de Medicina , UNAM,México 1988,pag 78-81.
- 18.- Guyton A.C. Tratado de Fisiología Médica, McGraw-Hill,México 1989,pag : 868-872.
- 19.-Greenspan F.S and Forsham P.H,Basic and Clinical Endocrinology, Lange Medical Publications,Los Altos California,USA 1986,cap. 13,1.
- 20.- Domínguez R.C.Topicos Selectos de Biología de la Reproducción, Porrúa UNAM,México 1991,cap. 3,5,9,8.
- 21.- Díaz Sánchez V.,Martínez M.,Noruega M.Investigación y diagnóstico del varón infértil,Departamento de biología de la reproducción Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán",México.
- 22.- E. Knobil y J.Neill et. al,Fisiología de la Reproducción,Raven Press,New York 1988,capitulo 32.
- 23.- P. Michael Conn,William R. Huckle,William V.Andrews and Craig A. Mcarldc, Recent progress in hormone research,Molecular Mechanism of action of gonadotropin releazing hormone (GnRH) in the pituitary. vol.43 pag 29.
- 24.- María L.Dufau, Ovarian and Testicular LH/hCG receptors, Serono Symposia, USA 1990,pag. 369.
- 25.- Yen & Jáffe, Reproductive Endocrinology, Saunders, USA 1991. capítulos 2,4.

26.-John G.Pierce,Thomas F. Parsons;Glycoprotein hormones structure and function, Ann.Rev.Bioquem. 1981 50 : 465-95.

27.- Veldhuis J.D. y col. J Clin. Endocrinol. Metab. 65 : 929,1987.