UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

332

DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

HORMONAS GONADOTROFICAS Y SU PARTICIPACION EN EL CONTROL DE LA FERTILIDAD

MA. DEL PILAR LETICIA NERI BAZAN

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 0

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

4

Jurado asignado originalmente según el tema

PRESIDENTE	Prof.	VICTORIA VALLES SANCHES DE B.
VOCAL	Prof.	JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER
SECRETARIO	Prof.	HOMERO HERNANDEZ MONTES
1er. SUPLENTE	Prof.	BEATRIZ A. MEDINA DE THIELE
2o. SUPLENTE	Prof.	LUIS FELIPE ABREU HERNANDEZ

Sitio donde se desarrolló el tema

UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA, CENTRO MEDICO NACIONAL

I.M.S.S.

Sustentante

MARIA DEL PILAR LETICIA NERI BAZAÑ

Asesor del tema

DR. HOMERO HERNANDEZ MONTES

Para mis Padres

Por su amor y esfuerzo

A mis Hermanos

Cada semilla un anhelo

Al Dr. Homero Hernández Montes

Por su valiosa dirección

ABREVIATURAS

ICSH	Hormona Estimulante de las Células Intersticiales
LH	Hormona Luteinizante
FSH	Hormona Estimulante del Folículo
HCG	Hormona Coriónica Gonadotrofica
hCG	Hormona Corionica Gonadotrofica Humana
TSH	Hormona Estimulante de la Tiroides
PAS	Acido Peryódico de Schift
DC	Dicroismo Circular
RNA	Acido Ribonucleico
ACTH	Hormona AdrenoCorticoTrófica
2a.IRP-hMG	Segunda Preparació de Referencia Internacional de la Gonadotrofina Menopaúsica Humana
RIA	Radio Inmuno Análisis
RR	Radio Receptor
TPA	Análisis de la Producción de Testosterona
LH-RH	Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
FSH-RH	Hormona Liberadora de la Hormona Estimulante del Folículo
Gn-RH	Hormona Liberadora de las Gonadotrofinas
TRH	Hormona Liberadora de la Hormona Estimulante del Tiroides
ATP	Trifosfato de Adenosina
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
GMPc	Guanosín Monofosfato cíclico
G_{M1}	MonosiálilGangliosido
PGE_1	Prostaglandina E_1
PGF_2	Prostaglandina F_2
ABP	Proteína Acarreadora de Andrógenos

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	5
Localización y sitio de síntesis de las hormonas	8
Estructura química	14
Características y propiedades de las gonadotrofinas	34
Heterogeneidad	45
Acción de las hormonas	54
Hormonas liberadoras y su mecanismo de acción	94
Regulación de las actividades hormonales	101
Resumen y Conclusiones	115
Bibliografía	118

INTRODUCCION

Los organismos y el medio ambiente se encuentran relacionados entre sí y en forma tan dependiente que cuando ocurre un cambio en cualquiera de ellos que rompe el equilibrio existente, ambos, se ven afectados.

El hombre no puede escapar de esta interdependencia con su medio ambiente y constantemente se ve afectado por la concurrencia de cinco factores críticos principales que son: el crecimiento de la población; la utilización irracional de los recursos naturales disponibles; la desnutrición; la industrialización acelerada y la contaminación.

A pesar de que estos factores causan daños irreparables al medio ambiente, y ponen en peligro el equilibrio ecológico global, sólo una fracción muy pequeña de la población mundial se interesa en la comprensión de estos problemas y en la búsqueda de soluciones a los mismos.

Al analizar las variaciones de los cinco elementos señalados, encontramos que todos esos factores muestran una íntima interdependencia y siguen un patrón matemático denominado crecimiento exponencial. Por ejemplo, en 1650 la población mundial erá aproximadamente de 500 millones de habitantes, y su tasa de crecimiento cercana al 0.3% anual. Esta población tardó en triplicarse un período de 250 años (hasta el año de 1900), sin embargo, de 1900 a 1970 (un período cinco veces menor al anterior) la población fue nuevamente triplicada, lo que muestra muy fácilmente la llamada explosión demográfica. Este incremento

explosivo en la población ha sido más espectacular en ciertas regiones como es el caso de los países pobres o en vías de desarrollo.

Así pues, debe de haber una estrategia global simultanea encaminada a nivelar el crecimiento de la población en el mundo entero, pero especialmente en el mundo subdesarrollado, y al propio tiempo a aumentar el ingreso "per cápita" y dirigir una mayor parte del producto nacional bruto (PNB) a la renovación de los recursos y a otras tácticas que mantengan la calidad del ambiente en el mundo desarrollado.

Sí el desarrollo de la población continuara hasta que la densidad de esa población rebase alguna capacidad vital (alimentos, recursos, espacio, contaminación, etc), entonces gran número de habitantes sufrirá duras privaciones.

Una vez que el hombre acepte la responsabilidad, será posible anticipar límites, y establecer controles de población (control de natalidad, restricción del uso de las tierras y el agua, conservación y nueva circulación de recursos, etc) de modo que la población permanezca debajo de los límites peligrosos que lo conduzcan al caos[1,2/].

Pero no hay que olvidar que las relaciones presentes y futuras entre población, recursos, productos y contaminación son distintos según la región o el país del que se trate y no necesariamente coinciden en todo el mundo (casos de la India y Estados Unidos).

Aún así, se requiere de métodos que frenen el crecimiento

de la población mundial para reducir las probabilidades de una escasez en la alimentación de las futuras generaciones y baje así los niveles de contaminación de las ciudades, etc.

Una de las soluciones puede ser la aplicación de métodos anticonceptivos para planear familias pequeñas con progenies bien alimentadas y recursos sociales estables.

Para cumplir con esta última finalidad se requiere encontrar los métodos más eficaces para el control de la población y para ello es necesario, primeramente, el conocimiento detallado de los sistemas endocrinológicos que ocurren en ambos sexos de la especie humana.

En vista de que los mecanismos que gobiernan el control de la reproducción son muy variados, es necesario conocer todas sus interrelaciones, ya que un conocimiento inadecuado podría llevar a un desequilibrio hormonal que lejos de cumplir con su cometido causaría un efecto dañino al organismo.

Por lo tanto siendo un tema de tanta actualidad para los países en vías de desarrollo como es el caso del nuestro, nos parece una contribución importante el analizar hasta donde es posible, los conocimientos que tenemos sobre esa complicada maquinaria hormonal que representalla biología de la reproducción.

Para ello se describen en este trabajo los componentes hasta el momento descubiertos y que participan en el control endocrinológico de la reproducción, sin querer de ninguna manera cubrir completamente

este campo, ya que debido a la importancia que éste fenómeno adquiere en nuestros días, la cantidad de aportaciones científicas es enorme y casi imposible de cubrir.

No obstante creemos que éste esfuerzo servirá como base para iniciar cualquier otra investigación.

ANTECEDENTES

La historia de la endocrinología se remonta a fines del siglo pasado, aunque podemos decir que los principales descubrimientos sobre su función en el organismo se llevaron a cabo a principios del presente siglo.

Las primeras observaciones endocrinológicas fueron puramente clínicas, a partir de síndromes cuya etiología no estaba bien definida. Pero fueron las observaciones de Claude Bernard las primeras evidencias y las de muchos otros después, las que fueron acumulando hechos relacionados con las funciones de las glándulas endocrinas, llegandose a demostrar que sus efectos no erán debidos a la glándula misma, sino a principios activos específicos originados en ellas.

El término de "secreción endocina" fue empleado por primera vez por Claude Bernard en 1854 [3] para designar a todas las sustancias secretadas a la circulación por ciertos órganos y así poder diferenciarlas de las secreciones que no van a la sangre y las que se denominan de "secreción exócrina".

A estas sustancias o principios activos específicos se les llamó "hormonas"; término sugerido por Hardy y usado por Bayliss y St Starling en 1902 [4], que deriva de una raíz griega que significa "excitar o mover".

Entonces, podemos "definir" a una hormona, como la o las sus

tancias químicas producidas por las glándulas endocrinas que regulan y coordinan las funciones biológicas del organismo.

La demostración de la existencia de hormonas provenientes de la hipófisis com acción estímulante sobre las gónadas, fué realizada em forma independiente por Smith [5] y Zondek [6] en 1926.

Poco tiempo después Fevold, Hisaw y Leonard en 1931 [7] comprobarom que la acción gonadotrofica hipofisiaria, se debía a dos principios químicos diferentes con actividad biológica diferente. Uno de los cuales estimulaba el crecimiento del folículo en el ovario y aumentaba la espermatogénesis en el macho, el cual fué llamado hormona estimulante del folículo (FSH). Mientras que el otro, que actuaba sobre la transformación del folículo en el cuerpo luteo y en el desarrollo de las glándulas sexuales secundarias del macho, se llamó hormona estimulante de las células intersticiales u hormona luteinizante (ICSH o LH).

Em 1927 Aschheim y Zondek [8] demostraron la existencia de sustancias de actividad gonadotrofica que no tienen origen hipofisiario y que fuerom encontradas en la orina de mujeres embarazadas como, la hormona coriónica gonadotrofica (HCG).

En 1940, se logró por primera vez la purificación de la hormona luteinizante gracias a los trabajos de Li, Simpson y Evans [9] y Shedlovsky et al. [10] a partir de hipófisis de ovino y porcino, respectivamente.

La purificación de la otra gonadotrofina, la hormona estimulante del folículo, fué estudiada por Fevold et al. [11], Greep y colaboradores [12] entre otros, y fué hasta 1949 que Li y colaboradores [13] obtuvieron la forma pura.

Los trabajos más destacados efectuados para la purificación de la HCG fueron llevados a cabo por Gurin et al. en 1939 [14] y Katzman en 1943 [15].

LOCALIZACION Y SITIO DE SINTESIS DE LAS HORMONAS

La hipófisis o glándula pituitaria es un pequeño órgano conectado por un tallo al piso del tercer ventrículo y que se localiza en la silla turca situada en la base del cerebro. A partir de su localización, los primeros anatomistas pensaron que secretaba una especie de flema, que en latín se denomina "pituita" de ahí el nombre de pituitaria, por otra parte, el término hipófisis deriva del griego que significa "desarrollo".

La hipófisis está formada por tres lóbulos, anterior, medio y posterior. En general, al lóbulo anterior y al lóbulo intermedio se les conoce como adenohipófisis y al lóbulo posterior como neurohipófisis. Estas partes difieren funcional, embriológica e histológicamente. La adenohipófisis es esencialmente glandular y vascular, mientras que la neurohipófisis está íntimamente conectada con el hipotálamo a través de fibras nerviosas y algunos elementos glandulares que constituyen el tallo hipofisiario. Existe poca relaciónentre ambos lóbulos,aunque cada lóbulo tiene interacciones importantes con el hipotálamo [16/].

La adenohipófisis es una estructura compleja compuesta de por lo menos seis tipos de células, que a su vez producen seis hormonas. Tres de ellas son polipéptidos y las otras tres son hormonas glicoproteícas: la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH).

Con el uso de las técnicas histoquímicas y biofísicas,y uti

lizando el microscopio óptico se encontró que en general la adenohipó fisis posee tres tipos de células: cromófobas, basófilas y acidófilas.

En general, podemos decir que la actividad de las enzimas oxidativas e hidrolíticas es mayor en las células basófilas que en las acidófilas y que en las células cromofobas. La actividad de las enzimas puede verse afectada por la adrenalectomía, la castración y la tiroidec tomía. Se ha relacionado también la actividad de las enzimas hidrolíti cas con las funciones secretoras de la adenohipófisis ya que, después de una tiroidectomía o de una castración, su actividad aumenta más que la de las enzimas oxidativas [17].

Utilizando la tinción de Schift del ácido peryódico (PAS), se observó que sólo las células basófilas se teñian, clasificandose como células PAS positivas, y PAS negativas las células acidófilas. Estas últimas se han dividido en: acidófilas productoras de la hormona de cre cimiento y acidófilas productoras de la prolactina. Las células basófi las a su vez se han dividido: en basófilas tirotróficas y basófilas go nadotróficas, las que a su vez se subdividen en las productoras de la hormona estimulante del folículo y las que producen la hormona luteini zamte [18].

Por otra parte, Herlant y sus colaboradores [19], observaron al microscopio óptico, los cambios que ocurrían en las hipófisis de di ferentes animales durante sus ciclos de reproducción, encontrándose que todas las hipófisis mostraban cinco clases funcionales de células a las que se les asignó letras del alfabeto griego de la α - ε , de acuerdo con el sistema introducido por Romeis [20].

Con los primeros estudios realizados al microscopio electrónico, se han identificado en la hipófisis de la rata dos tipos de células productoras de gonadotrofinas. Los trabajos más sobresalientes son los realizados por Barnes [21], quien utilizando el microscopio electrónico encontró 5 variedades de células secretoras diferentes, que pudieron ser caracterizadas tomando en cuenta: forma, tamaño, posición con respecto a los vasos sanguíneos, granulación y estructuras finas citoplasmáticas. Este autor, encontró que las células β y γ se modifican después de la castración y variaban ciclicamente con el ciclo estral, lo cual le indicaba, que estas células eran las células secretoras de las gonadotrofinas.

Los estudios hechos con las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial del tejido hipofisiario, indicaban que la mayoría de las gonadotrofinas se concentraban en la fracción rica en gránulos de 200 mμ [22]; esto ha permitido relacionar el grado de granulación secretora de las células β y γ intactas con el contenido hormonal de las mismas. A partir de ésto y tomando en cuenta el tiempo que transcurre para la acumulación de los gránulos secretores y la liberación de las células β y γ durante el ciclo estral, se propuso que las células β eran las responsables de la secreción de la hormona estimulante del folículo mientras que, las células γ lo eran de la hormona luteinizante.

Los estudios efectuados en las pituitarias de machos sexualmente maduros confirmaron lo anterior, ya que contenían pocas células γ y las células β se encontraban más granuladas que las de las hembras esto concuerda con la aparentemente, mayor potencia que tiene la FSH

proveniente de la hipófisis del macho [23].

Es díficil, distinguir ultraestructuralmente los dos tipos de células, y la utilización de técnicas inmunohistoquímicas no ha facilitado la localización de las gonadotrofinas, ya que no se han obtenido antisueros suficientemente específicos necesarios para la realización de dichas técnicas.

Debido a que existe gran semejanza en las cadenas α de las gonadotrofinas se han utilizado los anticuerpos contra las cadenas que son diferentes; siendo estos adsorbidos con algunos antígenos de reacción cruzada tal como la hormona coriónica gonadotrófica (HCG).

Sin embargo, sin la utilización de los controles adecuados, ningún resultado puede considerarse totalmente válido, ya que se encontró que el antisuero anti HCG reaccionaba con la hormona estimulante de la tiroides.

Nakane[24] utilizó anti FSH ovina para localizar a las células productoras de FSH en ratas macho adultas y anti HCG para las células productoras de LH. Usando el microscopio óptico, encontró que las células que contenian FSH y LH se encontraban en el área anteroventral de la glándula. Las células de la periferia poseían ambas hormonas, mientras que las células centrales mostraban una u otra hormona.

Utilizando el microscopio electrónico, el mismo Nakane, observó que las células que contenían FSH eran de dos tipos: el tipo A eran células ovoides con gránulos secretores de 200-250 mμ dispersos entre

las vacuolas, y también reaccionaban con anti HCG; se considero que poseen ambas hormonas. Nakane supone que; este tipo de células A son semejantes a las células FSH descritas por Barnes [21] y Kurosumi [25]. Este tipo se caracteriza por poseer dos clases de gránulos; un grupo poco denso con un diámetro entre 700 y 1000 nm y un grupo denso con 200 nm de diámetro.

Las células del tipo B contenían, sólo FSH con gránulos secretores cerca de la membrana plasmática; sin embargo, parece no haber semejanza con el tipo de la célula LH de Barnes-Kurosumi.

Ya que, sus estudios no reportan controles de inmunoadsorción, sus resultados no pueden considerarse completamente válidos, puesto que el antisuero FSH de ovino tuvo reacción cruzada con otros antígenos.

Por otro lado, los estudios inmunohistológicos efectuados por Phifer [26] en hipófisis humanas, determinaron que la FSH y la LH estaban presentes en un mismo tipo celular; en estos trabajos utilizó antisueros específicos contra FSH humana, anti TSH humana y anti LH porcina. Estos antisueros no presentaron reactividad con las células productoras de hormona de crecimiento o la hormona adrenocorticotrófica y la cadena β de la hormona estimulante de los melanocitos, ni prolactina.

Estudios inmunohistológicos realizados en otras especies difieren con la idea de que una misma célula posea las dos hormonas [25].

Moriarty [27] trabajando en pituitarias de ratas y utilizando

antisueros a la cadena β de FSH y LH encontró que las células FSH y LH presentaban tres diferentes morfologías.

El tipo I eran células ovoides con gránulos grandes y pequeños, parecidas a la célula FSH de Kurosumi-Oota [25].

El tipo II eran células angulares o estrelladas con gránulos secretores de 200 a 220 μ de diámetro que predominaban durante el ciclo estral cuando la secreción de FSH y LH era elevada.

El tipo III semeja a las células adrenocorticotróficas; células estrelladas y con gránulos en la periferia.

Este autor, plantea la hipótesis de que estos tipos celulares pueden deberse a diferentes estados fisiológicos de la misma célula y que a medida que la secreción es mayor, las células van disminuyendo en su contenido de gránulos grandes, transformandose en células estrelladas. El incremento de células FSH y LH angulares o estrelladas en el proestro y el estro, apoya tal hipótesis.

Por otra parte, sus resultados concuerdan con los de Nakane ya que también encontró que una misma célula posee tanto FSH como LH, y otras células sólo una de ellas. Este mismo autor observó la presencia de una subpoblación de células que contenían únicamente a una hormona, lo cual le hizo pensar que se trataba de un proceso de diferenciación.

La evidencia de que posiblemente, ambas hormonas se sintetizen en la misma célula ha hecho pensar en el control de su liberación; ya que la secreción de varias hormonas podría ocasionarse simplemente por la acción de una sola sustancia.

ESTRUCTURA QUIMICA

El grupo de las hormonas gonadotroficas esta formado por la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona coriónica gonadotrófica (HCG). Desde el punto de vista químico, estas hormonas poseen gran semejanza, ya que están constituidas por una parte proteíca y otra de carbohidratos por lo que se les llama glicoproteínas (Ver Tabla I). Una característica especial de estas hormonas es la de tener dos subunidades química y estructuralmente diferentes, denominadas α y β.

La subunidad α es semejante en las tres hormonas respecto a la composición de aminoácidos y a la estructura primaria. Mientras que la subunidad β es la fracción que las distingue y donde se cree residen principalmente las propiedades biológicas; inmunologicamente está subunidad confiere especificidad.

Cadena Polipeptídica

La hormona luteinizante y sus subunidades han sido aisladas y purificadas de diferentes especies (bovinos[28/], porcinos[29/], ovinos [30/], ratas[31/] y humanos[32/]). La secuencia de la subunidad α de ovinos fué reportada por Papkoff, Sairam y Li en 1971[33/], y por Liu en 1972[34/], ambas secuencias erán idénticas excepto en el dipéptido de la posición 88-89, el cual Papkoff reportó como Ser-Cys. La secuencia de la subunidad α de la LH bovina es idéntica a la de la especie ovina de acuerdo con los datos de Liu y colaboradores[34/]. Sairam, Papkoff y Li en 1972[35/] determinaron la secuencia completa de los aminoácidos que componen la

subunidad α de la LH humana.

Se ha observado cierta homología entre las estructuras primarias de las subunidades α de la LH de diferentes especies, en donde un 70% de los resíduos son idénticos y el otro porciento restante es diferente, lo cual puede deberse a la sustitución o cambio de una sola base en el codon (Fig. I).

Varios autores, al encontrar esas zonas semejantes en las diferentes hormonas han sugerido que tales regiones puedan tener importancia en la interacción de la hormona o bien en su función, como sucede con los residuos de cisteína que conservan la misma posición en las tres hormonas.

La secuencia del péptido 24 a 46 de la LH es igual en ovino, bovino y humano, por lo que Bishop, Nureddin y Ryan[36] han sugerido que esta fracción tenga una participación importante, sea en la interacción con el receptor o en la combinación con la otra subunidad. Comentarios similares han sido aplicados al péptido que va del residuo 66 al 89 en el cual existe sólo variación en el residuo 78.

Al estudiar la secuencia de los aminoácidos en las subunidades β de hLH, HCG y hFSH se ha encontrado que también poseen zonas de secuencias comunes. La secuencia del péptido 34 a 38 con una tirosina en la posición 37 es idéntica en todas las preparaciones estudiadas de hormona humana.

Al comparar las cadenas β de LH y HCG humanas, una de las ma

yores diferencias observadas se localiza en el extremo, en el cual la HCG es mayor por 28-30 residuos y además es la región donde se localizan las cadenas de carbohidratos[37]. Al parecer las diferencias en la actividad biológica e inmunológica entre estas hormonas reside en este péptido.

Se han realizado numerosos experimentos usando técnicas de modificación química con el objeto de estudiar él o los sitios que participan en la interacción entre ambas subunidades y los necesarios para la actividad biológica, por ejemplo la modificación del grupo tirosilo de la LH ovina y bovina, utilizando tetranitrometano[38,39]. Las hormonas luteinizantes de estas especies contienen 7 residuos de tirosilo; 5 en la subunidad α y 2 en la subunidad β. Se ha observado que después de la nitración de un residuo de tirosina, la hormona retiene el 40% de la actividad biológica y la inactivación de un número mayor reduce la actividad al 10%.

La nitración de los residuos tirosilo de la subunidad β de LH ovina no afectaron su capacidad para combinarse con la subunidad α. Esto sugiere que los grupos tirosilo de la subunidad β esten enmascarados en la hormona natural y que estas tirosinas no esten directamente involucradas en la interacción con la subunidad α o que la nitración no afecte dicha interacción.

Liu et al. en 1974[40], encontraron que al introducir grupos nitro a la subunidad α de la LH ovina, disminuye significativamente la unión de esta subunidad, con la subunidad β nativa, reduciendo notablemente además su actividad biológica.

Al investigarse los grupos ε-amino de los residuos de lisina y los grupos amino libres terminales, se encontró que la subunidad α de la LH ovina contenía 10 residuos de lisina y la subunidad β solo dos residuos. Los datos de Liu y colaboradores[40] indican que:

a) dos grupos amino en la βLH ovina participan en la unión al receptor y pueden estar cargados positivamente o estar neutros.

b) dos grupos amino de la subunidad α estaban relacionados con la unión a la subunidad β y estan enmascarados.

c) y que de dos a ocho grupos amino de la subunidad α estan involucrados en la unión con el receptor (Fig. 2).

Carbohidratos

Existe controversia respecto a la función de los carbohidratos en las actividades biológicas e inmunológicas de las hormonas proteícas. Aunque se habia reportado inicialmente que la actividad biológica de la LH humana no se afectaba por la remoción de los residuos de ácido siálico, Mori 1970[41].

Van Hall et al.[42] demostráron, sin embargo que la actividad biológica de la HCG purificada se redujó a menos del 1% debido a la desialización completa cuando la hormona se trató con neuraminidasa.

Braunstein y colaboradores[43] utilizaron este aparente efecto diferencial de la desialización sobre la actividad biológica para discriminar entre HCG y hLH contenida en extractos de orina. Estos autores observaron una marcada perdida de la actividad biológica de esas prepa

raciones cuando utilizaron el tratamiento con una neuraminidasa carente de actividad proteolítica. Los resultados obtenidos mostraron que con 66% de dialización permanecia 0.78% de ácido N-acetilneuraminico y un 94% de desialización tenía 0.14% de ácido N-acetilneuraminico.

Esta disminución de bioreactividad puede deberse a un incremento en la eliminación metabólica de la hLH, como se ha demostrado que ocurre para la HCG, FSH y otras glicoproteínas después de la desialización[44/]. Cuando se señalaba en los reportes anteriores que la actividad biológica no se afectaba por la desialización, no se incluían ni la cantidad de ácido siálico removido ni la concentración remanente con lo cual resulta díficil deducir la participación de ese carbohidrato.

La inmunoreactividad de hLH (método del doble anticuerpo de RIA) usando un antisuero contra HCG es mejorado casi 1 1/2 veces por la remoción del ácido siálico, sin embargo Mori empleando la técnica de fijación de complemento, no encontró ningún aumento, aunque sí observo cambios en la actividad de hLH tratada con quimotripsina[45/].

La inmunoreactividad de estas hormonas muestra resultados variables, mientras que la actividad inmunológica de la HCG desializada no mostró cambio; las preparaciones de FSH urinaria demostraron un aumento en la inmunoreactividad y una perdida de la actividad biológica después de la desialización.

Este aumento o mejora de la inmunoreactividad de hLH pituitaria puede deberse a la exposición de los sitios inmunoreactivos, al ser removidos los residuos del ácido siálico. Las diferentes potencias

observadas en los ensayos biológicos e inmunológicos de múltiples preparaciones de hLH puede deberse a una desialización parcial de algunas de esas preparaciones durante su purificación.

El contenido de aminoácidos de las diferentes gonadotrofinas ha sido obtenido por varios autores desde 1963. Las tablas II, III y IV resumen los resultados logrados en algunos laboratorios para hLH, la hFSH y la hCG, respectivamente. Con propósitos de comparación, en la Tabla I se representan los valores promedio de las tablas anteriores.

Como puede observarse, existe gran semejanza en el contenido de aminoácidos de la hLH y la hCG; la hFSH muestra diferencias grandes en el contenido de arginina, valina y prolina, y diferencias menores en ácido aspártico, treonina y serina.

Cabe notar el alto contenido de prolina mostrado por las tres hormonas (11.4%, 6.7% y 11.2% en hLH, hFSH y hCG, respectivamente), ya que este aminoácido rompe la estructura de hélice α nos hace pensar en que el porcentaje de está estructura sea muy bajo.

Estructura Primaria

El estudio de la estructura primaria de las subunidades fué iniciado en 1972 por los trabajos de Inagami[46/] con la hLH cuando obtuvo la secuencia de los primeros 35 residuos de la subunidad α. Más tarde, Sairam et al.[47/] fueron los primeros en publicar la secuencia completa de esta subunidad. La secuencia de 35 aminoácidos obtenida por Inagami

no muestra diferencia con la secuencia total (Fig. $3A_1$).

Ward y colaboradores en 1973[48], revelaron la secuencia de los primeros 27 residuos de la subunidad β de la hLH. Mientras que Shome y Parlow[49], Sairam et al.[50] y Closset et al.[51] obtuvieron la secuencia completa. En la figura $3A_2$ se muestran las secuencias de la subunidad β de la hLH propuestas; tomando como base la secuencia obtenida por Sairam y colaboradores.

En este caso sí existen diferencias en los primeros 27 residuos principalmente en la región que corresponde a los residuos 8 a 10 y en el residuo 13 y 15. Las diferencias más importantes encontradas entre los grupos de Sairam, Shome y Closset se localizan en la región 41 y el residuo 44, y en los residuos 52 y 55. En la región COOH-terminal existe una notable diferencia en los residuos del 110 al residuo 115.

Shome y Parlow en 1974[52,52a] fueron los primeros en publicar la secuencia completa de aminoácidos de la subunidad α y β de la hFSH. Y más tarde Rathnam y Saxena[53,54] publican las secuencias de aminoácidos de las dos subunidades obtenidas en su laboratorio. Estas secuencias se muestran en la figura 4B. La diferencia principal se localiza en la región NH_2-terminal de la subunidad α en la que Rathnam y Saxena obtienen un tripéptido extra con lo cual la secuencia de estos últimos consta de 92 residuos.

En la figura $4B_2$ se muestran las secuencias de la subunidad β; las diferencias importantes se encuentran en los residuos 21 y 22,

en la región del residuo 27 al 31 y en la zona que corresponde del residuo 33 al residuo 38 así como en los residuos 48 y 50, y en la región COOH-terminal. Rathnam obtiene 118 residuos y Shome sólo 115.

Los primeros investigadores que publicaron la secuencia de aminoácidos de la subunidad α y β de la hCG fueron Bahl et al. en 1972 [55]. En 1973 Bellisario[56] informó de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α y Carlsen[57] de la subunidad β. Más tarde, en 1975 Morgan et al.[58] describen las secuencias de ambas subunidades.

En la figura $5C_1$ se comparan las secuencias publicadas de la subunidad α de la hCG, en la cual hay diferencia en la colocación de los residuos 25 y 26. La figura $5C_2$ muestra las secuencias obtenidas de la subunidad β de la HCG, en la cual se puede observar diferencia en los residuos 28,30,56 y 86; en la región de los rsiduos 89 al residuo 93 y en la región COOH-terminal. Además en la localización de las cadenas de carbohidratos existe diferencia en las posiciones 28,30,118, 121,126 y 137.

Debido a la controversia existente en la región COOH-terminal de la β hCG, Birken y Canfield[59], y Keutmann y William[60] realizaron independientemente experimentos con esa subunidad, comprobando que la secuencia propuesta por Morgan en 1975, entre los residuos 115 a 145 era la correcta.

HORMONA LUTEINIZANTE

```
h LH                                                                NH2  Val   Gln   Asp   Cys   Pro   Glu
o,b,LH     NH2—Phe — Pro — Asp — Gly — Glu — Phe — Thr — Met                Gly
                 20                                                                10
Ile — Pro — Ala — Gly — Pro — Gln — Ser — Phe — Phe — Pro — Asn — Gln — Gln — Leu — Thr — Cys
                    Asp          Lys              Tyr   Lys              Lys          Lys
                                                                  30
Leu — Gln — Cys — Met — Gly — Cys — Cys — Phe — Ser — Arg — Ala — Tyr — Pro — Thr — Pro — Leu
Tyr
                                  50                                                      40
Ser — Glu — Ser — Thr — Val — Asn — Lys — Gln — Val — Leu — Met — Thr — Lys — Lys — Ser — Arg
Ala                       Ile    CHO            Pro
                                                 60                                                   70
Thr — Cys — Cys — Val — Ala — Lys — Ser — Tyr — Asn — Arg — Val — Thr — Val — Met — Gly — Gly
                                      Ala   Phe   Thr   Lys   Ala
                                                 80
Tyr — Tyr — Cys — Thr — Ser — Cys — His — Cys — Ala — Thr — His — Asn — Gly — Val — Lys — Phe
                                              Glu                CHO                  Arg — Val
                                 89
His — Lys — Ser — COOH
```

FIG. I ESTRUCTURAS PRIMARIAS DE LA SUBUNIDAD α DE LA LH HUMANA, OVINA Y BOVINA.

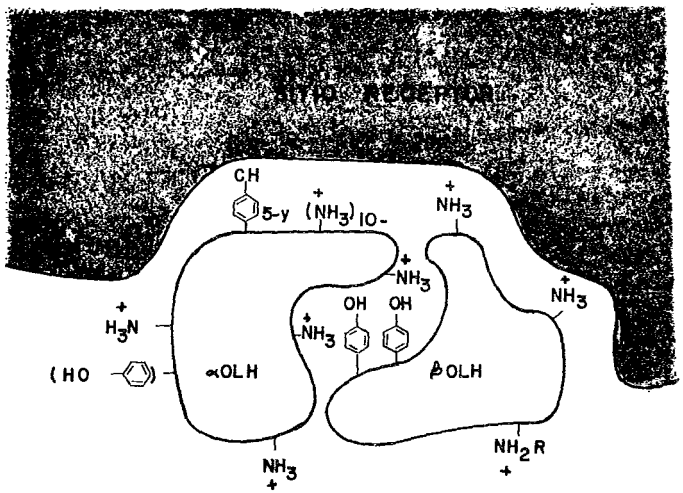


FIG. 2 Sitios involucrados en la interaccion entre las subunidades y la union con su receptor 40/.

TABLA I

COMPOSICION QUIMICA DE LAS HORMONAS GONADOTROFICAS

AMINOACIDO	hLH	hFSH	hCG
Lisina	10	10	10
Histidina	5	4	4
Arginina	13	6	16
Aspartico	15	1 3	18
Treonina	17	13	17
Serina	15	12	17
Glutámico	20	17	18
Prolina	25	11	25
Glicina	13	10	12
Alanina	11	11	22
Cisteína 1/2	15	13	18
Valina	17	8	17
Metionina	5	6	4
Isoleucina	8	5	6
Leucina	13	10	15
Tirosina	8	7	7
Fenilalanina	8	6	6
Triptofano	-	1	-
Azúcares neutros	11.3%	3.9%	14.0%
Acetil hexosamina	4.9%	2.9%	11.4%
Acido siálico	2.0%	1.4%	10.3%
Fucosa	-	0.4%	0.6%
Referencia	61/	62/	63/

Los resíduos de aminoácidos son promedio de los valores de las Tablas II, III y IV

TABLA II

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA *

AMINOACIDO	1963	1967	1968	1970	1971		1972
Lisina	10	10	10	10	10	10	10
Histidina	5	5	6	9	6	6	6
Arginina	9	10	14	13	16	16	16
Aspártico	12	13	14	18	15	16	17
Treonina	15	15	15	22	15	16	16
Serina	13	15	14	17	12	18	16
Glutámico	16	18	19	21	22	24	22
Prolina	16	23	23	29	27	25	33
Glicina	11	13	14	14	7	16	16
Alanina	9	11	11	12	8	17	16
Cisteína 1/2	9	8	20	16	12	22	19
Valina	13	15	18	16	13	22	22
Metionina	4	4	5	7	9	5	4
Isoleucina	5	6	6	9	12	8	9
Leucina	15	13	14	10	12	16	14
Tirosina	9	4	6	9	12	7	7
Fenilalanina	14	6	7	9	9	7	5
Triptófano	N.A.	N.A.	N.A.	1	N.A.	N.A.	N.A.
Referencia	64/	61/	65/	66/	67/	32/	68/

* Valores calculados en base a 10 residuos de lisina.

N.A. no analizado.

TABLA III

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO HUMANA*

AMINOACIDO	1967	1968		1969	1971	1974		1976
Lisina	10	10	10	10	10	10	10	10
Histidina	3	5	5	4	4	4	4	4
Arginina	4	7	7	6	7	7	5	7
Aspártico	13	15	12	16	11	13	14	12
Treonina	6	13	16	15	15	14	19	9
Serina	7	13	12	7	13	12	15	17
Glutámico	10	19	16	22	17	16	16	17
Prolina	7	12	10	10	11	12	13	10
Glicina	9	13	9	10	7	8	17	8
Alanina	10	12	9	9	9	9	18	9
Cisteína 1/2	8	12	11	14	11	10	18	18
Valina	1	2	2	2	15	14	13	12
Metionina	7	5	16	5	9	3	3	3
Isoleucina	3	5	6	6	3	8	7	5
Leucina	10	12	7	10	11	10	10	10
Tirosina	4	3	8	7	8	10	7	9
Fenilalanina	5	7	6	7	6	6	5	6
Triptófano	1	N.D.	3	N.D.	1	N.D.	1	N.D.
Referencia	63/	69/	70/	71/	72/	73/	51/	53/

* Valores calculados en base a 10 residuos de lisina.

N.D. no detectable.

TABLA IV

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HORMONA CORIONICA GONADOTROFICA HUMANA *

AMINOACIDO	1968	1969		1970		1971
Lisina	10	10	10	10	10	10
Histidina	5	4	4	4	5	4
Arginina	15	15	15	16	19	15
Aspártico	18	17	19	19	16	18
Treonina	18	17	17	17	16	18
Serina	19	22	19	21	14	20
Glutámico	18	18	20	17	19	18
Prolina	27	28	29	21	21	27
Glicina	14	12	14	12	6	13
Alanina	14	12	13	13	7	13
Cisteína 1/2	14	20	18	20	16	22
Valina	16	18	17	17	13	19
Metionina	43	4	2	3	4	4
Isoleucina	6	5	6	6	5	8
Leucina	15	15	16	15	13	18
Tirosina	8	6	6	8	8	6
Fenilalanina	7	5	6	7	7	6
Triptófano	-	-	-	-	-	1
Referencia	7 4/	6 3/	7 5/	7 6/	7 7/	7 8/

* Valores calculados en base a 10 residuos de lisina.

HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA

SUBUNIDAD α

NH_2 – Val – Gln – Asp – Cys – Pro – Glu – Cys – Thr – Leu – Gln – Glu – Asn – Pro – Phe – Phe

Ser – Phe – Cys – Cys – Gly – Met – Cys – Gln – Leu – Ile – Pro – Ala – Gly – Pro – Gln – Ser

Arg – Ala – Tyr – Pro – Thr – Pro – Leu – Arg – Ser – Lys – Lys – Thr – Met – Leu – Val – Gln

Asn – Tyr – Ser – Lys – Ala – Val – Cys – Cys – Thr – Ser – Glx – Ser – Thr – Val – Asn – Lys
CHO

Arg – Val – Thr – Val – Met – Gly – Gly – Phe – Lys – Val – Glx – Asn – His – Thr – Ala – Cys
CHO

COOH – Ser – Lys – His – Tyr – Tyr – Cys – Thr – Cys – Ser – His

FIG. 3A, SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD α DE LA hLH

SUBUNIDAD β

Glx

Tre

NH_2–Ser – Arg – Glu – Pro – Leu – Arg – Pro – Trp – Cys – His – Pro – Ile – Asn – Ala – Ile – Leu – Ala

Glx — Val, Trp — Gln — Asn, Arg — Ile, Tre

Ala – Cys – Ile – Thr – Thr – Asn – Val – Thr – Ile – Cys – Val – Pro – Cys – Gly – Glu – Lys – Gln – Val

30 — Glx — Glu

Arg Met Leu — Val

Gly – Tyr – Cys – Pro – Thr – Met – Met – Arg – Val – Leu – Gln – Ala – Val – Leu – Pro – Pro – Leu – Pro

40 — Met — Arg

Pro

Cys – Gly – Pro – Leu – Arg – Ile – Ser – Glu – Phe – Arg – Val – Asp – Arg – Tyr – Thr – Cys – Val – Gln

70 — 60

Pro – Arg – Gly – Val – Asp – Pro – Val – Val – Ser – Phe – Pro – Val – Ala – Leu – Ser – Cys – Arg – Cys

80

Asx

Leu – Pro – His – Asp – Lys – Pro – Gly – Gly – Cys – Asp – Ser – Thr – Ser – Arg – Arg – Cys – Pro – Gly

100 — 90

Glx – Asx – Ser – Lys – Gly – COOH

Thr – Cys – Asp – Pro – Gln – His – Ser – Gly – COOH

110 — 115

Asx – Glx – Pro – His – (Ser, Lys, Gly) – COOH

FIG. $3A_2$ SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD β DE LA LH PROPUESTA POR SAIRAM ET AL, 1973., WARD ET AL (◯) 1973. SHOME Y PARLOW (▢) 1973, CLOSSET ET AL(▭) 1973.

HORMONA HUMANA ESTIMULANTE DEL

FOLICULO. SUBUNIDAD α

NH_2 – Val – Glx – Asp – Cys – Pro – Glx – Cys – Thr – Leu – Glx – Glx – Asn
(10)
Glu Glu Glu

NH_2 Ala Pro Asp

Cys – Gly – Met – Cys – Gln – Leu – Ile – Pro – Ala – Gly – Pro – Gln – Ser – Phe – Phe – Pro
(20)

Cys – Phe – Ser – Arg – Ala – Tyr – Pro – Thr – Pro – Leu – Arg – Ser – Lys – Lys – Thr – Met
(30) (40)

Lys – Ala – Val – Cys – Cys – Thr – Ser – Gln – Ser – Thr – Val – Asn – Lys – Gln – Val – Leu
(60) (50)
Glu CHO

Ser – Tyr – Asn – Arg – Val – Thr – Val – Met – Gly – Gly – Phe – Lys – Val – Glx – Asn – His
(70)
Glu CHO

COOH – Ser – Lys – His – Tyr – Tyr – Cys – Thr – Ser – Cys – His – Cys – Ala – Thr
(89) (80)

FIG 4B. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD α DE LA hFSH DESCRITAS POR SHOME Y PARLOW, 1974, RATHNAM Y SAXENA (◯), 1975.

SUBUNIDAD β

NH_2 – Asx – Ser – Cys – Glu – Leu – Thr – Asn – Ile – Thr – Ile – Ala – Ile – Glu – Lys – Glu
(CHO; 10)

Thr – Glu – Trp – Asx – Thr – Thr – Thr – Asn – Ile – Ser – Ile – Cys – Phe – Arg – Cys – Glu
(CHO; 30; 20)

[Tyr – Gly – Ala – Cys – Tyr] [Tre] – [Leu]

Cys – Ala – Gly – Tyr – Cys – Tyr – Thr – Arg – Asp – Leu – Val – Tyr – Lys – Asp – Pro – Ala
(40)

Tyr – Thr —————————— [Asn]

Glu – Tyr – Val – Leu – Glu – Lys – Phe – Thr – Cys – Thr – Lys – Gln – Ile – Arg – Pro – Lys
(60; 50)

[Lys] [Arg]

Thr – Val – Arg – Val – Pro – Gly – Cys – Ala – His – His – Ala – Asp – Ser – Leu – Tyr – Thr
(70)

Ser – Asp – Ser – Asp – Cys – Lys – Gly – Cys – His – Cys – Gln – Thr – Ala – Val – Pro – Tyr
(90; 80)

Thr – Asp – Cys – Thr – Val – Arg – Gly – Leu – Gly – Pro – Ser – Tyr – Cys – Ser – Phe – Gly
(100; 110)

[COOH – Tyr – Ser – Leu – Ala – Thr – Pro – Tyr – Gln – Lys]

COOH – Lys – Glx – Met – Glu
(115)

FIG. 4B2 SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD β DE LA hFSH REALIZADA POR LOS GRUPOS DE SHOME Y PARLOW, 1974., RATHNAM Y SAXENA (▭), 1976

HORMONA CORIONICA GONADOTROFICA HUMANA

SUBUNIDAD α

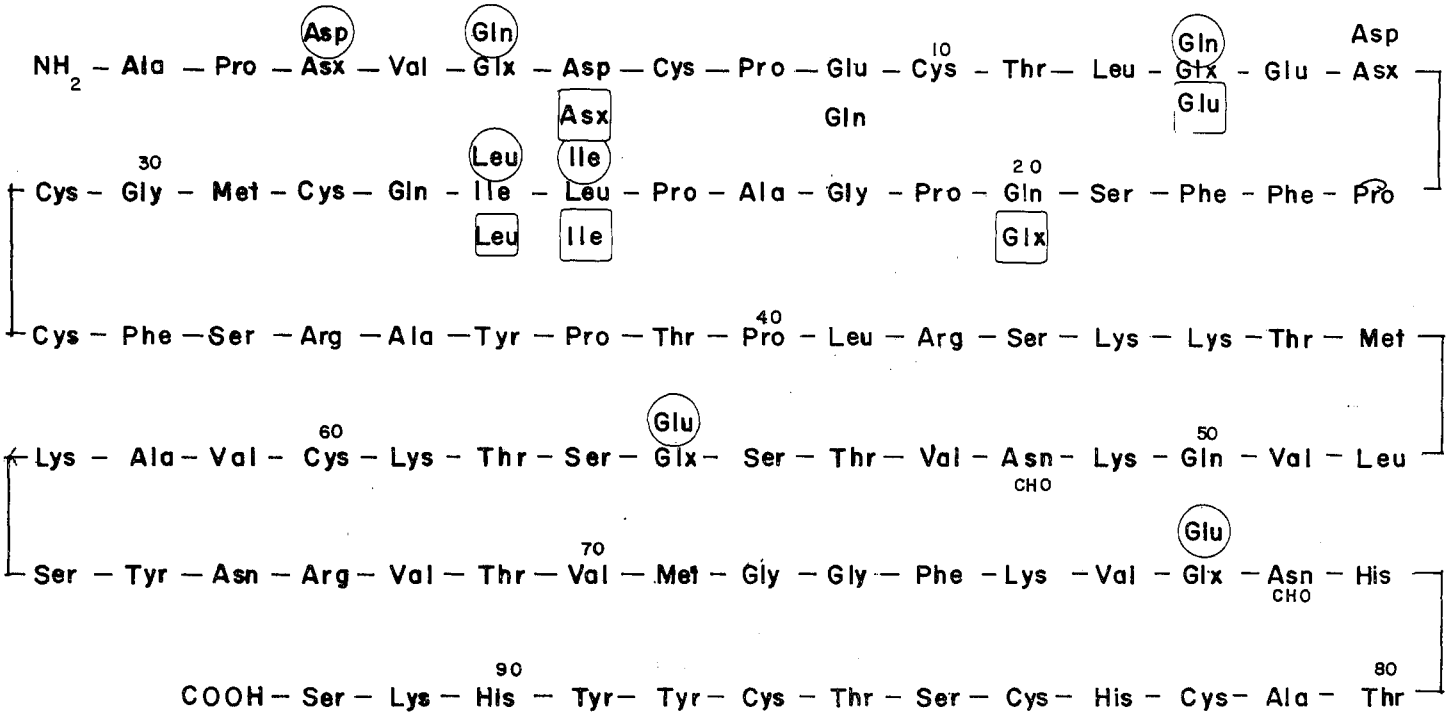


FIG 5C, SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA SUBUNIDAD α DE LA hCG DESCRITA POR BAHL ET AL, 1972., BELLISARIO ET AL (□) 1973 Y MORGAN ET AL (○), 1975.

SUBUNIDAD β

NH2 — Ser — Lys — Glu — Gln — Pro — Leu — Arg — Pro — Arg — Cys — Arg (10) — Pro — Ile — Asn (CHO) — Ala — Thr

Thr — Asn (CHO, Thr) — Val — Thr (Asn DHO) — Ile — Cys — Val — Pro — Cys — Gly — Glu — Lys (20) — Glu (Glx) — Val — Ala — X (NO EXISTE) — Leu

Thr — Thr — Ile — Cys — Ala — Gly — Tyr — Cys — Pro — Thr (40) — Met — Thr — Arg — Val — Leu — Gln

Val — Asp — Arg (60) — Tyr — Asn — Cys — Val — Leu (Val) — Glx (Gln) — Pro — Leu — Ala — Pro (50) — Leu — Val — Gly

Arg — Phe — Glu — Ser — Ile — Arg — Leu — Pro (70) — Gly — Cys — Pro — Arg — Gly — Val — Asn — Pro

(Arg) Arg (Arg) — Cys — Leu — Ala — Cys (90) — Gln — Cys — (Leu, Ser) (Leu) — Ala — Val — Ala — Tyr — Ser — Val (80) — Val

Ser — Thr — Thr — Asp — Cys (100) — Gly — Gly — Pro — Lys — Asp — His — Pro — Leu — Thr — Cys (110) — Asp

Leu — Ser (Ser, CHO) — Pro — Pro — Pro — Ala — Lys — Ser (Ser, CHO) — Ser (120) — Ser — Ser (Ser, CHO, Ser) — Asp — Gln — Phe — Arg — Pro — Asp

Pro — Ser (CHO, Ser) — Pro (130) — Ser (CHO) — Arg — Leu — Pro — Gly — Pro — Pro — Asx — Thr — Pro (140) — Ile — Leu — Pro

COOH — Gln (145)

COOH — Pro (147) — Leu — Ser — Gln

FIG. 5C2 SECUENCIA DE LA SUBUNIDAD β PROPUESTA POR CARLSEN ET AL, 1973. BAHL ET AL, (□) 1972. Y MORGAN ET AL, (○) 1975.

CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES DE LAS GONADOTROFINAS

Disociación en pequeñas subunidades

En 1959 Squire y Li, y Ward et al. encontraron que el coeficiente de sedimentación para la ICSH ovina a pH 6.8 era de 2.47S y a pH 6.0 de 2.32S, con lo que ellos calcularon un peso molecular de 28 000 y 30 000, respectivamente.

Posteriormente Li y Starman en 1964[79/], al reexaminar el comportamiento de sedimentación de esta hormona, encontraron que su peso molecular cambiaba con el pH de la solución reguladora. Así, a pH 1.3 el peso molecular de esta hormona fué de 16 300, esto es, aproximadamente la mitad del peso molecular calculado a pH entre 6 y 7, con lo cual sugirieron que la ICSH ovina, en medio ácido, se disocia en subunidades más pequeñas.

En 1966, Ward y colaboradores[80/] aislaron dos fracciones de carbohidratos aparentemente asociados a diferentes glicopéptidos con lo cual propusieron un modelo de LH ovina compuesta de dos subunidades diferentes, pero de pesos moleculares semejantes.

Aislamiento de las dos subunidades

Los estudios de Papkoff y Samy en 1967[81/], al someter a la ICSH ovina a una distribución a contra corriente, separaron dos fracciones a las que denominaron CI y CII. Esto confirmaba las observaciones

LH tipo A (Tabla V), encontraron que el análisis de la subunidad α de la LH A era similar al de las subunidades α de la FSH y de la HCG. Sin embargo, la subunidad β de FSH posee menos arginina que las subunidades β de la LH y de la HCG.

Estas observaciones sugieren una homología entre las subunidades α de la LH, de la FSH y de la HCG, no obstante existir diferencias significativas en el contenido de algunos aminoácidos entre las subunidades β de la LH, la FSH y la HCG, lo cual sugiere aparentemente que las subunidades sean específicas de cada hormona. Los estudios de recombinación de las diferentes subunidades de las hormonas, realizado por estos mismos autores confirman esta idea.

Reasociación de subunidades

Al comparar la composición de los aminoácidos de la cadena de la HCG[77] con las cadenas de TSH humana[84] y TSH bovina[85]. Bahl y colaboradores[86] encontraron que la composición de las dos subunidades polipéptidicas de las hormonas humanas son semejantes, sin embargo la cadena de orígen bovino difiere en el contenido de lisina, alanina y leucina, y probablemente de valina y serina (Tabla VI).

Bahl et al. efectuaron recombinaciones de las subunidades α y β de hCG, hLH y TSH bovina. Al recombinar la subunidad α de la hCG con la subunidad β de la TSH bovina, se observó una buena respuesta de la actividad de TSH, pero no tan potente como la recombinación de las subunidades α y β de TSH bovina.

descritas anteriormente de que la LH ovina está formada de dos cadenas polopéptidicas diferentes. La actividad biológica de las fracciones aisladas CI y CII fué el 7.1 y 8.1%, respectivamente, de la actividad mostrada por la LH nativa.

Al recombinar las subunidades se recuperó únicamente el 20% de la actividad de la hormona nativa. Esto podría ser explicado ya que la actividad biológica de la hormona es sensible al medio ácido. Posteriormente en 1968 estos mismos autores[82], recombinaron las subunidades a pH 6.0 y recuperam casi totalmente la actividad biológica.

De la Llosa y Jutisz en 1969[83], al disociar la LH ovina en un medio con úrea y clorhídrato de guanidina obtuvieron también dos subunidades de peso y tamaño molecular de aproximadamente la mitad de la molécula original. Aunque, a concentraciones elevadas de úrea y clorhídrato de guanidina, la disociación de la hormona fué total,en general, la disociaciém es más especifica a valores de pH menores a 3 y mayores de 12. Entre pH 5 a 10 la disociación es parcial.

Especificidad de la subunidad β

A partir de la observación de Li y Starman de que la LH ovina estaba formada por dos subunidades, se encontró que otras hormonas glicoproteícas como HCG[77,78], TSH[84] y FSH[72], también constaban de dos subunidades.

Rathnam y Saxena en 1971[67] al comparar los análisis de los aminoácidos provenientes de las subunidades de FSH[72], de la HCG[77] y de la

Se observó actividad gonadotrofica (Tabla VII) al recombinar las subunidades α de la TSH o LH bovinas con la subunidad β de la hCG. Estas observaciones demuestran la existencia de una semejanza de la subunidad α de la hCG con las subunidades α de la TSH y LH bovinas.

No obstante, hay diferencia en el contenido de los carbohidratos de las subunidades; puesto que la subunidad α de la hCG posee ácido siálico, el cual no esta presenta ni en las subunidades α de la TSH y ni de la LH bovinas[77,86]. Estas diferencias se reflejan en las propiedades inmunológicas, ya que la subunidad α de la hCG precipita con antisuero para la subunidad α de la TSH humana y no con el antisuero para las subunidades α de la TSH y LH bovinas.

Efecto de la asociación y disociación de las subunidades sobre la conformación de las proteínas

Los resultados obtenidos en los estudios que han sido realizados por Jirgensons y Ward[87], y Li et al.[88], han originado una controversia en este campo.

Las determinaciones de las constantes de Drude y Moffitt por dispersión óptica sugirieron a Jirgensons y Ward en 1960 que la LH carrcia de una conformación de hélice α. Posteriormente, al realizar estos investigadores el estudio de la LH ovina y sus subunidades por medio del dicroismo circular(DC), encontraron la ausencia de un pico negativo cercano a 222 nm que es característico de la conformación α-hélice.

Al comparar las curvas de DC obtenidas en el ultravioleta lejano, estos mismos autores, observaron que la conformación de la subunidad α(CI), difiere enormemente de la conformación de la subunidad β(CII), sin embargo, no existen cambios apreciables al producirse la disociación.

Se observo que la subunidad CII mostró una estructura más ordenada debido, probablemente al contenido relativamente alto en aminoácidos hidrofóbicos. La acidificación del medio hasta pH 3.5 produjó cambios en el espectro de dicroismo circular de la hormona nativa, no obstante la disminución posterior del pH a valores más bajos (pH 1.8) produjo cambios poco importantes, los cuales no se observan si el pH se disminuye hasta un valor de 1.3 .

Bewley, Sairam y Li en 1972[88/] indican que los espectros de las dos subunidades α y β, no poseen ninguna cantidad apreciable de estructura ordenada y que la banda fuertemente negativa a 196-196 nm es una característica dominante de ambas hormonas.

En 1973, Merz y colaboradores[89/] utilizando métodos inmunológicos y espectroscópicos para estudiar la recombinación de las subunidades α y β de hCG, demostraron que durante la recombinación aparecia una especie molecular con comportamiento inmunológico diferente al de la hormona original o a las subunidades aisladas. Los espectros de DC confirmaron lo anterior, puesto que se observaba un máximo cuando las subunidades eran recién mezcladas y que esta señal no la presentaba ninguna de las cadenas ni la hormona nativa, y además decrecia en magnitud al pasar el tiempo.

Bishop y Ryan en 1973[90] encontraron que el espectro de absorción en la región ultravioleta de la hLH se desviaba hacia el rojo al compararse con el espectro de las subunidades. Confirmando que estos cambios hacia longitudes de onda mayores dependian del tiempo de recombinación de las subunidades α y β. Tales cambios espectrales ocurrian en el rango 260-290 nm y se debian al exponerse los grupos aromáticos laterales a un medio más o menos acuoso, durante la recombinación.

La cinética de disociación y reasociación de la LH ovina fué estudiada por Bewley y Sairam en 1974[91], para investigar la naturaleza de las diferencias conformacionales entre la hormona nativa y sus subunidades. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6 y se pueden resumir asi:

1) la disociación de la LH ovina es unareacción de primer orden dependiente del pH. Observese que a pH 3.6 se disocia totalmente en 3-4 horas.

2) el primer paso de la reasociación, es la formación de un complejo estable α- β. Está reacción es rápida y parece ser de segundo orden; simultáneamente ocurre una segunda reacción que origina la formación de un agregado de subunidades homólogas.

3) el complejo α- β sufre un rearreglo lento de primer orden, en el que parece que por lo menos un residuo de tirosina de cada subunidad queda colocado en el interior del complejo.

La designación del producto final de la reasociación como LH' se hizo porque tal vez existia alguna diferencia entre la hormona nativa y la reasociada . Generalmente la LH' posee solo de un 50-60% de la actividad biológica del material inicial.

Al efectuar la digestión de la gonadotrofina coriónica y de sus subunidades α y β con carboxipeptidasas A, Merz et al.[92] observaron que la remoción de los residuos 88 a 92 (Tyr-Tyr-His-Lys-Ser-) de la región C-terminal de la subunidad α originó la perdida total de la actividad biológica cuando era recombinada con la subunidad β, lo que les hizo pensar en la posibilidad de que la remoción de tales residuos puede inducir cambios conformacionales en esta subunidad con lo cual no se favorece la interacción con la subunidad β natural.

La digestión de la subunidad β con carboxipeptidasa Y produjo la liberación de los residuos 143 a 145 (-Leu-Pro-Gln-) de la región C-terminal; está subunidad β modificada al ser recombinada con la subunidad α nativa no mostró efecto sobre la actividad biológica, pero sí sobre la actividad inmunológica, lo que puede indicar que la determinante inmunológica de la gonadotrofina coriónica se encuentre cerca de la región C-terminal de la subunidad β.

Recientemente, Daniels-Mc Queen et al.[93] lograron aislar los RNA mensajeros para las subunidades α y β de lahCG. Sus resultados muestran una concentración de subunidad α mayor que la de subunidad β, lo cual sugiere que la síntesis de la subunidad β sea limitante para la concentración de la hormona circulante "in vivo".

También observaron que el mRNA extraído de las placentas durante el primer trimestre, sintetiza más subunidades α y β que el mRNA de la placenta a término, el cual sólo sintetiza subunidad α. Estos estudios muestran la existencia de dos tipos diferentes de mRNA encargados de sintetizar de manera independiente cada una de las subunidades.

TABLA V

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES DE LA LH A, FSH y HCG						
	*LH A		*FSH		*HCG	
AMINOACIDO	α	β	α	β	α	β
Lisina	5.3	3.9	5.6	6.5	7.8	3.5
Histidina	3.3	3.8	3.2	1.6	3.9	1.1
Arginina	5.3	8.0	4.0	3.0	4.2	10.7
Aspártico	8.1	6.8	8.7	8.7	7.3	9.7
Treonina	7.2	5.6	6.3	7.0	8.0	6.6
Serina	5.4	5.3	5.1	4.2	7.2	7.8
Glutámico	10.3	8.3	11.4	11.2	12.7	8.9
Prolina	8.2	14.7	7.4	10.3	6.9	13.8
Glicina	2.7	2.8	3.4	2.2	2.5	3.3
Alanina	3.6	4.1	4.8	4.6	3.3	3.9
Cisteína	8.2	5.8	5.1	12.0	9.4	7.4
Metionina	2.2	2.1	6.4	1.3	3.0	0.4
Isoleucina	4.9	5.2	3.6	4.1	0.9	2.9
Leucina	5.0	6.4	4.8	5.1	4.0	8.4
Tirosina	6.0	3.3	1.7	4.3	5.9	3.0
Fenilalanina	5.3	4.3	5.4	4.0	5.8	2.2

Comparación de las subunidades α y β de la LH A, FSH y HCG [67].

* g/100 g de proteína.

TABLA VI

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES α DE LA HCG, h-TSH y b-TSH			
AMINOACIDO	α-HCG	α-TSH	α-TSH bovina
Lisina	6.5	5.5	10.3
Histidina	3.0	3.0	2.9
Arginina	2.9	3.1	3.2
Aspártico	6.6	5.6	6.2
Treonina	8.2	7.7	8.5
Serina	8.8	7.1	5.5
Glutámico	10.4	8.8	8.1
Prolina	7.5	6.7	7.0
Glicina	4.6	4.5	4.1
Alanina	4.8	4.2	7.1
Cisteína 1/2	9.7	10.2	9.9
Valina	7.5	7.1	5.1
Metionina	2.4	3.1	3.9
Isoleucina	0.9	1.8	2.0
Tirosina	3.7	4.8	5.3
Fenilalanina	4.0	4.9	4.7
Total	95	93	96
Referencia	77/	84/	85/

* Valores de las subunidades humanas calculados en base a 3 residuos de tirosina.

TABLA VII

ACTIVIDAD GONADOTROFICA DE ALGUNAS RECOMBINACIONES DE LAS SUBUNIDADES* α Y β DE LA HCG, TSH (bovina) Y LH (bovina).

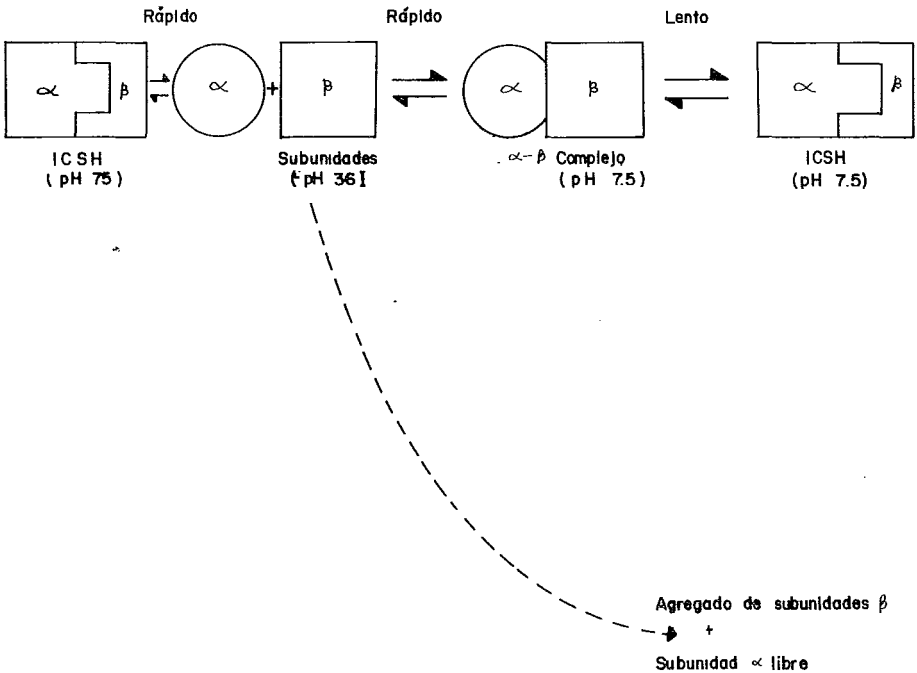
MUESTRA	POTENCIA EN TERMINOS DE:	
	LH[1]	HCG[2]
TSH - α	0.06	63
LH - α	0.06	60
HCG - α	0.10	120 (42-340)
LH - β	0.06	60
HCG - β	0.53 (0.28 - 1.0)	310 (160-590)
TSH - α + HCG - β	3.3 (2.6 - 4.3)	3600 (2800-4700)
LH - α + HCG - β	5.4 (3.6 - 8.0)	4900 (3300-7200)
HCG - α + HCG - β	5.5 (3.6 - 8.4)	5800 (3600-9500)
HCG - α + LH - β	4.9 (3.8 - 6.3)	5300 (4100-6800)
TSH - α + LH - β	0.94 (0.59-1.50)	870 (540-1400)
LH - α + LH - β	2.6	
HCG (no disociada)		5300 (3700-7600)

[1]Estándar LH-S1 (1 unidad/mg)

[2]Estándar internacional de HCG (unidad internacional/mg)

*Tomado de Bahl et al. [86]

FIG. 6 Esquema propuesto para cinética de disociación de la ICSH ovina y reasociación de sus subunidades.



HETEROGENEIDAD

Se ha establecido, que muchas hormonas polipéptidicas muestran más de una forma cuando se localizan tanto en la glándula endocrina como en el suero. Berson y Yalow[94] al estar probando algunos anticuerpos para la hormona paratiroidea (PTH), observaron una disparidad entre la actividad inmunológica de la PTH en el plasma, respecto, respecto a la PTH obtenida a partir de los extractos de la glándula paratiroidea. A partir de esta observación, empezaron una serie de investigaciones, las cuales los indujeron a establecer la heterogeneidad de esa hormona.

Los términos de "heterogeneidad" y "microheterogeneidad" de las hormonas proteícas han sido aplicados a las llamadas isohormonas de las gonadotrofinas las cuales difieren en sus tamaños moleculares, en su inmunoreactividad y en el tiempo de circulación en el organismo.

Steiner et al.[95] y Rubenstein et al.[96] establecieron independientemente que la proinsulina es un polipéptido de una sola cadena, precursor de la insulina. Roth y colaboradores[97] demostraron la presencia de más de una forma de insulina en el suero ("insulina grande" e "insulina pequeña"). Algo similar sucede con ACTH, hCG y glucagon.

La presencia de sustancias de peso molecular menor que la hormona natural pero relacionadas biológica e inmunológicamente, sugiere la presencia de subunidades de la hormona y/o de metabólitos de está. Si la molécula es más grande que la hormona natural, se piensa en la posibilidad de una prohormona.

Sin embargo, algunas formas de heterogeneidad no sólo se deben a la presencia de prohormonas o productos de degradación sino que, evidencias recientes, indican que un cambio en el medio ambiente hormonal, puede inducir al órgano endocrino a producir diferentes formas hormonales. Esto ha sido demostrado por Bogdanove[98], quien observó que el órgano blanco, no solo dicta la cantidad de la hormona trófica que debe producirse, sino también la clase de hormona.

Rathnam y Saxena[67] al estudiar hipófisis humanas y al someter a las fracciones con actividad de LH a un segundo electroenfoque, obtuvieron la separación de tres especies de LH denominadas A, B y C.

Las tres especies de LH mostraron una banda proteica única de diferente movilidad electroforética; presentaron constantes de disociación (Kd) de 0.078 para LH A; 0.88 para LH B y 0.118 para LH C. Sedimentaron como una sola fracción en la ultracentrífuga analítica con S_{20w} de 2.35 (A), 2.24 (B) y 2.7 (C) y sus radios de Stock fueron 24.8; 28.4 y 24.6 Å, respectivamente, y son comparables con los reportados por Reichert y Midgley[99], y Ryan[100].

El rango de valores reportados para el radio de Stock de la LH va de 21 a 38 Å, atribuyendose los valores bajos a disociaciones espontaneas de la molécula. Estas pequeñas diferencias en los valores de los radios de Stock de las tres especies de LH, ha sugerido que no existan diferencias notables en sus tamaños moleculares.

A partir de las velocidades de sedimentación y de los valores

del radio de Stock se calculó que los pesos moleculares de las LH A, B y C eran aproximadamente de 24 000, 26 000 y 27 000, respectivamente, diferencias que pueden deberse a modificaciones en el contenido de carbohidratos y de ácido siálico. El promedio de la actividad específica de las tres especies de LH obtenido fué de 6.9 el cual esta de acuerdo con los reportados por otros investigadores[101,102] pero resulta mayor que los publicados por Reichert y Midgley[99]. Sin embargo, estos autores no separaron las tres especies de LH.

Las LH A, B y C mostraron poca actividad de FSH y actividad de TSH, esto último puede deberse a la similitud estructural entre la LH humana y los análogos de la TSH.

Los análisis de aminoácidos de LH A, B y C fueron semejantes, observandose pequeñas diferencias en el contenido de ácido glutámico y arginina. Las tres especies contenían grandes cantidades de prolina y ácido glutámico, lo cual es característico de la LH. Los análisis de azúcares y ácido siálico indicaron que la LH A, B y C poseen: 13.3 , 13.2 y 6.9% de azúcares neutros y 0.5, 1.3 y 1.8% de ácido siálico, respectivamente (Tabla VIII).

Por cromatografía de intercambio iónico, se separaron las dos subunidades de la LH A, denominadas α y β, obteniendose fracciones semejantes con la LH B y C. Se observó que la actividad específica de la subunidad α fué de 0.8 unidades por mg y de la subunidad β antes y después de la filtración en gel de 2.0 y 1.1 unidades por mg. La elevada actividad biológica de estas subunidades comparada con las subunidades

de LH ovina y bovina puede deberse a la mayor potencia de LH A. Es posible que las subunidades de LH humana posean mayor actividad intrínseca que la LH ovina y bovina.

Nureddin et al.[102] han demostrado que el rendimiento y la actividad de las subunidades de LH humana, después de la disociación con úrea, era mayor que después de una disociación ácida.

Rabinowitz y colaboradores[103] efectuaron comparaciones entre la LH humana purificada proveniente de la pituitaria y la segunda preparación de referencia internacional de la gonadotrofina menopaúsica humana (2a.IRP-hMG) utilizando el radio inmuno análisis (RIA) y el radio receptor (RR). De acuerdo con el RIA, la potencia de 1 ng de LH fue equivalente a 8 mUI de 2a.IRP-hCG y con el RR 1 ng de LH fue equipotente a 2 mUI de 2a.IRP-hCG. Los datos obtenidos sugirieron que la LH posee un exceso de actividad inmunológica, con respecto a la actividad del receptor o bien, expresado de otra manera la 2a.IRP-hCG es inmunológicamente deficiente.

Para probar la heterogeneidad de la LH, esta fué marcada con I^{125}. Al filtrarla a través de una columna de Sephadex G-100, se observaron tres picos de radioactividad (pico I,II y III), los cuales presentaron actividades diferentes al ser analizados. Con los datos obtenidos en esos estudios para el coeficiente de partición; la determinación de las constantes de sedimentación (Kau); los radios de Stock y el peso molecular de los tres picos radioáctivos, es posible concluir que:

El pico I representa posiblemente una forma dimérica de LH

(Kau, 0.10; P.M. 65 900).

El pico II la forma monomérica de LH (Kau, 0.24; P.M. 33 400).

Y el pico III las subunidades libres de LH (Kau, 0.4; P.M. 8 000). Los tres picos mostraron una fuerte actividad inmunológica. Estos mismos autores han observado la presencia de subunidades libres de LH en preparaciones de hipófisis y en el suero, después de inyectar LH-RH y TRH.

Loeber[104] observó que en hipófisis humanas la fracción FSH está a menudo contaminada con una forma de LH, la cual es aparentemente de naturaleza más ácida que la LH "normal". Ambos tipos de LH fueron comparados en: propiedades inmunológicas; actividades biológicas "in vivo"; unión a las membranas celulares; vida media metabólica; contenido de ácido siálico y valores de puntos isoeléctricos. Este estudio se llevó a cabo con 2 fracciones: la fracción C_I con actividad de FSH y que contiene a la LH contaminante (tipo I de LH). La fracción C_{II} con movilidad retardada en cromatografía de intercambio iónico, posee la LH "normal" (tipo II de LH).

Los resultados mostraron que el tipo I de LH parece ser más activo en bioensayos "in vivo", pero tiene menor actividad en inmunoensayos que el tipo II de la LH. Sin embargo, la capacidad de la fracción I para unirse a los receptores de la membrana es mucho menor comparada con la del tipo II. El tipo I de LH tiene una vida media menor en la circulación que el tipo II. Al estudiar el contenido de ácido siálico, se muestra que el tipo I de LH tiene un 3.1% y el tipo II 2.4%, mientras que los valores de los puntos isoeléctricos (pI) son de 5.7 y 8.8, respectivamente.

Los estudios de Qazi y colaboradores[105] indican que la LH biológica e inmunológicamente activa proveniente del plasma humano se muestra heterógenea al someterla a la filtración en gel. A partir de esto, Robertson, Van Damme y Diczfalusy[106] estudiaron estas fracciones utilizando el isoelectroenfoque (IEF) para examinar los patrones biológicos e inmunológicos de las mismas. Encontrando que en mezclas de plasmas de mujeres postmenopaúsicas las fracciones biológicamente activas mostraron puntos isoeléctricos diferentes, en donde la mayor parte de la actividad se encontraba en las fracciones con pI mayores a 7.0, mientras que al estudiar la distribución de la actividad inmunológica se observaron diferencias en la relación "actividad biológica/actividad inmunológica", de las distintas fracciones. Algunas fracciones con actividad inmunológica estuvieron carentes de actividad biológica.

En las mezclas de plasmas de mujeres en la mitad del ciclo menstrual, se obtuvieron valores diferentes depI para la actividad biológica, observandose una extensa microheterogeneidad en el rango de pH de 3 a 6. Los resultados de las fracciones obtenidas del plasma sanguíneo y de los extractos de pituitarias humanas, mostraron grandes diferencias en la relación de las actividades biológicas e inmunológicas.

Leinderberger et al.[107] em 1976 estudiaron algunas fracciones del suero de sujetos normales usando tres sistemas analíticos diferentes: el radio inmuno análisis (RIA); el análisis del radio receptor (RR) y la producción de testosterona (TPA). Encontrando dos fracciones com actividad de LH que difieren enormemente en sus tamaños moleculares. Al componente con peso molecular de 30 000 se le denominó "LH

pequeña" y "LH grande" a la fracción con peso molecular entre 140 000 y 180 000. No se puede excluir la posibilidad de que el almacenamiento de los sueros pueda causar la conversión de una forma de LH en la otra como ha sido demostrado para la hormona de crecimiento. La fracción "LH grande" mostró ser más estable bajo ciertas condiciones, por ejemplo el tratamiento del suero con urea 6M o con 0.1% de mercaptoetanol, no produjo modificaciones.

La determinación de los puntos isoeléctricos de la fracción "grande" y "pequeña" de LH dieron como resultado un rango isoeléctrico de pH 7 a 8. Este hallazgo concuerda con el rango isoeléctrico encontrado para la LH hipofisiaria[66,108]. Las características fisicoquímicas de la "LH grande" son casi idénticas a las características de otra hormona hipofisiaria, la hormona estimulante de la tiroides ("TSH grande").

Otro aspecto de los ya complejos aspectos de la heterogeneidad de la LH hipofisiaria y de la LH del suero, es el hallazgo de que el desiálizado tanto de sueros individuales como de mezclas de ellos, mostraron actividad de LH. En algunas ocasiones, la actividad de LH ha sido encontrada en el área de pesos moleculares pequeños (aproximadamente 1 000 daltons). Esta sustancia de bajo peso molecular que ha sido denominada "mini LH" [109] es lábil al calor debido a que con el calentamiento pierde completamente sus propiedades inmunológicas y esteroidogénicas y en menor grado, la propiedad de unión a sus receptores.

El hecho de que no se encuentre actividad de LH en los diálizados de sueros libres de LH, es compatible con el punto de vista de

que la "mini LH" pueda ser un producto de degradación de la LH hipofisiaria o de la LH sérica.

Esta consideración se ve apoyada por el hecho de que la "mini LH" tiene sitios antigénicos comunes con la LH hipofisiaria.

TABLA VIII

COMPOSICION DE AMINOACIDOS Y CARBOHIDRATOS DE LAS TRES ESPECIES DE LH			
AMINOACIDO	*LH A	*LH B	LH C
Lisina	4.4	5.4	5.5
Histidina	2.8	2.6	3.1
Arginina	7.0	5.6	6.1
Aspártico	6.5	7.3	7.2
Treonina	6.9	5.8	6.6
Serina	5.2	4.7	5.0
Glutámico	9.3	11.3	9.8
Prolina	11.7	12.1	10.8
Glicina	3.0	4.1	2.8
Alanina	3.5	3.6	3.2
Valina	5.7	6.1	5.1
Cisteína 1/2	5.3	5.3	7.3
Metionina	4.1	4.2	4.8
Isoleucina	5.2	4.1	3.9
Leucina	5.6	5.3	4.6
Tirosina	5.2	5.3	4.6
Fenilalanina	4.0	4.1	4.3
Azúcares neutros %	13.3	13.2	6.9
Acido siálico %	0.5	1.3	1.8

* g/100g. proteína

Tomado de Rathnam y Saxena, 1971 [67]

ACCION DE LAS HORMONAS

Dentro de los mecanismos de control celular, el control a través de las hormonas es uno de los sistemas más sofisticados empleados por los seres vivos.

Se han propuesto dos patrones diferentes de acción hormonal:

1) aquel que parece regir la acción de las hormonas esteroidales y el cual involucra el transporte desde el citoplasma al núcleo, de un complejo formado entre una proteína acarreadora ("receptor") y el esteroíde; complejo que al interaccionar con la cromatina lleva a una modificación selectiva en los genes, que se ve traducida en la síntesis de una proteína específica, y

2) el mecanismo aplicable a las hormonas proteícas que funciona a través del complejo adenilato ciclasa-AMPc-cinasas proteícas.

La transferencia de la información en los dos tipos de acción hormonal involucra la comunicación intercelular y la comunicación intracelular.

En la comunicación intercelular, la hormona sirve como vehículo de comunicación entre la "célula que la envia" y la "célula que la recibe", la cual reconoce y selecciona a la hormona del medio ambiente a través de una proteína membranal llamada "receptor" (Fig.7).

En la comunicación intracelular, el mensaje generado por la ocupación del receptor, es enviado a diferentes elementos intracelulares

cada uno de los cuales, recibe y tradúce la información sucesivamente y "abren" o "cierran" las distintas unidades del metabolismo celular, produciendo un patrón de efectos que corresponde a una respuesta adecuada al mensaje hormonal recibido (fig. 8).

Golderberg[110] sugiere la existencia de una tercera forma de acción hormonal, donde el GMPc (posiblemente asociado con el Ca^{++}) participa como promotor de eventos celulares, que en muchos casos son antagonistas a aquellos mediados por el sistema AMPc-cinasa proteíca.

Aún aceptando, la existencia de los dos o tres tipos de acción mencionados, el hecho es que ciertas hormonas no se adaptan estrictamente a ninguno de los programas de acción establecidos, lo cual sugiere la existencia de un mayor número de formas de acción hormonal, algunos de los cuales estan por descubrirse.

El lenguaje hormonal requerido para la comunicación intercelular debe tener un alfabeto de elementos topoquímicos y el ordenamiento en distintos patrónes de esos elementos, deben constituir las palabras de ese lenguaje, palabras que por un grupo de reglas, formaran las oraciones.

Schwyzer[111] sugirió que el intercambio de la información entre las hormonas y sus receptores son efectuados en ese "lenguaje", cuyo alfabeto podría corresponder a los residuos de los aminoácidos y el ordenamiento de dichos residuos constituirian las palabras de la oración.

De esta forma la información codificada entre un "emisor" y

un "receptor" se lleva a cabo a través de la asociación de "símbolos" con cierto "significado". El número de mensajes que pueden ser enviados o recibidos por cada uno de estos sistemas de comunicación, depen dera del número de simbolos que se pueden manejar.

En las hormonas peptídicas existen aproximadamente veinte e lementos químicos disponibles para servir como alfabeto del lenguaje, que serían las cadenas laterales de los aminoácidos mientras que, los grupos amino y carboxilo terminales forman un esqueleto peptídico fle xible. Por el contrario, en la estructura de las hormonas esteroides existe un número limitado de elementos químicos, cerca de cinco que pue den servir como alfabeto.

Por lo tanto, el tipo de lenguaje utilizado por los sistemas que involucran a las hormonas proteícas, serían más complejo que el de las hormonas esteroides.

El concepto de Schwyzer, se originó de las relaciones entre la estructura y la función obtenidas en las hormonas peptídicas en tra bajos previos; dicha relación establece que:

1) algunas hormonas peptídicas que actúan en forma diferencial sobre los receptores de sus células blanco estan estructuralmente rela cionadas, ya que contienen secuencias comunes y pueden ser consideradas como miembros de una "familia", por ejemplo: la oxicitocina y la vaso-presina y por otro lado la adrenotropina, la melanotropina y la lipo-tropina. En está última, la secuencia del heptapéptido común en ellas -Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- (también llamado "core") posee los sitios

activos involucrados en la activación del receptor. Sin embargo, en la familia oxicitocina-vasopresina toda o casi toda la molécula es necesaria para la actividad biológica.

Siguiendo la proposición de Schwyzer la molécula de ACTH (39 aminoácidos) puede ser considerada como una oración de siete palabras [112], donde la secuencia de aminoácidos denominada palabra 1 activa a los receptores del melanocito, mientras que las otras palabras (2 al 7) mejoran o modifican la actividad hormonal (Fig. 9).

El mismo Schwyzer clasificó a las palabras en dos tipos: continuas y discontinuas. Las palabras continuas son aquellas que muestran una secuencia de aminoácidos ininterrumpida.

Debido a que las hormonas polipéptidicas son estructuras flexibles, las palabras podrían estar formadas, al orientarse los pliegues de la molécula, ya sea en la superficie del receptor o en el medio ambiente externo para formar una fila de residuos contiguos sin enlace covalente, a este tipo de palabras se denominan discontinuas. La Figura 10 muestra como dos pentadecapéptidos flexibles de secuencia diferente, interaccionan en la superficie del receptor para formar la palabra "ACCION".

Se ha especulado sobre la participación del Ca^{++} y los nucleótidos cíclicos en los sistemas regulados por las hormonas, mientras no sea posible demostrar en forma definitiva su participación; los nucleótidos cíclicos actuan principalmente sobre el control de las activida

des metabolicas y biosintéticas en las células blanco y el Ca^{++} es esencial para modular la acción de estímulo-respuesta, y en el control de los procesos de contracción y secreción[114].

Después de la síntesis del AMPc, como respuesta a la ocupación del receptor por las hormonas péptidicas, la única forma reconocida para activar las respuestas de la célula blanco, es a través de la estimulación de las protein-cinasas, una enzima que parece estar presente , universalmente, en las células de los mamíferos. Se ha propuesto que está enzima aparentemente ubicua, puede mediar los efectos del AMPc en todas las células animales a través de la fosforilación de sustratos específicos que regulan las funciones de las células blanco[115].

Muchas de las acciones a tiempos cortos (rápidos) del AMPc en las células eucarióticas, parecen expresarse por fosforilación extranuclear de algunas proteínas reguladoras. En la mayoría de los tejidos sensibles a las hormonas, las protein-cinasas llevan a cabo las fosforilaciones en varios sitios dentro de la célula: membrana plasmática, ribosomas y componentes nucleares.

Se sabe que los diferentes efectos de las hormonas peptídicas sobre sus células blanco son mediados por una serie de eventos bioquímicos que enlazan la membrana plasmática con una variedad de respuestas celulares como son: la síntesis de proteínas reguladoras específicas; la estimulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos; la alteración de la permeabilidad celular y el transporte de iones, y la secreción o la liberación de productos de la célula blanco, tales como, las hormonas esteroides.

Una característica común de las moléculas hormonales es su habilidad para combinarse con sitios receptores específicos, localizados en la membrana plasmática de sus células blanco. La ocupación de dichos receptores desencadena, como hemos dicho antes, una serie de respuestas celulares individuales, que van desde una alteración en la permeabilidad a procesos de secreción hasta crecimiento celular. La mayoría de estas respuestas parecen estar mediadas por la acción del AMP cíclico, sintetizado por la adenilato ciclasa en la superficie interna de la membrana celular[113]. La actividad de la adenilato ciclasa es iniciada por una señal local, generada dentro de la membrana, por la interacción específica de la hormona con el sitio receptor.

Las hormonas peptídicas actuarían como enzimas reguladoras ya que se combinarían con una subunidad funcional -el receptor- de un complejo enzimatico membranal (adenilato ciclasa). En ciertos tejidos blanco de las hormonas peptídicas -hígado, tejido adiposo, corteza adrenal y gónadas- el AMPc parece funcionar como el segundo mensajero para producir respuestas bioquímicas específicas de cada hormona

En contraste, las acciones tróficas o acciones prolongadas de las hormonas peptídicas requieren entre otras cosas, mantener la diferenciación celular y el control del número y tamaño celulares, puesto que parecen operar a través de cambios en la actividad nuclear y la síntesis de proteínas celulares.

Se ha sugerido que los nucleótidos cíclicos no sólo funcionan como segundo mensajero para mediar la respuesta rápida al primer mensa

jero para mediar la respuesta rápida al primer mensajero hormonal, sino que también actuan en la regulación de la actividad de la RNA polimerasa. Por ejemplo, se ha comprobado en las células hepáticas, que el AMPc estimula la síntesis de RNA nuclear y la fosforilación de proteínas no histonas de la cromátina, dependientes del AMPc, el cual podría participar como modulador de la transcripción de RNA mensajero[116]. Aún más, se ha observado que la subunidad catalítica de la protein-cinasa migra a las diferentes estructuras subcelulares, incluyendo a el núcleo. Esto podría indicar que el sistema adenilato ciclasa-AMPc-protein cinasa tuviera lacapacidad de regular la síntesis proteíca, tanto a nivel transcripcional como a nivel de la traducción[117,118].

Receptores a las hormonas peptídicas

Los mecanismos por los cuales las hormonas peptídicas actuan sobre sus tejido blanco para producir las respuestas funcionales características son iniciados por la interacción con una región muy específica de la membrana plasmática, a la que se le ha denominado "receptor hormonal".

Los receptores a las gonadotrofinas han sido identificados tanto en los testículos como en los ovarios, empleando hormonas marcadas con yodo radiáctivo.

En los testículos, los receptores a LH/HCG están limitados a las células intersticiales, y los receptores a la FSH se localizan en los túbulos seminíferos, probablemente las células de Sertoli[119,120].

En el ovario, los receptores a LH están presentes en el tejido intersticial y en las células de la teca de los folículos en desarrollo; y en las células de la granulosa y en el cuerpo luteo de los folículos viejos. Los receptores a FSH parecen limitarse a las células de la granulosa, con cierta analogía funcional entre estas células y las de Sertoli de los testículos[121,122].

Observaciones recientes del mecanismo de acción de la toxina del colera han permitido disponer de un sistema análogo a las acciones de las hormonas peptídicas, ya que la toxina se une con gran afinidad a un componente glicolípido de la membrana celular, el monosiálilganglíosido (G_{M1}), presente en la membrana plasmática de las células de la mayoría de los mamíferos, y une tanto al toxoide colerágeno como a la toxina activa[123].

Holmgren et al.[124] han observado, en la mucosa intestinal, una relación entre la concentración de G_{M1}, el número se sitios de union para la toxina y la acción biológica de la toxina. Con todo lo anterior, el ganglióside G_{M1} se ha considerado el receptor de la toxina del cólera y se ha pensado en su posible participación como receptor a las hormonas proteícas, debido a que está toxina estimula la actividad de la adenilato ciclasa en la mayoría de los tejidos que poseen está enzima.

La interacción de las hormonas peptídicas y las moléculas t transmisoras con sus receptores específicos de la superficie celular es un ejemplo especial de un fenómeno más general, de que todas las células deben reaccionar con el ambiente externo a través de sus membranas plasmáticas, por lo tanto parece probable que las proteínas de la mem-

brana plasmática expuestas son la principal característica para distinguir los diferentes tipos de células.

Los intentos para definir la naturaleza de los receptores de las hormonas peptídicas se han basado en el uso de detergentes, para extraer los sitios receptores a partir de los téjidos blanco en forma soluble. Los detergentes no ionicos como el Triton X-100 o Lubrol PX han mostrado ser más efectivos para la solubilización de receptores con la capacidad de unir al ligando.

En algunos casos, la actividad de la adenilato ciclasa puede ser extraida con los detergentes no ionicos, en particular los de la serie Lubrol. Sin embargo, los intentos para demostrar el acoplamiento funcional o físico entre los receptores solubilizados y la adenilato ciclasa no han tenido más exito que solo aquellos informes en donde ciertos fosfolípidos pueden restaurar la respuesta hormonal en la adenilato ciclasa solubilizada del miocardio[124].

Los receptores a LH/hCG han sido purificados por cromatografía de afinidad, aproximadamente el 50% de la pureza teórica del sitio de union[125]. Los receptores solubilizados por los detergentes se comportan generalmente como moléculas proteícas relativamente asimétricas, durante los análisis físicos y poseen un peso molecular entre 200 000 y 300 000. Cada sitio receptor parece unir a una sola molécula del péptido regulador, y las formas purificadas pueden algunas veces conservarse en solución con ausencia de los detergentes. La posibilidad de trabajar con tales receptores, podría permitir el análisis de los factores estructurales y conformacionales que determinan la union de la hormona

y los mecanismos de acoplamiento con las respuestas asociadas a la membrana.

Se piensa que los fosfolípidos puedan estar involucrados ya sea en la interacción específica de la hormona a sus receptores o en alguna étapa del proceso de union, y en la activación de la adenilato ciclasa.

Salmen Azhar y K.M.Jayaram[126] observáron los efectos de las fosfolipasas A, C y D sobre la actividad del receptor gonadotrofico en las membranas plasmáticas del cuerpo luteo bóvino. Observandose que la fosfolipasa C inhibió en 85-90% la union de la HCG bovina con su receptor, al ser hidrolizado el 70% de los fosfolípidos; mientras que la fosfolípasa A inhibió 75% de la actividad del receptor, cuando un 45-50% de los fosfolípidos fueron hidrolizados. Estos resulatados sugieren que no sólo los grupos hidrofílicos sino que también, los hidrofóbicos puedan estar involucrados en la union de las gonadotrofinas a su receptor o en la estabilización de la actividad del receptor.

Un criterio para definir a un receptor incluye la idea de la interacción entre la hormona y el receptor como un proceso saturable. Esto es, que existe un número limitado de sitios de union por unidad celular o tísular. ¿Cuáles son los limites y que significado tienen?.

La idea general es que este limite es bajo. Desde el punto de vista fisiológico, esto significa el número de receptores que podría ser saturado con las concentraciones fisiológicas más altas de la hormona. Pueden existir ciertos efectos farmacológicos que necesiten un

número mayor de sitios ya sintetizados, o podrían existir receptores extra (adicionales), para ciertas condiciones fisiológicas que necesiten efectos prolongados, como sería la secreción de progesterona por el cuerpo luteo, la presencia de esos receptores de sobra o extra con una constante de disociación baja, podría dar ciertas ventajas.

Se debe mencionar que el número de receptores o sitios de union calculados, por ejemplo a partir de una gráfica de Scatchard es sólo una determinación funcional, ya que no permite conocer el número de moléculas receptoras presentes a menos que se conozca el número de moléculas de hormona unidas a cada molécula de receptor, y que todas las moléculas del receptor sean funcionalmente activas; se sabe que algunas moléculas de receptores que aún estando desocupados pueden no ser activas, sea que esten enmascaradas o esten inhibidas.

Catt y Dufau en 1973[127] demostraron en las células de Leydig de la rata, la existencia de relaciones entre las dósis de HCG empleadas; el grado de union de la hormona, así como la acumulación de AMPc y la secreción de testosterona. Sus datos sugirieron la existencia de un número mayor de sitios receptores al requerido para la activación de la adenilato ciclasa, y un número de sitios receptores y adenilato ciclasa mayor que la cantidad necesaria para observar un efecto biológico como sería la secreción de testosterona, esto los llevó a sugerir la hipótesis de los receptores en exceso o de sobra[128].

La forma en la que los receptores están localizados en la membrana plasmática se desconoce, pero se han propuesto algunos modelos basandose en el modelo más aceptado de la membrana plasmática. Se creé

que los componentes -lípidos y proteínas- de la membrana, están dispuestos como un mosaico, en el cual, algunas proteínas estan unidas superficialmente a la bicapa de fosfolípidos, o bien están inmersas (embebidas) en forma total o parcial en la porción hidrofóbica de la bicapa. Al parecer los sitios receptores están dispuestas en forma parcial en la bicapa.

Robison y colaboradores[129/] propusieron en 1967 un modelo compuesto por dos subunidades, en el cual el receptor se considera como una subunidad reguladora, dispuesta en la superficie extracelular de la membrana, y que además está fisicamente relacionada a la subunidad catalítica, colocada en la superficie intracelular. La hormona al unirse induce un cambio conformacional en la subunidad reguladora, cambio que modifica y activa a la subunidad catalítica para que convierta al ATP em AMP cíclico.

Birnbaumer et al. en 1970[130/] modifican esté modelo, interponiendo uma subunidad "transductora" entre la subunidad reguladora (discrimimadora) y la subunidad catalítica (amplificadora). En está modificación, la subunidad transductora podría ser el sitio de acción del nucleótido, el cual afectaria la unión de la hormona a la subunidad reguladora y la Km para la activación de la subunidad catañítica.

Estos modelos pueden considerarse catalíticos ya que las subunidades están fisicamente cercanas y estacionarias, de acuerdo con estos modelos los receptores"sobrantes" no estarían fisicamente asociados a las unidades ciclasa y por lo tanto las dos clases de receptores tendríam diferentes afinidades, así como encontrarse en diferentes cantida

des.

Perkins en 1973[131] y Cuatrecasas en 1974[132] proponen y elaboran, respectivamente, un modelo que no se basa en las relaciones estáticas, sino en la fluidez de la matriz lipídica de la membrana. En este modelo, el receptor y las subunidades catalíticas estan separadas fisicamente. Así, la hormona unida al receptor induce: 1) un movimiento de traslación del receptor hasta formar un complejo con la subunidad catalítica, o bien 2) un efecto a su alrededor, en el cual la estructura de la matriz lipídica es alterada y conduce a la activiación de la subunidad catalítica.

Otra posibilidad interesante respecto a este último, es que después de la unión de la hormona al receptor podrían obtenerse efectos diferenciales con varias subunidades catalíticas de la adenilato ciclasa. Esto podría activar a la adenilato ciclasa o viceversa, con lo cual se lograría un mecanismo adicional para la especificidad de la respuesta hormonal. Teniendo como consecuencia, que cada ciclasa tuviese su propio receptor, o la existencia de una sola subunidad catalítica ciclasa cuyo sustrato específico sea determinado por la naturaleza de la hormona.

Activación hormonal de la adenilato ciclasa

Algunos modelos han intentado explicar la complejidad funcional del sistema de la adenilato ciclasa; como el estar constituida de por lo menos de tres sitios: el sitio del receptor hormonal; el sitio catalítico, que reacciona con el ATP quelado con el magnesio ($MgATP^{++}$)

y un sitio regulador para los nucleótidos, que reacciona preferentemente con ellos[133].

A partir de los estudios cinéticos, sobre el efecto de los nucleótidos de guanidina sobre la activación de la adenilato ciclasa hepática producida por el glucágon, se ha sugerido que el complejo de la adenilato ciclasa pueda existir en formas o conformaciones diversas que puedan interconvertirse, por las acciones de la hormona y del nucleótido. Esté modelo contempla la posibilidad de que las distintas conformaciones tengan afinidades diferentes para el sustrato, obteniendose diferentes grados de activación, según la combinación de la hormona y el nucleótido presente.

Se ha observado que algunos análogos sintéticos del GTP, que resisten la hidrólisis enzimática, activaron algunos sistemas de la adenilato ciclasa lo que sugiere que los nucleótidos de la guanidina no funcionan como donadores de grupos fosfato, sino como activadores alostéricos de la adenilato ciclasa[134].

Esto sugiere que la regulación de la interacción del nucleótido con la unidad catalítica de la adenilato ciclasa puede ser una característica general de la acción de las hormonas peptídicas. Observaciones recientes sobre la activación de la adenilato ciclasa por los nucleótidos de la guanidina han mostrado que la regulación de la actividad enzimatica por tales nucleótidos es independiente de la estructura de la membrana, con lo cual se eleva la posibilidad de que la hidrólisis de los nucleótidos pueda relacionarse al control de la actividad de la adenilato ciclasa por dichos nucleótidos[135].

AMP cíclico

La participación del AMPc como mediador intracelular de la acción de las hormonas peptídicas ha sido apoyada por numerosas observaciones de la respuesta de los tejidos blanco a la hormona, tal es el caso de la epinefrina, la cual estímula la glicogenolísis hepática a través de un mecanismo dependiente del AMPc.

Haynes et al.[136] observaron que la ACTH incrementó el contenido del AMPc en la corteza adrenal y el AMPc exógeno estimuló la producción de corticoides en la glándula adrenal de la rata. Estas observaciones han contribuido a establecer el concepto de que el AMPc funciona como un segundo mensajero general en la acción de las hormonas peptídicas.

La participación del AMPc en la acción de las gonadotrofinas sobre la esteroidogénesis, ha sido observada tanto en el ovario como en el testículo. En el cuerpo luteo, Marsh y colaboradores[137] mostraron que el AMPc estimuló la síntesis de progesterona; que la LH estimuló no solo la acumulación del AMPc sino también la actividad de la adenilato ciclasa, además el patrón de biosíntesis de esteroides fué idéntico tanto en la estimulación con la LH como al adicionar AMPc exógeno. En estos estudios, la elevación del AMPc endógeno durante la estimulación con la LH precedió a un incremento en la síntesis de progesterona en dósis bajas de LH, se observó en algunas ocasiones, un estímulode la esteroidogénesis sin cambio apreciable en los níveles del AMPc[138].

La evidencia de la participación del AMPc en la acción de la

FSH sobre el ovario, ha sido obtenida en las células de la granulosa de los ovarios de porcino y de la rata. Marsh ha observado que la mayor parte o todos los efectos de las gonadotrofinas sobre los ovarios parecen involucrar la formación del AMPc[139].

Hay abundante evidencia de que las hormonas peptídicas controlam muchas de las actividades de sus células blanco por estimulación de la producción del AMPc, sin embargo se han observado diferencias entre los niveles del AMPc y las respuestas metabólicas de los tejidos blanco. un ejemplo es la ACTH[140] que en concentraciones pequeñas estímula la esteroidogénesis sin cambios apreciables en la concentración del AMPc. No obstante, concentraciones grandes de la hormona provocan un incremento paralelo en la producción de esteroides y de AMPc.

A concentraciones aún mayores de ACTH, la producción del AMPc continua en aumento, pero no así la esteroidogénesis, la cual sólo llega a un nível máximo. La discrepancia entre la concentración del AMPc y la respuesta del tejido ha sido demostrada en el tejido adiposo, en el hígado y en la tiroides, al igual que en las células de Leydig de l los testículos.

Se ha indicado que el AMPc puede funcionar como un mediador de la acción de la LH, sólo sí actua a través de incrementos pequeños o por su traslación dentro de compartimentos intracelulares pequeños. No obstante, se ha observado que la activación de la protein-cinasa inducida por la hCG en las células de Leydig, se puede correlacionar con los cambios en la concentración del AMPc, y no con la respuesta esteroi

dogénica. Aún más, no ha sido posible observar un cambio en la vía de la actividad de la adenilato ciclasa-protein cinasa durante la estimulación de la producción de testosterona por concentraciones bajas de gonadotrofina.

Esto ha hecho pensar en la posibilidad de que sea un mecanismo diferente al del AMPc el que podría operar para mediar la acción de la hormona sobre la esteroidogénesis, particularmente durante la estimulación a concentraciones bajas de la hormona trófica.

En la figura 11 se representa la posible vía, independiente del AMPc apoyada en la disociación existente entre la esteroidogénesis y el AMPc a concentraciones bajas de la hormona (----). A concentraciones grandes de hormona, se efectua la vía clásica, AMPc-protein cinasas; Marsh propone que la fosforilación debida a la protein cinasa puede regular la actividad de la enzima que hidróliza la cadena lateral del colesterol[140a/].

El aspecto de la función del receptor, sea como "receptor reserva" o "receptor sobrante", proporciona un tópico para la especulación y la interpretación. Se sabe que muchas hormonas pueden estimular la producción de más AMPc, que el necesario para producir en la célula blanco la máxima respuesta biológica[127,140/]. La presencia de un exceso de receptores en la respuesta esteroidogenica de las células de Leydig a la hCG, ha mostrado que solamente el 1% de la población total de receptores necesita estar ocupado por la gonadotrofina, para producir la respuesta máxima.

Sin embargo, los receptores adicionales no están de sobra en relación a la actividad de la adenilato ciclasa, ya que su ocupación p por la hormona produce un incremento en la formación de AMPc. Es proba ble que el exceso de receptores tenga una participación importante, pa ra aumentar la sensibilidad de la célula blanco cuando circulan concen traciones bajas de la hormona, debido a que puede incrementar la proba bilidad de que un número suficiente de receptores esten ocupados para iniciar la respuesta de la célula blanco.

Función de las protein cinasas

En aquellos tejidos, en los cuales se ha aclarado el mecanis mo por el cual el AMPc actúa, como respuesta celular a la estimulación hormonal, se ha demostrado que esté nucleótido cíclico actúa estimulan do la actividad de una fosfocinasa de proteínas[141/].

Está enzima se localiza en el citosol, se compone de dos sub unidades cuando presenta su forma inactiva. La subunidad reguladora (R) se combina con la subunidad catalítica (C), para formar la holoenzima (RC) inactiva que puede ser estimulada por el AMPc. La unión del AMPc a la subunidad reguladora origina la disociación del complejo RC y por consiguiente la activación de la enzima.

Sí se adiciona AMPc exógeno, o se eleva hormonalmente el nivel endógeno de AMPc se produce la disociación de la enzima y se inicia la fosforilación de aquellas proteínas que son sustratos de está protein cinasa. La activación de está enzima parece ser el principal o quizas el único mecanismo, por el cual el AMPc funciona como segundo mensaje-

ro en la transmisión de las señales hormonales[142].

La presencia de la protein cinasa, dependiente del AMPc, ha sido demostrada en casi todos los tejidos animales. Sin embargo, se debe indicar que en la mayoría de los estudios realizados se han empleado histonas como sustrato para la enzima y en muy pocos casos se han demostrado los verdaderos sustratos de estas enzimas, tal es el caso de la fosforilasa de la glucogeno sintetasa y de la lipasa del tejido adiposo.

La probabilidad de que está enzima sirva para mediar todas las acciones del AMPc en los diferentes tejidos y en los diferentes organismos[115] sugiere la existencia de gran número de sustratos específicos localizados en los tejidos blanco, así como, formas múltiples de está enzima en las células animales.

La capacidad de la protein cinasa para fosforilar diferentes proteínas, como la caseína y las histonas, además de la fosforilasa cinasa, muestran su potencialidad para funcionar como una protein cinasa general y la posibilidad de que está actividad actúe regulando las diversas funciones fisiológicas.

Se ha sugerido que la fosforilación de las histonas, ricas en lisina, sea un paso preliminar en la inducción de las enzimas, ya que se ha mostrado que existe un aumento en la síntesis de proteínas como respuesta al AMPc[143]. Ruddon y Anderson[144] observaron una actividad de protein cinasa en los núcleos del hígado de rata, que puede ser estimulada por el AMPc.

Jungmann et al.[145] proponen que la acción de las gonadotrofinas en el cuerpo luteo, se acompaña de la traslación del citoplasma al núcleo, de la protein cinasa dependiente del AMPc, entre otros sitios intracelulares. Sin embargo, aunque la estimulación de los procesos biosintéticos por el AMPc, sugiere que tal efecto ocurre en la transcripción del RNA mensajero, los efectos del AMPc sobre la síntesis proteíca se han encontrado frecuentemente a nivel de traducción.

Esté mecanismo ha sido observado en la síntesis de las enzimas, que participan en la esteroidogénesis de la corteza adrenal[146] y en la síntesis de proteínas de la hipófisis de bovinos[147]. La acción del AMPc sobre los procesos de traducción, sugiere que la acción de la protein cinasa podría ocurrir a través de la fosforilación de las proteínas ribosomales[147].

No obstante, la capacidad de estas cinasas activadas por el AMPc para fosforilar a los ribosomas o a las proteínas ribosomales no parece ser un paso importante en la función ribosomal, indicando que la fosforilación en esté sitio no constituye una función esencial de está cinasa.

Las diversas funciones del AMPc asociadas a las funciones membranales, permeabilidad, transmisión sináptica, secreción e inhibición por contacto, sugieren que la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática tengan una participación importante en la función de las protein cinasas activadas por el AMPc; esta posibilidad encuentra apoyo al demostrarse: 1) actividad de protein cinasa dependiente del AMPc en las membranas celulares del cerebro de rata[148], y del hígado[149];

y de los eritrocitos humanos[150]; 2) en algunas fracciones de las membranas plasmáticas del músculo cardiaco del cerdo[151], se ha localizado la fosforilación de las proteínas mediada por el AMPc; 3) la acción de algunos neurotransmisores en la sinápsis, puede ser mediada por la fosforilación de una proteína específica localizada en la neurona postsináptica[152].

Todas estas observaciones sugieren que los efectos de los neurotransmisores y de las hormonas peptídicas, en procesos de permeabilidad y de secreción, pueden depender de la fosforilación de proteínas específicas localizadas en la membrana. Sin embargo, resulta díficil adscribir está función a la acción de todas las hormonas peptídicas.

Un segundo tema de discusión, es que al tratar de revisar los diferentes datos publicados, se pueden presentar dos posibilidades: a) que existan formas múltiples de la protein cinasa con diferente afinidad al AMPc y diferente especificidad para su sustrato, o bien b) un mismo tipo de enzima con propiedades semejantes respecto al AMPc y que pueda utilizar una amplia variedad de sustratos y por lo tanto la respuesta máxima de un téjido blanco dependería de la cantidad de protein cinasa disponible.

Langan[142] propone que todas las enzimas actuán sobre una amplia variedad de sustratos y que poseen afinidades comparables con el AMPc, con lo cual la localización de la protein cinasa en diferentes organelos o compartimentos intracelulares es consistente con la capacidad potencial de está enzima para mediar las numerosas acciones del AMPc en la función celular.

Sin embargo, la diversidad de las respuestas celulares a un mismo nucleótido (AMPc) debe estar determinada, por la naturaleza de los sustratos de la protein cinasa, presentes en un "sitio crítico" de la acción del nucleótido dentro de la célula blanco.

Todo esto nos lleva a pensar, que la respuesta al AMPc, de una célula dada, este determinada por los procesos que regulan la expresión genética y la diferenciación celular, y especificamente por la síntesis de los sustratos esenciales que conferirian individualidad a la respuesta de cada célula blanco a la acción hormonal.

Desarrollo de las células foliculares y de las células luteales

En el ovario de los mamíferos existen células germinales no proliferativas. Algunos oocitos crecen, mientras otros son mantenidos en un estado de reposo por años. Aunque se desconoce la señal o señales que informan a un oocito que inicie su crecimiento, parece que la iniciación ocurre al azar, independientemente de la estimulación de la hormona hipofisiaria, y aparentemente de la cantidad de oocitos contenidos en el ovario.

A pesar de que, con la edad ocurre una disminución en el número de oocitos totales, existen muchos mecanismos reguladores para asegurar que esten presentes folículos totalmente desarrollados, capaces de responder a la explosión ovulatoria de la LH.

Algunas especies, como la Viscacha (roedor Sudamericano) ovulan muchos huevos (300-700 huevos), la mayoría de los cuales no son fertili

zados. En el otro extremo, existen especies como los primates incluyendo a la mujer, que ovulan un huevo por ciclo, el cual al ser fertilizado se implanta normalmente. La regulación del número de huevos ovulados por ciclo fertil parece ser específico de la especie e involucra mecanismos regulados por las secreciones ováricas e hipofisiarias.

El desarrollo folicular se caracteriza por la formación de una capa de células de la granulosa, probablemente mediada por influencias locales del oocito[156/]. Esto se continúa por la presencia de una membrana secretada por las células de la granulosa, y la organización posterior de las células estrómaticas, localizadas a su alrededor, en una capa externa llamada teca[154/]. El desarrollo folícular subsecuente parece depender grandemente de las gonadotrofinas hipofisiarias.

En el ratón se ha observado que diariamente, un número determinado de folículos inicia su crecimiento y que esté continúa hasta que ocurre la ovulación o bien la atresia[154/]. Este proceso de crecimiento folicular puede ser dividido en dos fases: 1) la primera fase toma 14 días e involucra tanto el crecimiento del oocito como la lenta proliferación de las células de la granulosa (folículos con menos de 20 células a 100-200); 2) la segunda fase tarda sólo 5 días e involucra la presencia de un antro y un incremento en la velocidad de proliferación de las células de la granulosa, estó también se ha observado en la rata. Así, durante el ciclo estral, las liberaciones de la FSH, la LH y la PRL se superponem en un continúo produciendo folículos en todas las diferentes étapas del desarrollo.

Mientras la velocidad de crecimiento de los folículos pequeños

no parece variar durante los primeros 14 días del ciclo, el crecimiento continúo depende de las gonadotrofinas, esto sugiere que los folículos pequeños requieren sólo de concentraciones basales de gonadotrofinas y no son afectadas por la liberación explosiva; ya que una poza de folículos preantrales grandes, en desarrollo, está presente siempre y pocos folículos ovulan, existe la posibilidad de que los folículos destinados a ovular y luteinizar sean seleccionados de está poza, por el pico de la hormona gonadotrofica producida por el ciclo anterior. Así, la liberación explosiva puede actuar como promotor para que esos folículos empiecen la fase final de su crecimiento.

Está última fase parece ser particularmente crítica, ya que dentro de los días finales, los folículos desarrollan los mecanismos para ovular y luteinizar o se vuelven atresicos. Por lo que, la liberación explosiva de las gonadotrofinas posiblemente tenga dos funciones principales: marcar el inicio y el mantener la maduración de los folículos destinados a ovular.

Sí como se ha sugerido, los folículos responden en forma desigual a las condiciones hormonales cíclicas ¿Cuáles son los factores limitantes? ¿ Es está, la étapa de diferenciación de las células de la teca o de la granulosa, o ambas?.

Se han encontrado receptores a la LH, en las células de la teca y en las células de la granulosa, con lo cual podría esperarse que dichos folículos respondiesen al pico de la LH, ovulando y siguiendo la luteinización, mientras que aquellos folículos cuyas células de la

granulosa tengan poco o ningún receptor a la LH se volverían atresicos.

A este respecto, los mecanismos que regulan la aparición de los receptores a la LH en las células de la granulosa e e incrementan la sensibilidad de las células de la teca, llegan a ser particularmen - te importantes. Alternativamente algunos folículos pueden desfasarse y aunque han desarrollado los mecansimos para responder a un pico de LH o de FSH, pueden degenerarse sí él o los picos no se presentan.

Midgley et al.[155] proponen que el número normal de oocitos a ser ovulados pudiera ser una consecuencia de una selección de retroali mentación dinámica, en la cual las concentraciones basales de las gona dotrofinas son las limitantes. De acuerdo a está teoría, un incremento pequeño en estradiol causaría una caída en la secreción basal de gona dotrofinas, la cual llevaría a una baja en estradiol, originando que algunos folículos se vuelvan atresicos. Una disminución en estradiol podría causar un aumento en la secreción basal de gonadotrofinas, rese catando así al resto de los folículos.

Con base en lo anterior, Richards y Midgley[156] desarrolláron la hipótesis de que la étapa de crecimiento folicular y la diferenciae ción de las células foliculares tanto de la teca como de la granulosa determinan qué folículos responderan al pico de las gonadotrofinas para iniciar la fase final de su crecimiento.

Las diferentes respuestas de los folículos a las acciones de las gonadotrofinas puede estar relacionada, al número de receptores por célula, a el acoplamiento de esos receptores a sistemas intracelulares,

a cambios en programas intracelulares dentro de diferentes tipos celulares y/o a otras cosas.

Los estudios autoradiográficos diseñados para localizar los sitios intraovaricos de unión a FSH y a LH mostraron que la FSH yodinada se une exclusivamente a las células de la granulosa, mientras que la hCG marcada se une a las células de la teca y a las células intersticiales, y ocasionalmente a las células de la granulosa[155,157].

Eshkol y Lunenfeld[153] propusieron la existencia de sitios de unión a FSH en folículos pequeños con sólo una capa de células de la g granulosa. El crecimiento folicular, estimulado por la FSH, se caracteriza por la formación de las células de la granulosa y la formación de una membrana basal. Para un crecimiento folicular posterior se requiere en forma importante la participación de la LH.

Zeleznick et al.[157] mostraron que la FSH es capaz de actuar en los folículos preantrales grandes en las ratas inmaduras para estímular la aparición de receptores a LH y la actividad de 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células de la granulosa así como la formación del antro folicular.

Goldenberg et al.[158] observaron que los estrógenos estimulan la proliferación de las células de la granulosa evitando la atresia en algunos folículos en ratas hipofisectomizadas. En estas mismas células, se ha detectado la presencia de receptores específicos para los estrógenos. Sin embargo, un cambio en el contenido de receptores nucleares a estradiol en las células de la granulosa muestra un aumento en el conte

FACULTAD DE QUIMICA BIBLIOTECA

nido de receptor nuclear, el cual se asocia con el crecimiento folicular, mientras que la disminución en el número de receptores se asoció con la terminación del crecimiento folicular y a la luteinización o atresia. Estos resultados sugieren que los estrógenos podrían promover la diferenciación, así como el crecimiento de las células de la granulosa.

Por lo tanto, las acciones de las gonadotrofinas para promover el desarrollo folicular progresivo, parece estar abierta al menos a dos explicaciones diferentes: la FSH y la LH podrían actuar sobre las células de la granulosa y las células de la teca de los folículos pequeños para estimular la síntesis de estrógenos, y que estos causen la proliferación de las células de la granulosa y un aumento en los receptores a FSH.

De acuerdo a está hipótesis, conforme los folículos crecieceu se esperaría que se produjecen más estrógenos y adquiriéran más receptores a FSH hasta que, como los folículos preantrales grandes, lleguen a mostrar la mayor respuesta a FSH y una vez estimulados por el pico de FSH entrarían a la fase final del crecimiento(Fig. 12).

Una segunda hipótesis propone que cuando los folículos ganan la capacidad de producir estrógenos llegan a ser muy sensibles en su respuesta a las gonadotrofinas e inician la fase más rápida de crecimiento.

Richards y Midgley[156/] demostraron en las células de la granulosa de ratas hipofisectomizadas, que la administración de estrógenos,

después del tratamiento con hFSH incrementó marcadamente la velocidad de aparición de los receptores a LH, mientras que aquellas ratas hipofisectomizadas que sólo recibieron estrógenos mostráron una disminución en la concentración de los receptores a LH, y aquellos animales que sólo recibieron FSH no mostraron respuesta alguna. Estos resultados indican que la FSH induce la presencia de los receptores a LH, y que los estrógenos sólo amplifican este efecto.

En esos experimentos, estos autores encontraron que aquellas ratas hipofisectomizadas que recibieron sólo estradiol o sólo FSH, respondieron a una dósis elevada de LH produciendo folículos atresicos, mientras que los animales que recibieron estrógenos y FSH respondieron a la administración de la LH con la luteinización.

Estos datos sugieren la acción sinérgica de los estrógenos y la FSH para producir folículos capaces de responder a la presencia de la LH con la luteinización, ya que los folículos que estuvieron en presencia de una sola de ellas se volvieron atresicos, como respuesta a la presencia de la LH.

Experimentos posteriores, mostraron que la administración de FSH, únicamente, produjo un aumento en la unión de esta hormona a las células de la granulosa, y que la inyección de estrógenos previa a la FSH no mostró efectos directos o indirectos en el número de sitios de unión para la FSH presentes en las células de la granulosa, lo cual sugirió a estos autores estrógenos parecen inducir cambios en ciertos sistemas intracelulares que amplifican él o los efectos resultantes de la unión de la FSH a sus sitios receptores.

La forma en que los estrógenos podrían participar, incluye diferentes niveles por ejemplo: modificando el sistema adenilato ciclasa; acoplando o desacoplando a los receptores de la LH; o bien los estrógenos podrían estimular la producción de especies de RNAm específicas[159], las cuales estarían involucradas en la expresión del efecto de la FSH.

Con base en los experimentos descritos, Richards y Midgley modificaron su hipótesis, en la cual la FSH actuaría en los folículos pequeños incrementando tanto sus receptores como la proliferación de las células de la granulosa, y sólo cuando los folículos adquieran la capacidad para producir cantidades significativas de estrógeno (quizas solamente en las etapas finales del desarrollo, tales como grandes folículos prenatales), entonces el patrón de diferenciación de las células de la granulosa se alterará, de una proliferación celular lenta a una proliferación más rápida, con aumento en su respuesta a las gonadotrofinas.

Así, el desarrollo de los mecanismos para la producción folicular de estrógenos podría ser precisamente cronometrado y determinar si un folículo dado adquiere los mecanismos adecuados para responder tanto a FSH como a la LH para iniciar la fase final del crecimiento y ovular.

De acuerdo con esta modificación, la diferenciación de la capa de células de la teca sería importante en el desarrollo folicular (Fig. 13). A partir de los datos de Ryan et al.[160], y Makris y Ryan[161], se acepta que la mayor parte de estrógeno ovarico es de origen folicu-

lar y que su síntesis depende de la acción de FSH y LH juntas, ya que ninguna de ellas por separado estimuló la producción de estrógeno en ratas hipofisectomizadas y en particular las células de la teca sintetizen la mayor parte comparadas con las células de la granulosa.

Moon et al.[162] sugieren que las células de la granulosa son capaces de aromatizar la testosterona en presencia de la FSH. Posteriormente, Armstrong[163] observó que en cultivos de células de la granulosa de rata, los andrógenos influyen en la secreción de los estrógenos, ya que sirven como sustrato para la actividad de la enzima aromatasa inducida por la FSH y además participan en el mecanismo por el cual la FSH aumenta la actividad de la enzima.

Estas observaciones, unidas a la ausencia de receptores a FSH en las células de la teca, sugiere la existencia de algun tipo de interacción entre estas y las células de la granulosa a través del basamento folicular.

En resumen, en el desarrollo folicular parecen participar: el crecimiento de los oocitos; la proliferación y diferenciación tanto de las células de la teca como de las células de la granulosa. Los cambios en esas células parecen ser interdependientes y secuenciales; coordinados parcialmente y dependientes de los cambios cíclicos que ocurren en la secreción de las gonadotrofinas hipofisiarias. Es probable que a través de mecanismos de retroalimentación, esos cambios sean necesarios para asegurar que un número limitado de folículos, dependiendo de la especie, sean capaces de ovular en respuesta al pico de la LH en el ciclo.

Una vez que el proceso de la luteinización inducido por la LH ha sido iniciado, la LH ya no es requerida para la fase inicial de diferenciación (1-3 días) o para mantener la función de las células luteas, como lo sugiere el incremento en la secreción de progesterona observado durante el pseudoembarazo y el embarazo temprano (3-8 días), sin embargo algunos datos[164/] indican que a mediados de la gestación de la rata, la LH es requerida nuevamente.

Observaciones recientes permiten suponer que también la prolactina puede tener alguna acción conjunta con la LH y los estrógenos. Richards[165/] observó un incremento en el contenido de receptor nuclear a estradiol en las células luteales de la rata, durante el embarazo. La posibilidad de que en la rata, el estrógeno, sea luteotrófico es porque la producción de la progesterona puede ser mantenida por los estrógenos en ratas embarazadas e hipofisectomizadas después del día 12[166/].

Aunque los mecanismos para mantener la función de las células luteas se desconocen, se sabe que el aumento de los receptores a estradiol en esas células, durante el embarazo, es paralelo al incremento en los receptores a LH en el mismo tipo celular y a la actividad de la adenilato ciclasa e inversamente relacionado al receptor a prolactina. Al, respecto Richards y Midgley sugieren que la LH podría incrementar los receptores a prolactina y ésta última aumentaría los receptores a la LH en la célula lutea en desarrollo, mientras que la FSH en presencia de estradiol incrementaría los receptores a LH en las células de la granulosa.

Estos datos sugieren que la prolactina por un lado, y la FSH

y el estradiol por otro, pueden regular la síntesis de una proteína, como sería el receptor a LH, por lo que será interesante estudiar los mecanismos por los cuales aquellas hormonas modifican la transcripción de genes específicos.

En suma, los folículos y el cuerpo luteo parecen seguir etapas específicas de diferenciación, cada estado caracterizado por requerimientos hormonales también específicos. El desarrollo folicular parece involucrar la acción secuencial de las hormonas sobre las células de la granulosa, de tal forma que la acción de una hormona puede determinar el contenido celular de su propio receptor y en una acción sinérgica con una segunda hormona puede determinar la presencia del receptor a una tercera hormona. Así, se ha mostrado que el estradiol aumenta sus receptores en las células de la granulosa y la FSH incrementa los suyos; además el estradiol y la FSH juntas incrementan los receptores a LH en esas mismas células.

La atresia puede presentarse como resultado de la estimulación hormonal (LH o un producto de la acción de la LH, testosterona) o bien como resultado de la ausencia de una estimulación hormonal adecuada. De cualquier forma, la atresia está asociada con la perdida de receptores a estradiol, FSH y LH.

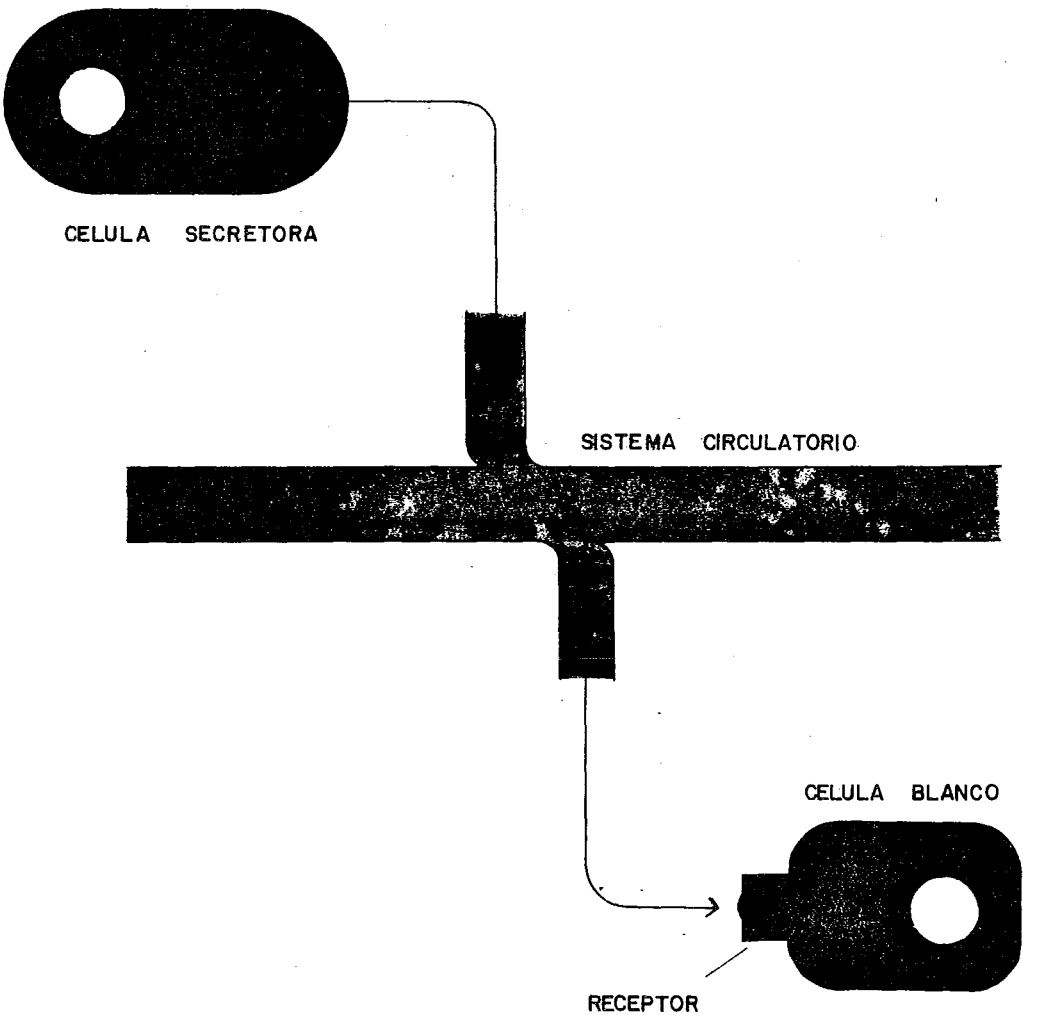
La terminación del crecimiento folicular por la luteinización inducida por la LH, se asocia con la perdida de receptores a FSH: una disminución en los receptores a el estradiol y a la LH, y un aumento en los receptores a la prolactina. Los receptores a la LH en las células luteales y la producción de progesterona son incrementadas en forma sub

secuente sólo sí la prolactina está presente durante los procesos primarios de la luteinización (dentro de las 48 horas de la estimulación de la LH).

Aunque, el incremento en los receptores a LH y la producción de progesterona puede sugerir que el receptor a LH sea limitante para la producción de progesterona, no existe evidencia de ello durante el período primario de la luteinización. El aumento en los receptores a la LH y el incremento en la producción de la progesterona podrían presentarse como eventos independientes regulados por la prolactina.

FIG. 7 COMUNICACION INTERCELULAR.

La hormona es liberada de una célula (célula que la envía) viaja atravéz del medio intracelular y se une al receptor de una segunda célula (célula que la recibe).



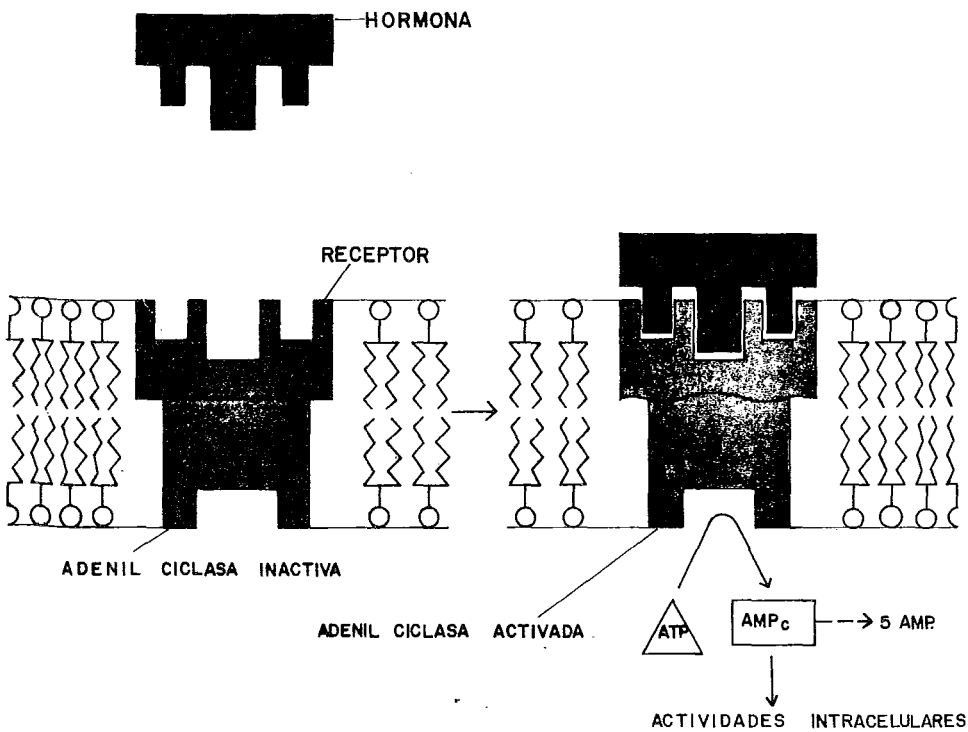


FIG. 8 COMUNICACION INTRACELULAR

La adenilato ciclasa se activa por la unión de la hormona a su receptor en la superficie celular. La enzima en el citoplasma convierte al ATP en AMPc, el cual envía la señal al interior de la célula.

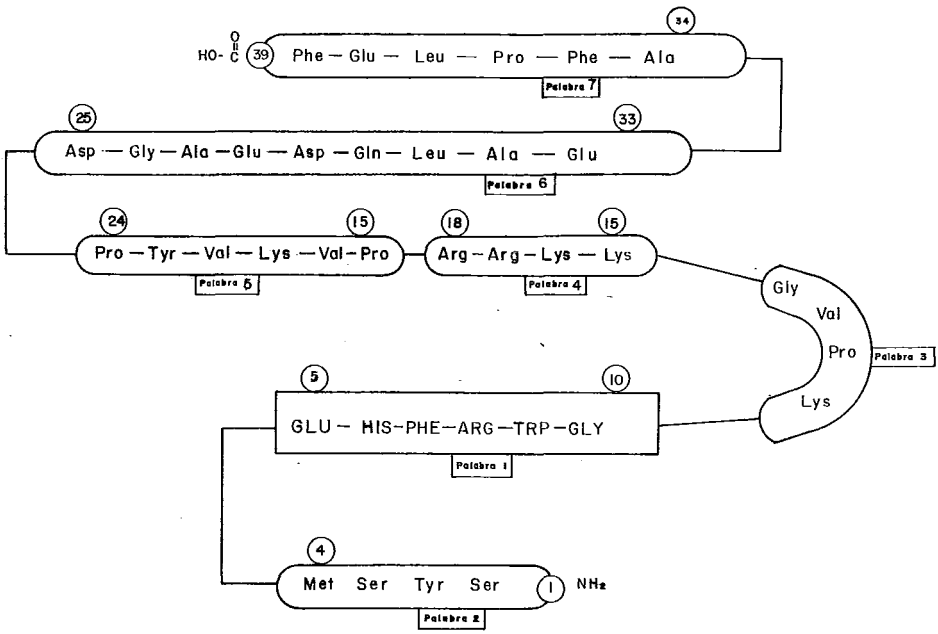


FIG 9. **Especificación funcional de las palabras en la oración ACTH (porcina) de acuerdo a Schwyzer (1968).**

Palabra 1 ($ACTH^{5-10}$) actúa sobre los receptores de anfibios.

Palabra 2 ($ACTH^{1-4}$) y la palabra 3 ($ACTH^{11-14}$) mejoran 1 000 veces la actividad sobre los receptores de anfibios.

Palabra 4 ($ACTH^{15-18}$) adapta a las palabras 1, 2 y 3 a los receptores de la corteza adrenal y reduce la eficiencia sobre los receptores de los anfibios.

Palabra 5 ($ACTH^{19-24}$) y palabra 7 ($ACTH^{34-39}$) estabiliza a la molécula ACTH durante el transporte.

Palabra 6 ($ACTH^{25-33}$) marca específica de las especies.

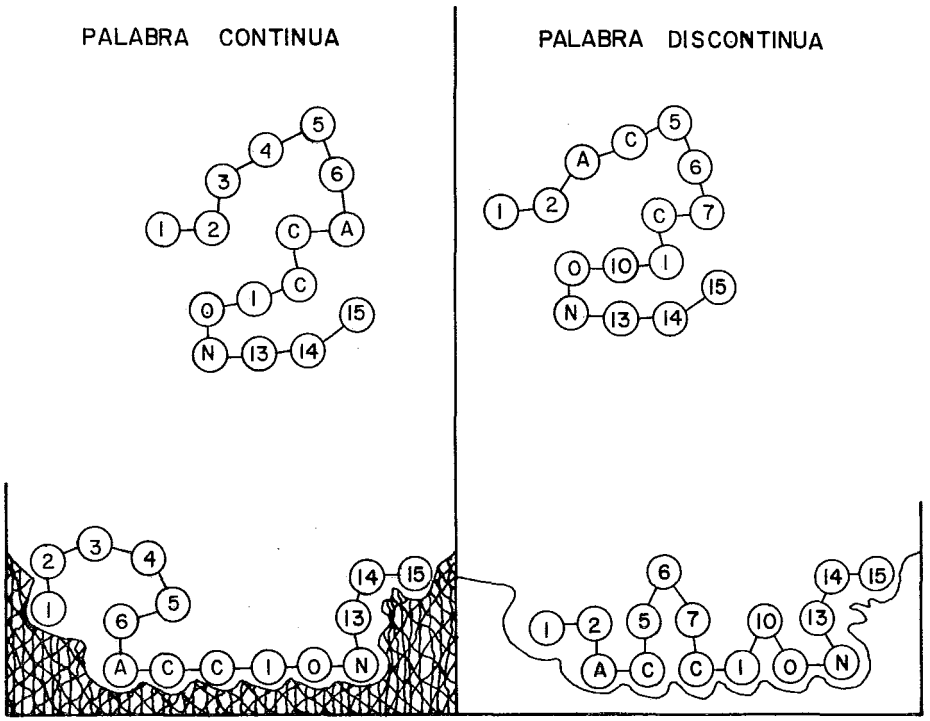


FIG 10 Representación esquemática de las palabras Contínua y Discontínua de Schwyzer.
La conformación del péptido pequeño flexible en su ambiente acuoso se cambia en la superficie del receptor topográficamente más estable impone el cambio topoquímico en la hormona, como consecuencia de una serie sucesiva de interacciones binarias entre grupos complementarios del receptor y la hormona.

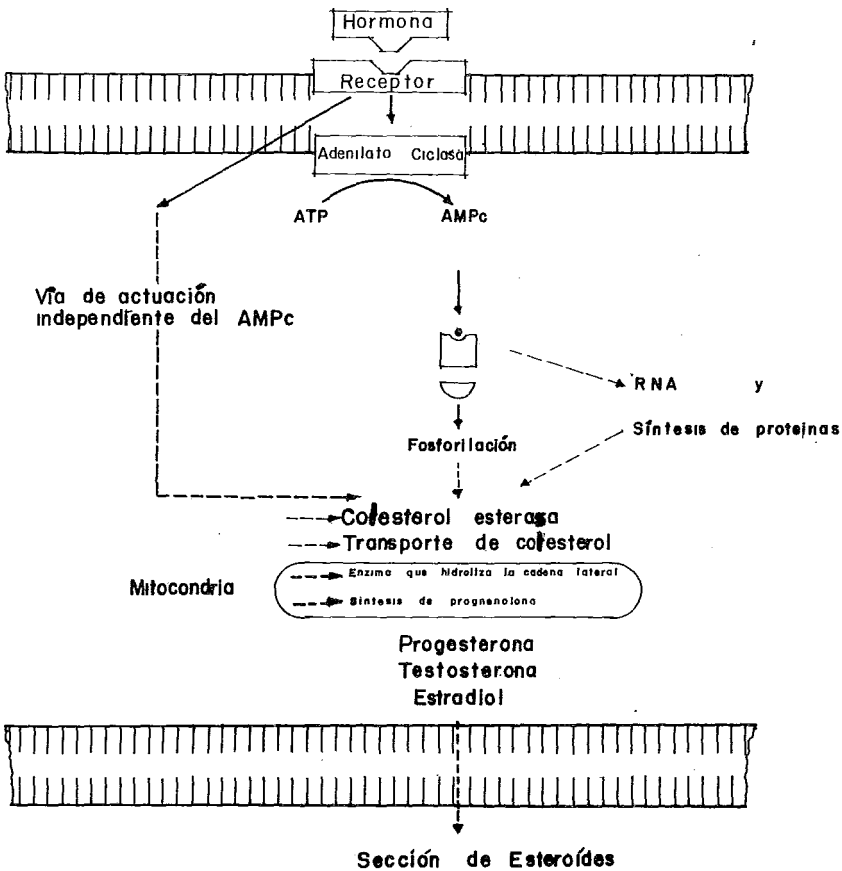


FIG II Diagramas de las vías involucradas en la regulación de la esteroidogénesis, en los tejidos gonadales por la hormona luteinizante ___/

DESARROLLO FOLICULAR

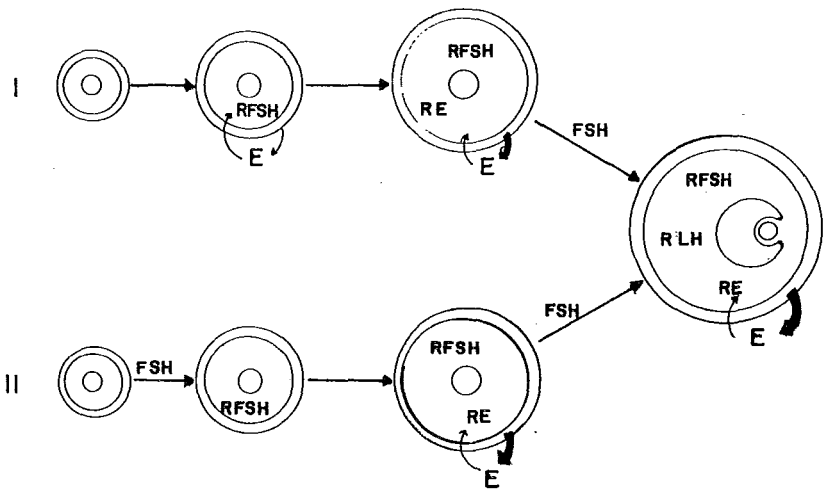


FIG. 12 Estimulación temprana de la proliferación de las células de la granulosa y la aparición de receptores a estradiol (RE) y a FSH (RFSH) debida al estradiol (I) y a la FSH (II).

DIFERENCIACION DE LAS CELULAS DE LA TECA

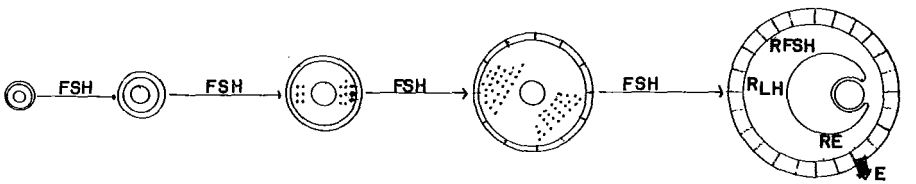


FIG. 13

Organizador de las células de la TECA.

Diferenciación de las celulas de la TECA.

1 ↑E producción
2 ↑ R_{LH}
3 ↑ AC
4 ↑ capacidad para luteinizarse.

Diferenciación de las celulas de la granulosa.

1 ↑ RH
2 ↑ capacidad para luteinizarse.
3 ↑ progesterona.
4 ↑ 3. HSD

FIG 13 Modificación de la hipótesis de Richards y Midgley 153

HORMONAS LIBERADORAS

A partir de la observación de que los factores emocionales y ambientales influían en la reproducción, se empezó a investigar la relación entre el sistema nervioso central y la secreción de las gonadotrofinas.

Los experimentos realizados, establecieron la existencia de un control hipotálamico sobre la liberación de las hormonas gonadotrofinas, postulandose que dicho control se ejercía por sustancias neurohumorales originadas en el área de la eminencia media del hipotálamo, transportadas a través del sistema sanguíneo porta hipofisiario[168/].

El desarrollo de nuevas ideas sobre el control neurohumoral parece haber empezado con la teoría de Hinsey y Markee en 1933[169/], de que un estímulo hipotálamico activa al lóbulo posterior de la hipófisis, el cual, a su vez activa al lóbulo anterior por medios hormonales.

Marshall[170/] mostró que el sistema nervioso central estaba involucrado en el control de la liberación de las hormonas gonadotrofinas enfatizando la importancia de los estimulos exteriores que actuaban a través del sistema nervioso y de la adenohipófisis en la regulación de los ritmos y del ciclo reproductivo.

Posterior al descubrimiento de un sistema porta hipofisiario efectuado por Popa y Fielding[171/]: Harris y Green[172/] demostraron claramente que la dirección del flujo sanguíneo íba del hipotálamo a la pituitaria, por lo que postularon, que el control hipotálamico sobre la

hipófisis se efectuaba por medio de un mecanismo neurohumoral.

Está hipótesis suponía que las terminales nerviosas de las fibras del hipotálamo liberaban transmisores humorales a los capilares de la eminencia media, los cuales al alcanzar la adenohipófisis regulaban su función gonadotrofica.

Este punto de vista se relacionaba indirectamente con la teoría de Bargman[173], y Scharrer y Scharrer[174] la cual suponía que las hormonas del lóbulo posterior, la oxitocina y la vasopresina, eran formadas dentro de las células neurosecretoras del hipotálamo y posteriormente, transportadas a través de los axones de la vía hipotálamo-hipófisis a las terminales nerviosas en el lóbulo neural, el cual servia como almacén y centro liberador.

La primera evidencia de la existencia de un sistema neurohumoral hipotálamico que regulara la liberación de la LH, fué propuesta, independientemente, por Mc Cann[175] y Harris et al.[176]. Posteriormente, diferentes grupos de investigadores demostráron que los extractos de algunas especies de animales eran capaces de estimular la liberación de la LH[177-181]. Cuando encontraron que los extractos hipotálamicos de estas especies eran capaces de estimular la liberación de otras hormonas hipofisiarias como la tirotropina y la hormona de crecimiento, entre otras, dichas sustancias fueron llamadas factores liberadores, a las que más tarde se les designó hormonas liberadoras.

Al principio, se penso en la existencia de dos sustancias diferentes responsables de la estimulación para liberar a la LH y a la

FSH[182]. Sin embargo, al obtenerse del cerdo la hormona liberadora de la LH (LH-RH) pura, se observó que estimulaba la liberación de ambas hormonas, en ratas, chimpancés y en el hombre[183,184]. En ese momento, no estaba claro sí la actividad liberadora de FSH por la LH-RH porcina se debia a alguna propiedad intrínseca de la molécula o a una contaminación con la FSH-RH.

La inactivación enzimática de la LH-RH produjó la perdida de la actividad de FSH-RH. Se observó que se requieren nanogramos dela LH -RH para estimular la liberación de la FSH y la LH, tanto "in vivo" como "in vitro". Al purificar la LH-RH y FSH-RH humana, se observó que las fracciones de LH-RH estaban siempre asociadas con una actividad considerable de FSH-RH, se supone que las hormonas liberadoras hipotálamicas humanas poseen características químicas, semejantes a las de los animales.

Schally y sus colaboradores[183-185], fueron los primeros en encontrar que las hormonas liberadoras eran de naturaleza peptídica y observaron que al tratar esas hormonas con diferentes enzimas, sólo algunas endopeptidasas como la quimotripsina y la papaína suprimieron su actividad biológica.

Al conocerse la secuencia de aminoácidos, la presencia del piroglutámico como residuo N-terminal explicaba porque la hormona no se inactivaba al tratarla con algunas exopeptidasas y por otra parte, siguiendo la degradación de Edman, se pudo explicar la resistencia de la hormona a la acción de la tripsina debida a la presencia del enlace arginina - prolina.

Ya que existía la posibilidad de que la molécula de la hormona liberadora de la LH y la FSH tuvieran carbohidratos, se sometió dicha hormona a la acción de la neuraminidasa, pero no afectó su actividad. El tratamiento con peryodato produjo una inactivación parcial la cual pudo ser explicada posteriormente por la oxidación del residuo triptofano, al parecer este aminoácido es esencial para la actividad biológica del polipéptido[185].

La primera estructura en determinarse fué la LH-RH porcina [186], obteniendose un decapéptido con la siguiente secuencia: (piro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 , la cual fue comprobada, entre otros, por Baba et al.[187] quienes obtuvieron la misma secuencia (Fig. 14).

Mecanismo de Acción

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo de acción de la hormona liberadora de las gonadotrofinas (Gn-RH) las cuales se basan en diversas observaciones efectuadas al estimular hipófisis con la hormona liberadora.

Al parecer la LH-RH actúa sólo en la liberación de la LH y no en su síntesis, por lo que se piensa en la existencia de factores necesarios que afecten la acción de la hormona liberadora como sería : una fuente de energía para el transporte de la LH a través de la membrana y para que dicho transporte se efectue tal vez sea necesaria la presencia de iones específicos.

Samli y Geschwind[188] estudiaron en pituitarias de rata, los efectos de los inhibidores metabolicos en el factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RF) sobre la liberación de la LH; así como los efectos del Ca^{++} y del K^{+}.

Sus resultados mostraron que los inhibidores metabolicos como el 2,4-dinitrofenol y la oligomicina no afectaron la liberación de la LH, lo que podría indicar que la liberación y la síntesis de la LH sean fenómenos separados. Aunque debe tomarse en cuenta que concentraciones grandes de oligomicina alteran el funcionamiento de la célula.

Se encontró que el Ca^{++} era necesario para la acción de los extractos hipotálamicos. Estos autores sugieren que el Ca^{++} podría formar parte de un complejo, el cual transportaria a la LH a través de la membrana y después de haber entrado a la célula iniciaría el proceso de la liberación por inhibición competitiva a la unión de la LH a otras proteínas, a las cuales podría estar unida, libertandola para su secreción, o podría activar a alguna enzima involucrada en la liberación de la LH.

Una concentración elevada de K^{+} aumento la liberación de la LH, pero fué dependiente de la presencia de Ca^{++}, además de tener un efecto aditivo.

Por otra parte, Jutisz y De la Llosa[189] estudiaron en hipófisis de rata, los requerimientos de Ca^{++} y Mg^{++} en el medio de incubación para la liberación y síntesis o activación de la FSH debida a la FSH-RH. Sus resultados mostráron que la liberación "in vitro" de la FSH, al ser

estimulada por un factor específico (FRF) o inespecífico (AMPc o K^+) requieren la presencia del Ca^{++} en el medio externo, así como su síntesis o activación.

Estos datos, confirman los resultados de Samli y Geswind, respecto al requerimiento del Ca^{++} en la liberación de las gonadotrofinas. Sin embargo, la participación de este ion en la síntesis de la FSH no está clara ya que no se sabe sí este proceso sea un fenómeno secundario originado por la liberación de la FSH o sea inducido por la hormona liberadora o por la concentración elevada del K^+.

Se ha observado que la LH-RH afecta el mecanismo de secreción de la LH por una acción directa (liberación de la LH por sí misma) o p por medio de la formación de un factor proteico, tal vez bajo control ovarico [190].

Otra hipótesis sugiere que así como las hormonas gonadotroficas LH y FSH efectuan su acción por medio de la estimulación de la adenil ciclasa y la formación, y liberación del AMPc, la hormona liberadora de las gonadotrofinas (Gn-RH).

Estudios recientes[191] efectuados en células dispersas de hipófisis ovina mostraron la liberación específica del AMPc y de la LH debida a la Gn-RH. Además la dósis mínima efectiva para liberar AMPc y LH fué la misma, asíccomo los patrónes temporales de liberación. Estas observaciones apoyan ésta última hipótesis.

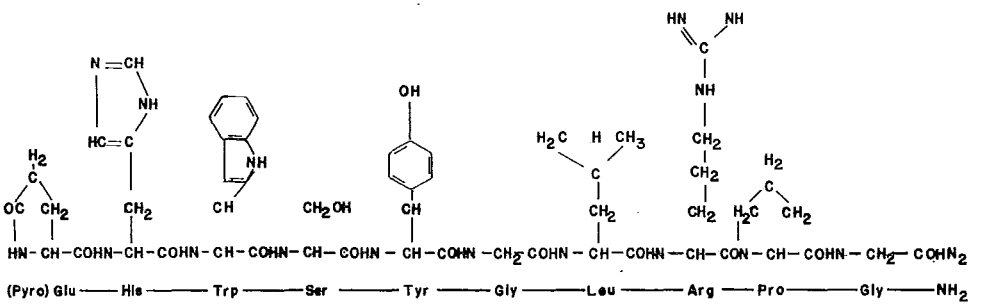


FIG. 14 Estructura molecular de la hormona liberadora de la LH y la FSH de porcino (LH-RH / FSH RH) 186/.

REGULACION DE LAS ACTIVIDADES HORMONALES

Hasta este momento hemos descrito, que el hipotálamo regula la función hipofisiaria afectando la secreción de las hormonas gonadotroficas y de algunas otras hormonas hipofisiarias a través de los factores liberadores.

A su vez las hormonas gonadotroficas (tema principal de este trabajo) tienen un efecto sobre la esteroidogénesis en las gónadas, obteniendose como fenómeno general, el control de la maduración de las células germinales (oocitos y espermatozoides). De está forma se plantea que la función gonadal puede verse afectada tanto por la función hipofisiaria como por la función hipotálamica, ambas a larga distancia.

Indicaremos ahora, los mecanismos por los cuales, el producto de la función gonadal, que son las hormonas esteroides, pueden a su vez afectar la secreción tanto de los factores liberadores (hormonas hipotálamicas) como de las hormonas hipofisiarias, originando así mecanismos de autoregulación positivos y negativos (retroalimentación) que permiten controlar a diferentes niveles la función de todos los órganos participantes (hipotálamo, hipófisis y gónadas).

Este tipo de regulación fué sugerido desde 1932 por Moore y Price, y Meyer et al.[192,193] quienes propusieron que la adenohipófisis y los ovarios estaban relacionados a través de interacciones hormonales y que los esteroides sexuales actuaban directamente sobre la hipófisis suprimiendo la secreción de las gonadotrofinas.

Esta hipótesis fue reforzada por Holwer y Junkmann[194], quienes

propusieron la existencia de un centro sexual hipotálamico u otros centros localizados en otras regiones del sistema nervioso central. Esto es, que las hormonas esteroides secretadas por las gónadas bajo la influencia de las gonadotrofinas hipofisiarias reduce la secreción de la LH y la FSH de la hipófisis, de está forma la secreción de la LH y la FSH mantiene una relación inversa con la secreción de las hormonas esteroídes. Por ejemplo, en la castración donde existe una disminución en la concentración de hormonas esteroídes, se observa una mayor secreción de LH y FSH.

Flerko y Szentagothai[195/] implantaron fragmentos de ovario en el hipotálamo, cerca del núcleo paraventricular, logrando la inhibición de la función gonadotrofica, de lo que concluyeron que la retroalimentación por los estrógenos requiere una mediación hipotálamica, esto también ha sido propuesto por otros investigadores[196a,b;197a,b,c/].

Bogdanove[198/] encontró que la implantación de estrógenos tanto en el hipotálamo como en la hipófisis tenía un efecto inhibidor sin embargo, Kanematsu y Sawyer[199/] observáron que en el conejo, el implante intrahipotálamico era más efectivo que el implante intrahipofisiario. De ahí, estos autores, concluyeron que el hipotálamo contiene elementos nerviosos sensibles a los esteroídes, mientras que Bogdanove concluye que los esteroídes llegan más fácilmente a la hipófisis a través de una vía hipotálamica que cuando son implantados directamente.

Progestágenos

Los efectos de la progesterona son menos espectaculares que los mostrados por los estrógenos. El efecto de la progesterona sobre la

liberación de la LH parece ser complejo[200].

Rothchild[201] sugirió que la progesterona podia suprimir el pico ovulatorio de la LH, pero no la secreción basal de ésta misma hormona. En ratas ovariectomizadas, la progesterona aún en grandes dosis es un inhibidor pobre de la liberación de la LH, sin embargo administrada junto con los estrógenos puede suprimirla.

Aunque algunos trabajos con progesterona sintética han sugerido que el sitio de control negativo de los esteroides progestacionales podría ser el hipotálamo[203,203] los ensayos de Arimura y Schally[204], y Hilliard et al.[205] indican que al menos en ratas y conejos, la progesterona ejerce parte de su efecto inhibidor directamente sobre la hipófisis.

Un tipo diferente de experimentos ha mostrado que en varias estructuras que son blanco de la progesterona, está es metabolizada; sugiriendose que la formación de algunos intermediariossea esencial para que la progesterona ejerza su efecto biológico.

Los experimentos realizados por Martini[200] sobre la liberacion de la FSH y la LH en ratas castradas, mostró que la castración producía un incremento en la secreción de ambas hormonas y que la administración de etinil estradiol, disminuía 8 veces los niveles circulantes de LH y FSH. En estas condiciones, la inyección de progesterona liberó ligeramente la inhibición del etinil estradiol, ya que incrementó en 2.5 veces la concentración de las hormonas en la sangre.

Aún más, tres metabolitos de la progesterona que fueron pro-

bados después del etinil estradiol dieron los siguientes resultados: la dihidroprogesterona apenas aumentó en 1.5 veces la concentración circulante de las hormonas, mientras que el 5α-pregnan-3-α-ol-20-ona (3α-ol) producía un efecto similar al de la progesterona. Sin embargo, el epímero 3β-ol aumentó 4.5 veces la concentración de LH y FSH, con lo cual mostró ser el compuesto más potente.

De estos resultados, Martini sugiere que es probable que estos compuestos puedan tener alguna participación fisiológica en los procesos que conduzcan a la liberación de las gonadotrofinas, al alcanzar por vía sistémica el complejo hipotálamo-hipófisis.

Andrógenos

Aunque la testosterona puede inhibir la síntesis y la liberación de la LH, así como la liberación de la FSH en ratas macho y hembra, su acción es menos efectiva que la de los estrógenos.

Al trabajar con ratas orquidectomizadas, Bogdanove et al.[206/] observáron que un aumento en la liberación de la FSH podía ser evitada por la administración de latestosterona. Al descontinuar el tratamiento con el andrógeno, los niveles plasmáticos de ambas hormonas sufren una elevación.

Lisk[197c/], y Smith y Davidson[196a/] implantáron testosterona en la eminencia media de ratas y perros, respectivamente, produciendo atrófia gonadal e inhibición en la secreción de gonadotrofinas. De esos resultados se estableció que la región hipotálamica basal media es uno de

los sitios en donde probablemente ocurra el control por retroalimentación de los andrógenos.

Aunque la testosterona es el andrógeno predominante secretado por las células de Leydig es respuesta al estímulo de la LH, existen evidencias que sugieren que la testosterona debe ser convertida a estradiol para ejercer el control sobre los niveles de la LH y la FSH, a pesar de que la concentración del estrógeno en el plasma de los hombres es menor al 1% de la concentración que alcanza la testosterona.

La presencia de receptores específicos a la testosterona y dihidrotestosterona se ha demostrado en el hipotálamo y la hipófisis de roedores, sugiriendo que los andrógenos pueden tener un efecto directo sobre esos tejidos, por lo que se esperaría que los mecanismos a través de los cuales los andrógenos y los estrógenos producen la inhibición de la concentración de la LH, pueden ser diferentes.

Sin embargo, debido a que la testosterona puede ser convertida a estradiol tanto por los tejidos periféricos como por el sistema central; existe la posibilidad de que una parte de la acción de los andrógenos sea mediada a través de su conversión a estradiol[207], con lo cual la acción inhibidora de los andrógenos tendría dos compuestos; uno andrógenico puro y otro estrógenico.

Winters et al.[208] estudiaron ésta posibilidad, para ello, inyectaron a hombres con clomifen, un antagonista estrógenico no esteroidal, para que ocupára los sitios receptores citoplasmáticos a los estrógenos. En esos experimentos, la testosterona falló en producir la dismi

nución de los niveles de LH y FSH, indicando que la aromatización a estradiol es un paso crítico en la acción de latestosterona.

Sin embargo, el hecho de que los andrógenos no aromatizables como la dihidrotestosterona y la fluoximesterona falláran también en afectar los niveles sericos de las gonadotrofinas sugieren la posibilidad de que el clomifen interaccione con el receptor andrógenico del citosol. Aunque Groover y Odell[209] en estudios "in vitro" no observaron competencia del citrato de clomifen por los sitios de unión para los andrógenos presentes en el citosol de la prostata ventral de la rata.

El tratamiento de hombres normales con dósis grandes de un andrógeno no aromatizable como la fluoximesterona (10 mg cuatro veces al día) disminuye los niveles de la LH, lo que apoya fuertemente un tipo de regulación por retroalimentación puramente andrógenico.

Lacroix, Mc Kenna y Rabinowitz[210] efectuaron experimentos en hombres normales y en hombres con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos, obteniendo resultados que concuerdan con el punto de vista de que la modulación por retroalimentación que ejerce el testículo sobre los niveles de la LH sea efectuada de manera importante por los efectos directos e independientes tanto de los andrógenos como de los estrógenos. Mientras que, sólo los estrógenos mostraron una modulación díscreta y parcial sobre la secreción de la FSH.

Prostaglandinas

Se ha sugerido que las prostaglandinas participen en los fenó

menos del control de la reproducción afectando el hipotálamo y la hipó fisis, con lo cual se afecta la secreción de gonadotrofinas y por tanto se controla la ovulación, la luteinización y la regresión del cuerpo lu teo; a parte de su efecto en la función uterina y la función placento-fetal.

Se ha propuesto, que la estimulación que ejercen las prosta-glandinas sobre la secreción de las gonadotrofinas no se deba a una acción directa sobre la adenohipófisis.

Al parecer esta acción la ejercen en el hipotálamo, ya que la administración de prostaglandinas en el ventrículo cerbral mimifica el efecto intravenoso de las prostaglandinas sobre la secreción gonadotro fica y además el tratamiento de ratas, hembra y macho, con antisuero LH-RH bloquea el aumento de los niveles de la LH, estimulados por la prostaglandina E_2.

Esto indicaría, que las prostaglandinas estimulan la secreción de la LH-RH participando quizá como mediador en reacciones o vías comu nes a la liberación de productos hipotálamicos.

En 1973 Spies y Norman[211/] sugirieron que las prostaglandinas tenían un efecto sobre la ovulación y probablemente sobre la secreción de la LH. Posteriormente, Martini[200/] estudió los efectos de la prosta-glandina E_1 (PGE_1) y de la prostaglandina F_2 (PGF_2): en ratas hembra y macho castradas, y tratadas previa mente con benzoato de estradiol.

Los resultados mostraron que la PGE_1 aumentó los niveles de la

LH, tanto en hembras como en machos, pero no afectó los niveles de la FSH. Por el contrario, la prostaglandina F_2 tuvo efecto sobre la secreción de la FSH en ambos sexos sin mostrar efecto sobre la secreción de la LH. Harms et al.[212] también observaron, que la PGE_1 no altera los niveles de la LH en ratas castradas a menos que sean pretratadas con estrógenos.

Aún no se define, sí las prostaglandinas actuan directamente sobre las neuronas que contienen a la hormona liberadora (LH-RH) para estimular su liberación o sí ejercen su acción en otras neuronas que formen sinápsis con las neuronas LH-RH.

Se podría sugerir que los efectores positivos o negativos que regulan la función hipotálamica podrían depender de una acción común de las prostaglandinas, cuya especificidad estaría dada por receptores a tales efectores en el hipotálamo.

Sí fuese así, los cambios en los niveles de las prostaglandinas podrían estar restringidos y localizados a ciertas áreas del hipotálamo lo cual se lograría a través de el control de la síntesis y la degradación de las prostaglandinas, o bien por la presencia de receptores específicos a ellas.

Una evidencia de que la relación gonadotrofinas-prostaglandinas pueda estar involucrada en el control hormonal, se confirma con los datos de Clark et al.[213] que muestran que la LH estimula la síntesis de prostaglandinas en las células de la granulosa de la rata.

Inhibina

Ya que la secreción de la FSH parece no estar regulada, únicamente, por los esteroides gonadales, se ha sugerido un mecanismo adicional de retroalimentación que controle la secreción de la FSH.

Originalmente se propuso que en el macho podría existir, y en el que participaría una proteína llamada "inhibina" la cual se encontró en extractos de testículo y era capaz de inhibir la secreción de la FSH [214]. Posteriormente, se observó que también los extractos obtenidos del ovario de bovino y del líquido folicular de porcino inhibian la secreción de FSH tanto en ratas macho y hembra castradas así como en los animales control [215-218].

Steinberger et al.[219] demostraron que las preparaciones de la inhibina (SCF-Sertoli Cell Factor) disminuyen selectivamente, la síntesis y la liberación de la FSH en un cultivo de células hipofisiarias, sin embargo, este efecto pudiera depender de la dosis, ya que concentraciones mayores de la inhibina afectaron también la síntesis de la FSH.

Se ha observado que tanto en ratas normales como castradas, la inyección de una fracción del plasma seminal de toro (AC II) disminuye los niveles de la FSH sin afectar los de la LH. Este tratamiento disminuye también la respuesta de la FSH a la estimulación por la LH-RH, en ratas macho castradas[220].

Lugaro y colaboradores[221] observaron que un factor proteico aislado del espermatozoide del toro que fué administrado en el ventrí-

culo lateral de ratas macho castradas, disminuyó los niveles de la FSH así como la actividad de la hormona liberadora hipotálamica. Esto po - dría indicar que la inhibina puede actuar tanto a nivel de pituitaria como del hipotálamo.

Se ha demostrado que la inhibina es una molécula de naturaleza proteíca la cual es producida como se indicó anteriormente por las células de Sertoli en el macho[222/] y posiblemente en las células de la granulosa del folículo, en la hembra[223/].

Las características biológicas, inmunológicas y químicas del compuesto producido por ambas gónadas son semejantes lo cual permite suponer que se trata de la misma molécula.

Parece que la molécula de "inhibina" no tiene las propiedades de la proteína acarreadora de andrógenos (ABP), ni de los fragmentos de las gonadotrofinas. Su peso molecular aún no esta definido exactamente, y e posible que existan dos formas de inhibina en el fluído de la rete testis; una de 10 000 daltons y otra más pequeña. la de mayor peso molecular podría ser un polímero o una combinación de la inhibina nativa y una sustancia acarreadora o una molécula precursora[224/].

Se ha observado que ésta sustancia ejerce una acción inhibidora en la síntesis del DNA en los testículos de ratas macho puberales y evita la maduración del folículo en la hembra[225/].

Control del metabolismo de las hormonas liberadoras

Ya que se demostrado que la LH-RH es un péptido pequeño:

(piro Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2) es de suponer que ciertas enzimas proteolíticas, presentes en el hipotálamo, participen en la liberación y/o degradación de ésta neurohormona.

Dos observaciones apoyan fuertemente está idea, por un lado Sandow et al.[226] y Griffiths et al.[227] observaron la degradación por el tejido cerebral de la LH-RH sintética, mientras que Ellis y Perry, y Suszkiw y Brecher[228,229] demostraron la presencia de oligopeptidasas en la hipófisis, las cuales fueron llamadas arilamidasas.

Ya que, Vanha-Perttula demostró en 1969[230] que la administración crónica de estrógenos a ratas hembra, produjo un incremento de esta enzima en la hipófisis; Kuhl y Taubert[231] pensarón en la posibilidad de que estas enzimas regulen la liberación de las gonadotrofinas y que a la vez su actividad sea controlada por las hormonas esteroídes.

Sus observaciones con la L-cisteina arilamidasa, mostraron la posible existencia de dos tipos de regulación para dicha enzima: una de asa ultracorta, puesto que la LH y la FSH modificaron el contenido de ésta enzima, y una de asa a larga distancia, puesto que las hormonas esteroídes afectaron la actividad de la enzima.

Debido a que las arilamidasas se encuentran tanto en el hipotálamo como en la hipófisis, puede pensarse que este tipo de enzimas participa en los itios de secreción y sitios de acción de la LH-RH.

Koch y Fridkin[232] observaron que algunas peptidasas presentes en extractos hipotálamicos e hipofisiarios de la rata, rompen la

LH-RH preferentemente en la posición Gly^6-Leu^7 y además, dichos extractos poseen una actividad enzimatica que parece abrir el anillo piroglutamico terminal del hexapéptido, producto de la degradación. Se observó que el tejido hipotálamico posee tambien una actividad enzimatica que rompe a la LH-RH en el enlace Ser^4-Tyr^5.

Estas actividades enzimaticas son afectadas por los estrógenos con lo que la degración de la LH-RH puede ser un mecanismo que regula la actividad de la hormona afectando su concentración.

Bauer et al.[233] describen en extractos de tejido hipotálamico e hipofisiario de la presencia de una piroglutamato aminopeptidasa a la TRF así como a varios péptidos que contengan piroglutámico en el extremo carboxilo. Las reacciones de desaminación podrían ser efectuadas por una endopeptidasa que hidroliza enlaces post-prolina.

Todas las observaciones descritas anteriormente sugieren que las actividades presentes tanto en el hipotálamo como en la hipófisis pueden sufrir alteraciones ocasionadas por las variaciones en los niveles hormonales del suero, la cual parece ser un factor importante en el funcionamiento adecuado del mecanismo de control por retroalimentación con que son reguladas las gonadotrofinas.

Aunque Schally en 1973[234] demostró que los estrógenos, la progesterona y la testosterona en concentraciones elevadas inhibian la accióm de la LH-RH, éste autor no dió explicación a ello.

La figura 15 es una representación esquematica de las respues

tas mostradas por la hipófisis al ser tratada con compuestos exógenos. El posible sitio de acción en el sistema (hipotálamo, hipófisis, ovario) se indica por los símbolos positivos (+) y negativo (-) [234a/].

I El tratamiento con esteroídes gonadales, principalmente estrógenos, inhibe la secreción de las hormonas liberadoras impidiendo así la secreción de las hormonas gonadotroficas, lo que a su vez, origina una dismunución de la secreción de los esteroídes gonadales.

II El tratamiento con los factores liberadores estimularía la liberación de gonadotrofinas, produciendo un aumento de la retroalimentación negativa (-) de los esteroídes en el hipotálamo y en la hipófisis.

III Los inhibidores de los factores liberadores disminuirian tanto la función hipofisiaria como la función ovarica, y en ausencia de los esteroídes se aumentaría la producción de los factores liberadores en el hipotálamo.

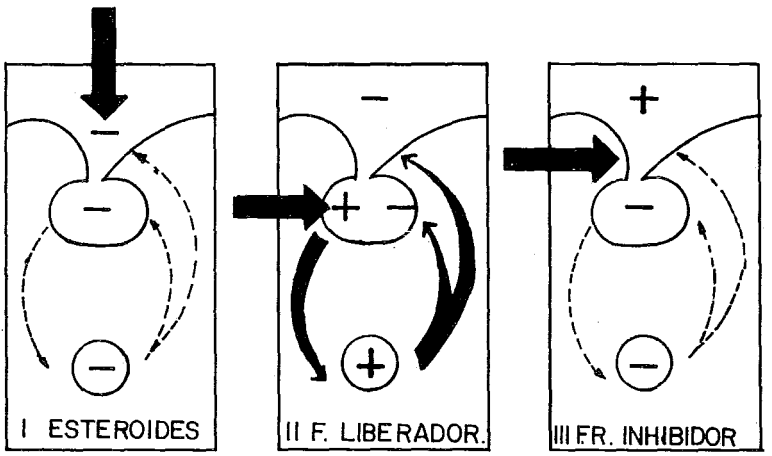


FIG. 15 Posible sitio de acción de los esteroides gonadales y de los liberadores.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Como hemos dicho, uno de los graves problemas que enfrenta el mundo en la actualidad, es la sobrepoblación: el cual, al no ser controlado puede traer como consecuencia la carencia de alimentos, aumento de la contaminación, falta de espacio, etc.

Por ello es muy importante conocer todos los procesos involucrados en dicho problema, y ya que los fenómenos biológicos relacionados con la reproducción son fundamentales, su conocimiento nos permitirá diseñar estrategias para desarrollar los métodos más adecuados que controlen la reproducción.

Con tal motivo, se efectuó una revisión bibliográfica de un sistema que controla la fertilidad en ambos sexos y en particular se decidió estudiar a las hormonas gonadotroficas, puesto que siendo proteínas parece un sistema complejo de controlar y resulta un excelente ejemplo de la acción de todas las hormonas proteícas. Además, la regulación de su función involucra interrelaciones importantes entre órganos tan distantes como son el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas.

Debido a un "estímulo" , el hipotálamo secreta la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) la cual, mediante el sistema porta hipofisiario llega a la adenohipófisis donde estimula la secreción de las hormonas gonadotroficas: LH y FSH.

Después de ser liberadas, ambas gonadotrofinas viajan por medio de la circulacion periférica hasta llegar a las gónadas donde ejer

cen su acción.

En los testículos, la función principal de las gonadotrofinas es el desarrollo de la espermatogénesis y la formación de los esteroídes andrógenicos, principalmente la testosterona.

En los ovarios, la FSH estimula el crecimiento de los folículos, los cuales por acción de la LH alcanzan su madurez y comienzan a secretar estrógenos y progesterona.

En general, el control de estas hormonas se lleva a cabo a través de dos sistemas: los de asas largas y los de asas cortas.

Las asas largas están ejemplificadas por la acción que ejercen los esteroídes gonadales, sobre la hipófisis o el hipotálamo. Concentraciones elevadas de esos productos inhiben la liberación de las gonadotrofinas. Al parecer, las hormonas esteroídes efectuan éste efecto debido a que estimulan a un grupo de proteasas, presentes en la hipófisis y en el hipotálamo, que degradan tanto a la hormona liberadora como a las gonadotrofinas.

Existe otra sustancia, esta de orígen proteíco, la "inhibina" que al parecer es sintetizada tanto en las células de la granulosa como en las células de Sertoli. La inhibina probablemente actuá en la hipófisis y en el hipotálamo, impidiendo esencialmente, la secreción de la FSH. Sin embargo, aún no se sabe con precisión su mecanismo de acción.

Otro tipo de regulación de asa larga, es efectuada por la

hCG presente sólo en casos de embarazo, la cual impide la liberación de las gonadotrofinas para que no se lleve a cabo la maduración de nuevos folículos.

El mecanismo de las asas cortas se ejerce en todos los tejidos a través de un control por la concentración de las hormonas circulantes de tal forma que un exceso de la hormona producida, puede afectar su propia síntesis.

Un ejemplo de la aplicación práctica de los conocimientos recopilados en este trabajo, sería el intento de producir una vacuna contra la hCG, hormona que sólo es producida en los casos de embarazo. No obstante, el hecho de que Chen y colaboradores [235] hubiesen encontrado en la orina de mujeres no embarazadas y sin coriocarcinoma, una sustancia que da reacción con los anticuerpos específicos para la subunidad β de la hCG, muestra los riesgos que son necesarios salvar, en la aplicación de cualquier método para controlar la fertilidad.

Es tan importante, en los momentos actuales el control del aumento de la población que los organismos mundiales responsables de la salud apoyan fuertemente los trabajos de investigación que permiten conocer el control de la fertilidad.

Esperamos que éste trabajo despierte muchas inquietudes y sirva de base a estudios futuros.

BIBLIOGRAFIA.

1. Meadows, D.H., Meadows, D., Randers, J. y Behrens, W.W.: Los límites del crecimiento. 2a.reimp. Fondo de Cultura Economica.México,1975.
2. Odum, E.P.: Ecología. 2a. ed. Compañia Editorial Continental,S.A. México, 1979.
3. *Bernard, C.: Lecons de physiologie experimentelle. París, 1854.
4. Bayliss, W. M. and Starling, E. H.: The mechanism of pancreatic secretion. J. Physiol 28, 325-353. 1902.
5. Smith, P. E.: Hastening development of female genital system by daily homoplastic pituitary transplants. Proc. Soc. Exp. Biol.Med 24. 131- 132. 1926.
6. *Zondek, B.: Z. Geburst u Gynäk. 90. 372. 1926.
7. Fevold, H. L., Hisaw, F. L. and Leonard, S. L.: The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophesis. Am. J. Physiol. 97. 291-301. 1931.
8. *Aschheim, S. and Zondek, B.Klin Wochschr 6, 1322. 1927.
9. Li, C. H., Simpson, M. E. and Evans, H. M.: Purification of the pituitary interstitial cells stimulating hormone. Science. 92, 355-356 . 1940.
10. Shedlovsky, T., Rothen, A., Greep, R. V., Van Dyke,H. B. and Chow, B. F.: The isolation in pure form of the interstitial Cell-Stimulating (luteinizing) hormone of the anterior lobe of the pituitary gland. Science. 92. 178- 180 . 1940.

* Referencias tomadas del libro de: Marenzi Agustín.: Hormonas. Ed. El Ateneo. Argentina, 1957 .

11. Fevold,H.L., Lee,M.,Hisaw,F.L. and Cohn,E.J.: Studies in the physical chemistry of the anterior pituitary hormones.Endocrinology 26. 999-1004. 1940.

12. Greep,R.O.,Van Dyke,H.B. and Chow,B.F.: Separation in nearly pure form of luteinizing (Interstitial Cell-Stimulating) and follicle -stimulating (Gametogonic) hormones of the pituitary gland. J. Biol. Chem. 133. 289-290, 1940

13. Li, C.H., Simpson,M.E. and Evans, H.M.: Isolation of pituitary follicle-stimulating hormone (FSH). Science 109: 445-446, 1949.

14. Gurin,S., Bachmam,C. and Wilson,D.W.: The gonadotropic hormone of urine of pregnancy. I A simple method of extraction and purification. J. Biol. Chem. 128: 525-536, 1939.

15. Katzman,P.A., Godfrid, M., Chain,C.K. and Doisy,E.A.: The preparation of chorionic gonadotropin by chromatographic adsorption. J. Biol. Chem. 148. 501-507, 1943.

16. White,A., Handler,P., Smith,E.L., Hill,R.L. and Lehman,I.R.: Principles of biochemistry. 5th. ed.Mc. Graw Hill Book Co. 1973.

17. Schreiber, V.;Adenohypophysial Hormones: Regulation of their secretion and mechanisms of their action In: Biochemistry of Hormones, Vol.8, H.V. Rickenberg,ed.,chapter 3. MTP International review of science, 1971.

18. Barnes, B.G: Ciliated secretory cells in the pars distalis of the mouse hypophysis. J.Ultrastructure Res. 5: 453-467, 1961.

19. Herlant,M: The cells of adenohypophysis and their functional significance. Int.Rev.Cytol. 17: 299,1964.

20. *Romeis,B: In:Handbuch der mikroskopischen anatomie des menschen, Vol,6, W.Möllendorff,ed. pp 117.Julius Springer,Berlin,1940.

21. Barnes,B:Electron microscope on the secretory cytology of the mouse anterior pituitary. Endocrinology 71:618-628,1962

22. Hartley,M.W., W.H.Mc Shan. and H.Ris: Isolation of cytoplasmic pituitary granules with gonadotropic activity. J.Biophysic. Biochem. Cytol. 7: 209-218,1960.

23. Hellbaum,A.A.,L.G.Mc Arthur, P.J. Campbell and J.C. Finerty: The physiological fractionation of pituitary gonadotropic factors correlated with cytological changes. Endocrinology 68: 144-153, 1961.

24. Nakane,P.K: Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzime histochemistry 18: 9-20, 1970.

25. *Kurosumi,K: Funtional classification of cell types of the anterior pituitary gland accomplished by electron microscopy. Arch. Histol. Jap. 29: 329,1968.

26. Phifer,R.F., A.R.Midgley and S.S.Spicer:Immunohistologie and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell type in the humans pars distalis. J. Clin. Endocr. Metab. 36: 125-141,1973.

27. Moriarty,G.C: Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones. J. Histochem. Cytochem. 24: 846-863, 1976.

28,29. Ward,D.N., M. Adams-Mayne, N.Ray, D.E. Balke, J. Coffey and M. Showalter: Comparative studies of luteinizing hormone from beef,pork, and sheep pituitaries.I Purification and physical properties. Gen. Comp. Endroc. 8: 44-53, 1967

30. Lamkin, W.M., M. Fujino, J.D. Mayfield, G.N. Holcomb and D.N. Ward: Separation of the subunits of ovine luteinizing hormone by a chromatographic procedure and comparason with a countercurrent distribution procedure. Biochim. Biophys. Acta 214: 290-298, 1970.

* Referencia tomada de Nakane [24].

31. Reichert,L.Jr., M.A. Rasco, D.N. Ward, G.D. Niswender and R, Midgley: Isolation and properties of subunits of bovine pituitary luteinizing hormone. J. Biol. Chem. 244: 5110-5117,1969.

32. Hartree,A.S., M, Thomas, M. Braikevitch, E.T. Bell, D.W. Christie, G.V. Spaull, R. Taylor and G.J. Pierce: Preparation and properties of subunitis of human luteinizing hormone. J.Endrocr. 51: 169-180, 1971.

33. Papkoff,H., M.R. Sairam, and C.H. Li: Aminoacid sequence of the sub units of ovine pituitary interstitial cell-stimulating hormone. J. Am. Chem. Soc. 93: 1531-1532, 1971.

34. Liu, W.K., H.S. Nahm, C.M. Sweeney, W.M. Lanakin, H.N. Baker and D. N. Ward: The primary amino acid sequence of the ovine luteinizing hormone. I The amino acid sequence of the reduced ans S-amino ethy lated S-subunit (LH-α). J. Biol. Chem.247: 4351-4364, 1972.

35. Sairam,M.R., H. Papkoff and C.H. Li: Human pituitary interstitial cell stimulating hormone. Primary structure of the subunit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 530-537, 1972.

36. Bishop, W.H., A. Nureddin and R.J. Ryan: Pituitary luteinizing and and follicle-stimulating hormones. In: Peptide Hormones, J.A. Parsoms, ed. pp 273-299. University Park Press, Ltd, London, 1976.

37. Carlsen, R.B., O.P. Bahl and N. Swaminathan: Human chorionic gonado pin. Linear amino acid sequence of the β- subunit. J.Biol.Chem, 248: 6810-6827, 1973.

38. Sairam, H., H.Papkoff and C.H. Li:Reaction of ovine interstitial cell stimulating-hormone with tetranitromethane. Biochem.Biophys. Acta 278: 421-432, 1972.

39. Cheng,K.W.,and J.G.Pierce:The reaction of tetranitromethane with pituitary, luteinizing and thyroid-stimulating hormones.

J. Biol. Chem. 247: 7163-7172, 1972.

40. Li,W.K., K.P.Yang, B.D.Burleigh and D.N.Ward: In: Hormone Binding and Target Cell Activation in Testis, A.R.Means and M.Dufau eds. pp. 89. Plenum Press, New York, 1974. Tomada de Bishop et al.[36].

41. Mori,K.F: Antigenic structure of human gonadotrophins: pituitary luteinizing hormone. J. Endocr. 46:517-525, 1970.

42. Van Hall, E.V., J.L.Vaitukaitis, G.T.Ross, J.W.Hickman and G.Ashwell: Immunological and biological activity of HCG following progressive desialylation. Endocrinology 88: 456-464, 1971.

43. Braunstein,G.D., L.E.Reichert, E.V. Van Hall, J.L.Vaitukaitis and G.T.Ross: The effects of desialylation on the biologic and immunologic activity of human pituitary luteinizing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun 42: 962-967, 1971.

44. Morell,A.G., G.Gregoriadis, H.Scheinberg, J.Hickman and G.Ashwell: The role of sialic acid in determining the survival of glicoproteins in the circulation. J. Biol. Chem. 246: 1461-1467, 1971.

45. Mori, K.F: Immunologic reaction between human luteinizing hormone and antiserum to urinary luteinizing hormone. Endocr. 82: 945-953, 1968.

46. Inagami,T., K.Murakama, D.Puett, A.S.Hartree and A.Nureddin: N-terminal aminoacid sequence of the α-subunit of human pituitary luteinizing hormone. Biochem. J. 126: 441-442, 1972.

47. Sairam, M.R., H.Papkoff and C.H.Li: Human pituitary interstitial c cell stimulating hormone: primary structure of the α-subunit. Biochem. Biophys. Res. Commun 48: 530-537, 1972.

48. Ward,D.N., L.E.Reichert, W.K.Liu, H.S.Nahm, J.Hsia, W.M.Lamkin and N.S.Jones: Chemical studies of luteinizing hormone from human and ovine pituitaries. Recent Prog. Horm. Res. 29: 533-561, 1973.

49. Shome,B. and A.F.Parlow: The primary structure of the hormone-specific, beta subunit of human luteinizing hormone (hLH).
J. Clin. Endocr. Metab. 36: 618-621, 1973.

50. Sairam, M.R. and C.H.Li: Inter. Res. Comm. Syst., Biochem. Hormones (73-11), 3-5-17, Nov. 1973. Tomada de Bishop[36].

51. Closset, J. and G.Hennen: Human luteinizing hormone. The aminoacid sequence of the β-subunit. F.E.B.S. Letters 29: 97-100, 1973.

52. Shome,B and A.F.Parlow: Human follicle stimulating hormone: First proposal for the aminoacid sequence of the α subunit and first demostration of its identity with the α subunit of hLH (hLH).
J. Clin. Endocr. Metab. 39: 199-202, 1974.

52a. Shome,B and A.F.Parlow: First proposal for the aminoacid sequence of the hormone-specific, β subunit (hFSH β).
J. Clin. Endocr. Metab. 39: 203-205, 1974.

53. Rathnam,P. and B.B.Saxena: Primary amino acid sequence of follicle estimulating hormone in human pituitary glands α subunit.
J. Biol. Chem. 250: 6735-6746, 1975.

54. Saxena,B.B. and P.Rathnam: Amino acid sequence of the β subunit of follicle-stimulating hormone fron human pituitary glands.
J. Biol. Chem. 251: 993-1005, 1976.

55. Bahl, O.P., R.B.Carlsen, R.Bellisario and N.Swaminathan: Human chorionic gonadotropin: Amino acid sequence of the α and β subunits.
Biochem. Biophys. Res. Commun 48: 416-422, 1972.

56. Bellisario,R., R.Carlsen and O.P.Bahl: Human chorionic gonadotropin (linear amino acid sequence of the α subunit).
J. Biol. Chem. 248: 6796-6809, 1973.

57. Carlsen,R., O.P.Bahl and N.Swaminathan: Human chorionic gonadotropin.Linear aminoacid sequence of the subunit. J. Biol.Chem. 248: 6810-6827,1973.

58. Morgan, F.J., S.Birken and R.E.Canfield: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The α subunit and β subunit. J. Biol. Chem. 250: 5247-5258, 1975.

59. Birken, S. and R.E.Canfield: Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the β subunit of human chorionic gonadotropin. J.Biol. Chem. 252: 5386-5392, 1977.

60. Keutmann,H.T. and R.M. William: Human chorionic gonadotropin.Amino acid sequence of the hormone-specific COOH-terminal region. J. Biol. Chem. 252: 5393-5397, 1977.

61. Kathan,R.H.,L.E.Jr. Reichert and R.J. Ryan: Comparison of the carbohydrate and aminoacid composition of bovine, ovine and human luteinizing hormone. Endocrinology 81: 45-48, 1967.

62. Papkoff,H., L.Mahlmann and C.H.Li: Some chemical and physical properties of human pituitary follicle-stimulating hormone. Biochem (Wash) 6: 3976-3982, 1967.

63. Bahl, O.P: Human chorionic gonadotropin. I Purification and physicochemical properties. J. Biol. Chem. 244: 567-574, 1969.

64. Li,C.H: Nat. Cancer Inst., Monogr. 12:181, 1963. Referencia tomada de Ward et al. 48/.

65. Shome,B., D.M.Brown, S.M.Howard and S.G.Pierce: Bovine, human and porcine thyrotropins:Molecular weights,amino-carboxyl-terminal studies. Arch. Biochem. Biophys. 126: 456-468, 1968.

66. Rathnam, P. and B.B.Saxena: Isolation and physicochemical characterization of luteinizing hormone from human pituitary glands. J. Biol. Chem. 245: 3725-3731, 1970.

67. Rathnam,P. and B.B.Saxena: Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands.

J. Biol. Chem. 246: 7087-7094, 1971.

68. Closset,J.,G.Hennen. and R.Lequin: F.E.B.S.Letters. 21: 325,1972. Referencia tomada de Ward et al. 48/.

69. Reichert, L.E., R.H.Kathan. and R.J.Ryan: Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle-stimulating hormone. Endocr. 82: 109-114, 1968.

70. Roos,P: Human follicle-stimulating hormone. Acta Endocr.(Kbh) 59: Suppl. 131. 51,1968.

71. Baker,S.A., C.J.Gray and W.R. Butt: Evaluation of human follicle-stimulating hormone preparations. J.Endocr. 45: 275-285, 1969.

72. Saxena,B.B. and P.Rathnam: Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle stimulating hormone from human pituitary glands, J. Biol. Chem. 246: 3549-3554, 1971.

73. Reichert,L. and D.N. Ward: On the isolation and characterization of the alpha and beta subunits of human pituitary follicle-stimulating hormone. Endocr. 94: 655-664, 1974.

74. Goverde,B.C.,F.J.N. Veenkamp and J.D.H.Homan: Studies on human chorionic gonadotrophin.II Chemical composition and its relation to biological activity. Acta Endocr. (Kbh) 59: 105-119, 1968

75. Bell,J.J.,R.E.Canfield and J.J.Sciarra: Purification and characterization of human chorionic gonadotropin. Endocr. 84: 298-307, 1969.

76. Mori,K.F:Antigenic sturcture of human gonadotropins: Importance of protein moiety to the antigenic structure of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 86: 97-106, 1970.

77. Swaminathan, and O.P.Bahl: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. Biochem. Biophys. Res. Commun 40: 422-427, 1970.

78. Morgan, E. and R.E.Canfield: Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. Endocrinology 88: 1045-1053, 1971.

79. Li,C.H. and B.Starman: Molecular weigth of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone. Nature 202: 291-292, 1964.

80. Ward,D.N., M.Fujino and W.M.Lamkin: Evidence for two carbohydrate moieties in ovine luteinizing hormone. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 25: 349, 1966.

81. Papkoff,H. and T.S. Samy: Isolation and characterization of the polypeptide chains of ovine interstitial cell-stimulating hormone. Biochem. Biophys, Acta 147: 175-177, 1967.

82. Papkoff,H. and A.Sammy: Further studies on the subunits of bovine ICSH (LH). Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 27:371, 1968.

83. De la Llosa,P. and M.Jutisz: Reversible dissociation into subunits and biological activity of ovine luteinizing hormone. Biochem. Biophys. Acta 181: 426-436, 1969.

84. Shome,B., D.N.Brown., S.M.Howard and J.G.Pierce: Bovine,human and porcine thyrotropins: Molecular weights, aminoacid carboxyl terminal studies. Arch. Biochem. Biophys. 126: 456-468, 1968.

85. Shome,B., T.H.Liao, S.M.Howard and J.G.Pierce: The primary structure of bovine thyrotropin. J.Biol. Chem. 246: 833-849, 1971.

86. Pierce,J.G., O.P.Bahl, J.S.Cornell and N.Swaminathan: Biologically active hormones prepared by recombination of the α chain of human chorionic gonadotropin and the hormone-specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone. J.Biol. Chem.246: 2321-2324, 1971.

87. Jirgensons,B. and D.N.Ward: Circular dichroism of ovine luteinizing hormone and its subunits. Texas Rep.Biol.Med. 28:553-559, 1970.

88. Bewley,T, M.R.Sairam and C.H.Li: Circular dichroism of ovine inters

titial cell stimulating hormone and its subunits. Biochemistry 11: 932-936, 1972.

89. Merz,W.E., V.Hilgenfeldt, P.Brockerhoff and R.Brossmer: The time course of recombination of human chorionic gonadotropin subunits studied with immunological methods, circular dichroic measurements and bioassay. Eur. J.Biochem. 35: 297-306, 1973.

90. Bishop,W.H. and R.J.Ryan: Human luteinizing hormone and its subunits. Physical and chemical characterization. Bichemistry 12:3076-3084,1973.

91. Bewley, T.A. and M.R.Sairam: The kinetics of dissociation and reassociation of ovine pituitary interstitial cell-stimulating hormone (ICSH). Arch. Bichem. Biophys.163: 625-633, 1974.

92. Merz?W.E: Studies on the individual role of the subunits for properties of choriogonadotropin. Acta Endocr.(Kbh) 91:Suppl.225.133,1979

93. Daniels-Mc Queen, S., D.Mc Williams,S.Birken, R.Canfield,T.Landerfeld and I.Boimet: Identification of mRNAs encoding the α and β subunits of human choriogonadotropin. J.Biol. Chem. 253:7109-7114,1978.

94. Berson,S.A. and R.S.Yalow: Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. J.Clin. Endocr.Metab. 28: 1037-1047, 1968.

95. Steiner,D.F., D.Cummingham, L.Spigelman and B.Aten: Insulin biosynthesis: evidence ofra precursor. Science 157:697-700, 1968

96. Rubenstein?A.H.,S.Cho and D.F.Steiner: Evidence for pro-insulin in human urine and serum. Lancet 1: 1353-1355, 1968.

97. Roth,J., P.Gorden and I.Pastan: Big insulin: a new componenent of plasma insulin detected by immunoassay. Proc.Natl.Acad. Sci. USA 61: 138-145, 1968.

98. Bogdanove,E.M., J.M.Nolin and G.T.Campbell: Qualitative and quantitative gonad pituitary feedback. Rec.Progr. Horm.Res. 31:567-626,1975.

99. Reichert,L.E.Jr. and A.R.Midgley: In: Gonadotropins, E.Rosemberg,ed. Geron-X, Inc., Los altos,California, pp25, 1968.

100. Ryan,R.J: Stokes radius of human pituitary hormones and demostration of dissociation of luteinizing hormone. Biochem. 8:495-500,1969.

101. Peckham,W.D. and A.F.Parlow: Isolation from human pituitary glands of three discrete electrophoretic componentes with high luteinizing hormone activity. Endocrinology 85:618-622, 1969.

102. Mureddin,A., A.S.Hartree and P.Johnson: In: International Symposium on Gonadotropins, , J.Wiley and sons,ed. pp. 167-173,New York, 1971.

103. Rabinowitz.D., R.Benveniste and J.Bell: In: Heterogeneity of polypeptide Hormones, D.Rabinowitz,ed. New York, Acad. Press, 1974.

104. Loeber,J.G. and R.M.Lequin: Pleomorphism of human pituitary luteinizong hormone. Acta Endocr.(Kbh) Suppl.199. 191,1975.

105. Qazi,M.H, P.Romani and E.Diczfalusy: Discrepancies in plasma LH activities as measured by radioimmunoassay and an "in vitro" bioassay. Acta Endocr. (Kbh) 77: 672-685, 1974.

106. Roberston, D.M., M.P. Van Damme and E.Diczfalusy: The resolution of different biologically and immunologically active LH species present in human plasma by gel filtration and isoelectric focusing. Acta Endocr.(Kbh) Suppl. 199. 190, 1975.

107. Leinderberg,F.A., D.Graesslin, V.Lichtenberg, D.Glesmann, N.Hess, P.J.Czygan and G.Bettendorf: Existence of big and little forms of luteinizing hormone in human serum. Acta Endocr. 83: 466-482,1976.

108. Graesslin,D., H.Weiss and Bettendorf: In: Gonadotropins,B.B.Saxena, ed. Wiley and sons, New York, pp.159, 1972.

109. Leinderberg,F.A., D.Graesslin, H.J.Scheel, N.Hess, V.Lichtenberg and G.Bettendorf: A low molecular weight substance obtained from serum which has luteinizing hormone like activity (mini LH). J. Clin. Endocr. Metab. 43: 1410-1413, 1976.

109a,b. Nathanson,J.A. and P.Greengard:Second messengers in the brain. Scientific American 237: 108-119, 1977.

110. Goldberg,N.D., R.F.O'Dea and M.K.Haddox: Cyclic GMP. Adv. Cyclic Nucl. Res. 3: 155-213, 1973.

111.*Schwyzer,R. Ergebn. Physiol. 53: 1; 1963.

112.*Schwzer,R. In: Protein and Polypeptide Hormones,M.Margoulies,ed. Excerpta Med. (Amst), 201, 1968.

113. Davoren,P.K and P.W.Sutherland: The cellular location od adenyl ciclase in the pigeon erythrocyte. J. Biol. Chem.238:3016-3023,1963.

114. Rasmussen,H: Cell comunication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. Science 170: 404-412, 1970.

115. Kuo,J.F. and P.Greengard: Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64: 1349-1355, 1969.

116. Kish,V.M. and L.J.Meinsmith: Nuclear protein kinases:Evidence for their heterogeneity, tissue specifity, substrates specifities and diferential responses to cyclic adenosine 3',5' monophosphate. J. Biol. Chem. 249: 750-760, 1974.

117. Korenman, S.G., R.C.Bhalla, B.M.Sanborn and R.H.Stevens:Protein kinase translocation as an early event in the hormonal control of uterine contraction. Science 183: 430-432, 1974.

118. Jungmann,R.A., P.C.Hiestand and J.S.Schwende: Mechanism of action of gonadotropin. J. Biol. Chem. 249: 5444-5451, 1974.

119. Catt,K.J., M.L.Dufau and T.Tsuruhara: Studies on a radioligand receptor assay sistem for luteinizing hormone and chorionic gona -

* Referencias tomadas de Hechter,O. and A. Calek, Jr.:Principles of hormone action: The problem of molecular linguistics. Acta Endocrinologica 77: Suppl. 191: 39-64, 1974.

dotropin. J.Clin. Endocr. 32: 860-863, 1971.

120. Schwartz,S., J.Bell, R.Rechnitz and D.Rabinowitz: Binding of human FSH and its subunits to rat testis. Eur.J. Clin.Invest. 3:475-481,1973.

121. Lee, C.Y. and R.J.Ryan: Luteinizing hormone receptors. Specific binding of human luteinizing hormone to homogenates of luteinized rat ovaries. ProcNatl.Acad.Sci. 69:3520-3523, 1972.

122. Bhalla,V.K. and L.E.Reichert: Properties of follicle-stimulating hormone receptor interactions. J.Biol. Chem. 249: 43-51, 1974.

123. Holmgren,J., I.Lonnroth and A.MSvennerholm: Tissue receptor for cholera exotoxin:Postuled strucure from suties with G_{M1} ganglioside and related glycolipids. J. Infect. Immunol.8: 208-214, 1972.

124. Levey, G.S., M.A.Fletcher and L.Klein: Glucagon and adenylate cyclase:Binding studies and requerimentes for activation. In: Advances in Cyclic Nucleotide Research,Vol. 5, G.J.Drummond, P.Greengard and G.ARobison.pp. 53-65. Raven Press, New York, 1975.

125. Dufau,M.L., D.W.Ryan, A.J.Baukal and K.Catt: Gonadotropin receptors Solubilization and purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 250: 4822-4824, 1975.

126. Azhar,S. and L.M.Jayaram: Gonadotropin receptors in plasma membranes of bovine corpus luteum. J. Biol. Chem 251: 7398-7412, 1976.

127. Catt,K. and M.L.Dufau: Spare gonadotropin receptors in rat testis. Nature (New Biology) 244: 219-221, 1973.

128. Ryan.R.J. and C.Y.Lee: The role of membrane bound receptors. Biol. of Reprod. 14: 16-29, 1976.

129. Robison, G.A., R.W.Butcher and E.W.Sutherland: Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann.N.Y. Acad. Sci. 139:703-723, 1967.

130. Birnbaumer,L., S.L.Pohl, M.L.Kraus and M.Rodbell: The action of hormones on the adenyl cyclase system. Adv. Biochem. Psychopharm.

3: 185-208, 1970. Referencia tomada de Ryan and Lee 128.

131. Perkins,J.P: Adenyl cylcase. In: Advances in Cyclic Nucleotide Res. Vol.3. P.Greengard and G.A.Robison,eds. Raven Press, New York, 1973

132. Cuatrecasas,P: Membrane receptors. Ann.Rev.Biochem. 43: 169-214,1974.

133. Rodbell, M., M.C.Lin, Y.Salomon, C.Londos, J.P.Harwood, B.R.Martin, M.Rendell and M.Berman: Role of adenine and guanine nucleotides in the activity and response of adenylate cyclase systems to hormones. Evidence for multisite transition states. Adv. Cyclic Nuc. Res. 5: 3-29, 1975.

134. Londos,C., Y.Salomon, M.C.Lin, L.P.Harwood, M.Rodbell, M.Scharam and J.Wolf:5'-Guanytytinidodiphosphate, a potent activator of adenyl cyclase systems in eucaryotic cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 71: 3087-3090, 1974.

135. Swilocki,N.I. and J.Tierney: Activation of solubilized liver membrane adenylate cyclase by guanyl nucleotides. Arch. Biochem.Biophys. 168: 445-462, 1975.

136. Haynes,R.C.Jr., E.W.Sutherland and T.W.Rall: The role of cyclic adenylic acid in hormone action. Rec. Prog. Horm. Res. 16:121-138,1960.

137. Marsh, J.M., R.W.Bucher, K.Savard and E.W.Sutherland: Stimulatory effect of LH on adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in corpus luteum slices. J.Biol. Chem. 241: 5436-5440, 1966.

138. Le Maire,W.J., H.Askari and K.Savard:Steroid hormone formation in the human ovary VII. Steroids 17: 65-84, 1971.

139. Marsh,J: The role of cyclic AMO in gonadal function. Adv. Cyclic Nucl. Res. 5: 137-199, 1975.

140. Beall,R.J. and G.Sayers: Isolated adrenal cells: Steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in response to ACTH. Arch. Biochem. Biophys. 148: 70-76, 1972.

140a. Catt,K.J. and M.L.Dufau: Basic Concepts of the mechanism of action of peptide hormones. Biol. Reproduc. 14: 1-15, 1976.

141. Krebs,E.G: Protein kinase. Curr. Top, Cell Regul.5: 99-133, 1972.

142. Langan,T.A: Protein kinase and protein kinase substrates. Adv. Cyclic Nucl. Res. Vol. 3, 1973.

143. Langan,T.A:Cyclic AMP and histone phosphorylation. Ann. N.Y. Sci. 185: 166-180, 1971.

144. Ruddon,R.W. ans S.Anderson: Presence of multiple protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun 46: 1499-1508, 1972.

145. Jungmann,R.A. and J.S.Schwerpe:Mechanism of action Endocr.94: 168 -183, 1974.

146. Garren,L., G.N.Gill, H.Masui and G.Walton: On the mechanism of action of ACTH. Rec. Prog. Horm. Res. 27: 433-478, 1971.

147. Barden,N. and F.Labrie:Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate deven dent phosphorylation of ribosomal proteins from bovine anterior. pituitary gland. Biochem. 12: 3096-3102, 1973.

148. Johnson, E.M., T.Neda, H.Maeno and P.Greengard: Adenosine 3',5'- monophosphate dependent phosphorilation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. J. Biol. Chem. 247: 5650 - 5652, 1972.

149. Schlatz,L. and G.V.Marinetti: Protein kinase mediated phosphoryla tion of the rat liver plasma membrane. Biochem.Biophys,Res.Com.45: 51-56, 1971.

150. Rubin,C.S., J.Erlichman and O.M.Rosen: Cyclic adenosine 3',5'-mo nophosphate dependent protein kinase of human erythrocite membra nes. J. Biol. Chem. 247: 6135-6139, 1972.

151. Krause,E.G., H.Will, B.Schvine and A.Wollenberger:Cyclic AMP-enhan ced protein phosphorylation and calcium binding in a cell-membra ne-enriched fraction from myocardium. Adv. Cyclic Nucl. Res. 5:

473-490, 1975.

152. Greengard,P. and J.W.Kebabian: Role of cyclic AMP in synaptic transmition in the mammalian peripheraal nervous system. Fed.Proc,33: 1059-1067, 1974.

153. Eshkol,A. and B.Lunenfeld: Gonadotropic regulation of ovarian development in mice during infancy. In: Gonadotropins, B.B.Saxena, C.G. Beling and H.M.Gandy,eds. John Wiley and Sons,Inc. pp.335-346,1972.

154. Peters,H: The development of the mouse ovary from bith to puberty. Acta Endocr. (Kbh) 62: 98-116, 1969.

155. Midgley,A.R.Jr., A.J.Zeleznik, J.S.Richards and S.S.Han: Gonadotropin and estradiol receptors and follicular development. In: Advances in Fertility Regulation Through Basic Research, W.A.Sadler and S.Segal,eds. 1974. Referencia tomada de Richards et al. 156.

156. Richards,J.S. and A.R.Midgley: Protein Hormone Action: A key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. Biol. of Reprod. 14: 82-94, 1976.

157. Zeleznick,A.J., A.R.Midgley and L.E.Reichert:Granulosa cell maturation in the rat:increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. Endocrinology 95: 818-825, 1974.

158. Goldenberg,R.L, F.O.Reiter and G.T.Ross: Follicle response to exogenous gonadotropins: an estrogen-mediated phenomenon. Fert. Steril. 24: 121-125, 1973.

159. O' Malley,B.W., G.C.Rosenfeld, J.P.Comstock and A.R.Means:Induction of specific translatable messenger RNA's by oestrogen and progesterona. In:5th. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology:Gene transcription in reproductive tissues,pp. 381-395, E.Dizfalusy, ed. Karolinska Inst. Stockholm,Sweden,1972.

160. Ryan,K.J., Z.Petro,and J.Kaiser:Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. J.Clin.Endocr. 28: 355-358, 1968.

161. Makris,A. and K.J.Ryan:Progesterone,androstendione,testosterone,estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. Endocrinology 96: 694-701, 1975.

162. Moon,Y.S., J.H.Dorrington and D.T.Armstrong:Regulation of ovarian estradiol-17 synthesis by FSH and testosterone.8th. Annual meeting of the Society for the study of Reproduction.108, 1975.

163. Armstron,D.T: Augmentation of follicle-stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells by androgens. Acta Endocr.(Kbh) 91:Suppl. 225.157,1979.

164. Morishige,W.K. and I.Rothchild:Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone,prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy inthe rat. Endocrinology 95: 260-274, 1974.

165. Richards,J.S: Content of nuclear estradiol receptor complex in rat corpora lutea during pregnancy:relationship to estrogen concentrations and cytosol receptor availability. Endocr. 96: 227-230,1975.

166. Gibori,G., E.Antezak and I.Rothchild:Direct luteotropic effect of estrogen in the rat. Fed.Proc.34: 363, 1975.

167. Harris,G.W: The induction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism. Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 122: 374-394, 1937.

168. Harris,G.W: Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohypophysis. J.Physiol (London) 107: 418-429, 1948.

169. Hinsey,J.C. and J.E.Markee: Pregnancy following bilateral section

of the cervical aympathetic trunks in the rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 31: 270-271, 1933.

170.*Marshall,F.H.A. Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B226:423,1936.

171.*Popa, G. and V.Fielding. J. Anat. 65: 88, 1930.

172. Green,J and G.W.Harris:The neurovascular link between the neuro hypophysis and adenohypophysis. J. Endocr.5:136-146, 1947.

173.*Bargman,W.Z.: Zellforsch. Mikrosk. Anat. 34: 610, 1949.

174. Scharrer,E. and B.Scharrer: Hormones produced by neurosecretory cells. Rec. Progr. Horm. Res. 10: 183-240, 1954.

175. Mc Cann,S.M., S.Taleisnik and H.M.Friedman: LH-Releasing activity in hypothalamic extracts. Proc.Soc.Exp.Biol.Med.104:432-434-1960.

176. Campbell,H.J., G.Feuer, J.Carcia and G.W.Harris:The infusion of the brain extracts into the anterior pituitary gland and the see cretion of gonadotrophic hormone. J.Physiol.157:30P-31P, 1961.

177. Nikitovich-Winer,M.B:Induction of ovulation in rats by direct in trapituitary infusion of median eminence extracts.Endocr.70:350,1962.

178. Schally,A.V., J.Meites,C.Y.Bowers and A.Rather:Identity of prolac tin inhibiting factor(PIF) and luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 117:252-254, 1964.

179. Campbell,H.J., G.Feuer and G.W.Harris:The effect of intrapituitary infusion of median emeinence and other brain extracts on anterior pituitary gonadotrophic secretion.J.Physiol.170:474-486,1964.

180. Endroczi,E. and J.Hilliard:Luteinizing hormone releasing activity in different parts of rabbit and dog brain.Endocr.77:667-673,1965.

181. Schally,A.V., C.Y.Bowers, F.W.White and A.I.Cohen:Purification and in vivo and invvitro studies with porcine luteinizing hormone-re leasing factor (LRF). Endocr. 81: 77-87, 1967.

* Tomadas de Schally,A.V.;FSH-releasing and LH-releasing. Vit. Hor mones 30: 83-164, 1972.

182. McCann,S.M. and D.V.Rámirez: The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion. Rec.Horm.Res.20:131-181,1964.

183. Schally,A.V., Y.Baba, T.W.Redding and W.F.White: Evidende for peptide nature of LH and FSH-realising hormones. Biochem.Biophys. Res. Commun 42: 50-56, 1971.

184. Schally,A.V., Y.Baba, T.W.Redding, H.Matsuo and A.Arimura: Further studies on the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic FSH-RH. Neuroendocr. 8:347-358, 1971.

185. Schally,A.V., Y.Baba and T.W.Redding: Studies on the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic follicle-stimulating hormone releasing hormone. Neuroendocr.8: 70-80, 1971.

186. Matsuo.H., Y.Baba, R.Nair, A.Arimura and A.V.Schally: Structure of the porcine Lh- and FSH*releasing hormone I.The proposed amino acid sequence. Biocme. Biophys. Res, Commun 43: 1334-1339, 1971.

187. Baba,A.Y., H.Matsuo and A.V.Schally: Structure of the porcine LH* and FSH-releasing hormone II.Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. Biochem. Biophys.Res.Commun 44: 459-463, 1971.

188. Samli,M.H. and I.Geschwind: I Some effects of energy-transfer inhibitors and of Ca^{++}free or K^{+}enhanced media on the release of luteinizing hormone (LH) from the rat pituitary gland in vitro. Endocrinology 82: 225-230, 1968.

189. Jutisz,M.and P.de la LLosa: Requirement of $Ca^{++}$and Mg^{++} Ions for the in vitro release of follicle-stimulating hormone from rat pituitary glands and in its subsequent biosynthesis. Endocrinology 86: 761-768, 1970.

190. Koningde,J., J.A.Van Dieten, A.M.Tijssen and G.P.Van Rees: On the formation and deactivation of a protein factor involved in LH-RH-

stimulated release of LH. Acta Endocr.(Kbh) 91:Suppl.225.144,1979.

191. Adams,T.E., T.O.Wagner, H.R.Sawyer and T.M.Nett:Gn-RH interaction with anterior pituitary II:Cyclic AMP asaan intracellular mediator in the GnRH activated gonadotroph. Biol. Reprod.21:735-747,1979.

192.*Moore,C.R. and D.T.Price: Amer. J. Anat. 50: 13, 1932.

193.*Meyer,R., E.Leonard, E.Hisaw and S.Martin:Endocr.16:655,1932.

194.*Holweg,W. and K.Junkmann. Klin. Wochenschr. 11: 32, 1932.

195. Flerko,B. and J.Szentagothai:Oestrogen sensitive nervous structures in the hypothalamus.Acta Endocr.(Kbh) 26:121-127, 1957.

196a. Davidson,J. and C.Sawyer:Evidence for an hypothalamus focus of inhibition of gonadotropin by androgen in the male.Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 107: 385-393, 1961.

196b. Davidson,J. and C.Sawyer:Effects of localized intracerebral implantation of oestrogen on reproductive function in the female rabbit. Acta Endocr. 37: 385-393, 1961.

197a. Lisk,R.D:Estrogen-sensitive centers in the hypothalamus of the rat. J. Exp. Zool. 145: 197-207, 1960.

197b. Lisk,R.D:Diencephalic placement of oestradiol and sexual receptivity in the female rat. Am. J. Physiol. 203: 493-496, 1962.

197c. Lisk,R.D:Neural localization for androgen activity of copulatory behavior in the male rat. Endocr. 80:754-761, 1967.

198. Bogdanove,E.H:Direct gonad-pituitary feedback.An analysis of effects of intracranial estrogenic depots on gonadotrophin secretion. Endocr. 73: 696-712, 1963.

199. Kanematzu,S. and C.Sawyer:Effects of hypothalamic and hypophyseal estrogen implants on pituitary gonadotrophic cells in ovariectomized rabbits. Endocr. 73: 687-695, 1963.

200. Martini,L:Recent views on the control of anterior pituitary function tion. Acta Endocr.85: Suppl. 214. 19-33, 1977.

* Schally,A.V:FSH-releasing and LH-releasing. Vit.Hormones 30:83-164,

1972.

201. Rothchild,I:Interrelations between progesterone and the ovary, pituitary and central nervous system in the control of ovulation and the regulation of progesterone secretion.Vit.Horm.23:209-327, 1965.

202. Schally,A.V., A.F.Parlow, W.H.Carter, M.Saito, C.Y.Bowers and A. Arimura:Studies on the site of action of oral contraceptives steroids. Endocr. 86: 530-541, 1970.

203. Harris,G.W. and R.M.Sherratt:The action of chlormadinone acetate (6-chloro-Δ^6-dehydro-17α-acetoxyprogesterone) upon experimentally induced ovulation in the rabbit.J.Physiol.203:59-66,1969.

204. Arimura,A. and A.V.Schally:Progesterone suppression of LH-releasing hormone-induced stimulation of LH release in rats. Endocrinology 87:653-657,1970.

205. Hilliard,J., A.V.Schally and C.H.Sawyer:Progesterone blockade of the ovulatory response to intrapituitary infusion of LH-RH in rabbits. Endocr. 88: 730-736, 1971.

206. Bogdanove,E.M. and W.L.Gay:Changes in pituitary and plasma of LH and FSH after cessation of chronic androgen treatment. Endocr.81: 930-933, 1967.

207. Santen,R.J:Its aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of LH secretion in man.J.ClinInvest.56:1555,1975.

208. Winters,S.J., J.L.Danick, D.Loriaux and R.Sherins:Studies on the role of sex steroidsin the feedback control of gonadotropin concentrations in men. J.Clin.Endocr.Metab.48:222-227, 1979.

209. Groover,P.K. and W.Odell:Correlations of in vivo and in vitro activities of same naturally ocurring androgens using a radioreceptor assay for 5α-dihydrotestosterone with rat prostate cytosol receptor protein. J. Steroid Biochem. 6: 1373, 1975.

210. Lacroix,A., T.J.Mc Kenna and D.Rabinowitz: Sex steroid modulation of gonadotropins in normal men and androgen insensitivity syndrome J. Clin. Endocr. Metab. 48: 235-240, 1979.

211. Spies,H.G. and L.R.Norman: Luteinizing hormone release and ovulation induced by the intraventricular infusion of prostaglandin E_1 into pentobarbital-blocked rats. Prostaglandins 4: 131-141, 1973.

212. Harms,P.G., S.R.Ojeda and S.M.Mc Cann: Prostaglandin-induced release of pituitary gonadotropins:Central nervous system and pituitary sites of action. Endocrinology 94: 1459-1464, 1974.

213. Clark,M.R., J.M.Marsh and W.Le Maire: Mechanism of luteinizing hormone regulation of prostaglandin synthesis in rat granulosa cells. J. Biol. Chem. 253: 7757-7761, 1978.

214. Demoulin,A., L.Koulischer, J.Hustin, M.T.Hazee-Halgelstein, M.T.Lambotte and P.Franchimont: Organ culture of mammalian testis: III Inhibin secretion. Horm. Res. (Basel) 10: 177-190, 1979.

215. Welschen,R., W.P.Hermans, J.Dullaart and F.H.de Jong:Effects of inhibin-like factor present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotrophin levels in ovariectomized rats. J.Reprod.Fertil.50: 129-131, 1977.

216. Marder,M.L., C.P.Channing and N.B.Schwartz: Suppression of serum follicle-stimulating hormone in intac and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. Endocr. 101:1639-1642, 1977.

217. Hopkinson,C.R.N., E.Daume, G.Sturm, E.Fritze, S.Kaiser and C.Hirschhauser: Inhibin-like activity of bovine ovarian extracts in male and female rats. J.Reprod. Fert. 50: 93-96, 1977.

218. Hoffman,J.C., J.R.Lorenzen, T.Weil and B.Neena:Selective suppression of the primary surge of follicle-stimulating hormone in the rat:further evidence for folliculostatin in porcine follicular fluid. Endocrinology 105: 200-203, 1979.

219. Steinberger,A. and E.Steinberger: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. Endocrinology 99:918-921,1976.

221. Lugaro,C., M.M.Castellato, G.Mazola, G.Fachini and G.Carrea: Evidence for the existence in spermatozoa of a factor inhibiting the follicle-stimulating hormone releasing hormone synthesis. Neuro.15: 62-68, 1974.

220.Peek,J.C. and W.B.Watkins: Gonadotropin-inhibiting activity in seminal plasma from intant and vasectomized bulls. J.Reprod. Fertil. 57: 281-286, 1979.

222. Steinberger,A. and E.Steinberger: Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. Endocr. 99: 918-921, 1976.

223. Erickson,G.F. and A.J.W.Hsueh: Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro. Endocrinology 103: 1960-1963, 1978.

224. Franchimont,P., A.Demoulin, M.T.Hazee-Hagelstein, J.Verstraelen-Proyard and J.P.Bourguignon: Control of gonadotrophin secretion by inhibin. Acta Endocr.(Kbh) 91: Suppl.225 469, 1979.

225. Bologne,R., A.Demoulin, J.Haustin, J.Verstraelenproyard, P.Gysen and P.Franchimont: Triated thymidine incorporation in testicular DNA of the rat-role of inhibin. C.R.Soc. Biol. 173: 654-659,1979.

226. Sandow,J., W.Heptner and E.Niemann:Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. Suppl. 227. R 64, 1973.

227. Griffiths,E.C. and K.C.Hooper: Competitive inhibition-between oxytocin and luteinizing hormone-releasing factor(LRF)for the same enzyme system in the rat hypothalamus.
Acta Endocr. (Kbh) 75: 435-442, 1974.

228. Ellis,S. and M.Perry: Pituitary arylamidases and peptidases. J. Biol. Chem. 241: 3679-3686, 1966.

229. Suszkiw,J.B. and A.S.Brecher:Brain amynoacyl arylamidase.Further purification of the soluble bovine enzyme and studies on substrate specificity and possible active-site residues.
Biochemistry 9: 4008-4017 , 1970.

230. Vanha-Perttula,T:Aminoacyl and dipeptidyl arylamidases(Aminopeptidases)of the pituitary gland as related to function.Endocr.85: 1062-1069, 1969.

231. Kuhl,H., C.Rosniatowki and H.Taubert:The regulatory function of a pituitary Lh-RH-degrading enzyme in the feedback control of gonadotrophins. Acta Endocr.86: 60-70, 1977.

232. Koch,Y. and M.Fridkin:Biodegradation of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH).Acta Endocr.91:Suppl.225.468, 1979.

233. Bauer,K., H.Knisatshek, B.Horsthemke and P.Nowak: Enzymatic degradation of neuropeptides.Acta Endocr.91:Suppl.225.422,1979.

234. Schally,A.V., A.Arimura and A.J.Kastin:Hypothalamic regulatory hormones. At least nine substances from the hypothalamus control the secretion of pituitary hormones. Science 179:341-350,1973.

234a. Gay,V.: The hypothalamus:physiology and clinical use of releasing factors. Fertil. Steril.23: 50-63, 1972.

235. Chen,H-C., G.D.Hodgen, S.Matsuura, L.J.Lin, E.Gross, L.E.Reichert Jr., S.Birken, R.E.Canfield and G.T.Ross:Evidence for a gonadotropin from non pregnant subjects that has physical, immunological, and biological similarities to human chorionic gonadotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2885-2889, 1976.