

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Radioinmunoensayo de gonadotropinas humanas y su
aplicación a la clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Raquel Fernández Durango

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5318222378

T 577.17
FER
rad

PROFESOR DR. DON ARTURO FERNANDEZ-CRUZ LIÑAN, CATEDRATICO DE
PATOLOGIA GENERAL Y PROPEDEUTICA CLINICA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA.- UNIVERSIDAD CENTRAL DE MADRID.

CERTIFICO : Que los " TRABAJOS DE EXPERIMENTACION Y CLINICOS"
que corresponden para TESIS DOCTORAL; han sidos
realizados bajo mi direcci3n en esta C3tedra por
la Licenciada en Ciencias Qu3micas:

FELISA RAQUEL FERNANDEZ DURANGO, sobre el tema :
" RADIOINMUNOENSAYO DE GONADOTROPINAS HUMANAS Y SU
APLICACION EN LA CLINICA", consider3ndola apta
para ser admitida como TESIS DOCTORAL.

Madrid, Septiembre, 1.975.

EL CATEDRATICO



R.36.467

61635749

A mis padres

y al Dr. A.L. Charro

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento, en primer lugar al Prf.A. Fernández-Cruz Liñán, Director de esta -- Tesis Doctoral, por su estímulo y ayuda. Al Prof. J. Botella-Llusía , que con su apoyo y experiencia me ha ayudado en la parte clínica de este trabajo.

Asi como a los Dres. Piquera (Dpto.de Isótopos del H.M.G.Franco), G. Morreale de Escobar, M.D.Garcia (Instituto Ramón y Cajal C.S.I.C.), y Dres. del Olmo y T.Vila (Dpto. de Isótopos . H. Clínico), por los consejos que de ellos he recibido, así como por permitirme utilizar sus equipos y material.

De una forma muy especial, a todos mis compañeros de trabajo, que dirige el Dr. A. L. Charro Salgado, : E. Bordiú, C. Jaramillo Jaramillo,J. López del Campo,A. López Maciá, J. Pérez Aznar,V. Pérez Infante,y M. Puente Cueva, sin cuya ayuda hubiese sido imposible la realización de esta Tesis.

A los Sres. Q. Sarasquete, A. Casado y F. Ormeño por su colaboración en la iconografía; a las Srtas.M.C. Salmerón, L. Bell,M. Garcia,A. Gómez de Argüello,L. Villanueva y A. Villanueva, H. van den Broucque y al Sr. J. Diez, que pacientemente me han ayudado en la mecanografía y confección de este trabajo.

Al Prof. Municio por haber accedido a presentar mi Tesis en la Facultad de Ciencias Químicas.

Así mismo doy las gracias al Patronato de Investigaciones Endocrino-Metabólicas (Fundación General Mediterránea) que ha favorecido el desarrollo de esta Tesis, tanto económica como humanamente.

Durante el periodo en que he estado elaborando este trabajo he recibido dos préstamos concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia.

I N D I C E

INTRODUCCION

	<u>Pag.</u>
I.- Radioinmunoensayo:	
I.1. Introducción histórica	2
I.2. Principios generales del Radioinmunoensayo	6
I.3. Generalización del principio del Radioinmunoensayo	13
I.4. Conceptos generales de inmunología	
I.5. Producción de anticuerpos	25
I.6. Evaluación del anticuerpo producido	30
I.7. Conceptos básicos de radioactividad	40
I.8. Marcaje o iodación de polipéptidos	42
I.9. Sistema para separar la hormona ligada al anticuerpo y la no ligada	54
I.10. Extracción y concentración de hormonas polipéptidas	62
I.11. Factores que afectan la validez de un radioinmunoensayo	67
I.12. Criterios de evaluación de una curva standard	73
I.13. Control Estadístico de un radioinmunoensayo y sistemas de automatización de los resultados	81
I.14. Diferencia entre actividad biológica e inmunológica	83
II.- Hormonas pituitarias e hipotalámicas. Caracterización bioquímica de FSH, LH y sus hormonas liberadoras:	
II.1. Generalidades	85
II.2. Analogía estructural entre las hormonas glicoproteicas: FSH, LH y HCG	86
II.3. Caracterización bioquímica de LH	87
II.4. Caracterización bioquímica de FSH	90
II.5. Hormonas hipotalámicas	93
III.- Acción de las gonadotropinas:	
III.1. Generalidades	97
III.2. Acción de FSH y LH en los ovarios	100
III.3. Acción de FSH y LH en los testículos	105

	<u>Pag.</u>
IV.- Receptores gonadales:	
IV.1. Receptores	108
V.- Control de la secreción de FSH y LH:	
V.1. Mecanismos de Feedback	110
V.2. Control de la secreción de FSH y LH en muje- res	111
V.3. Control de la secreción de FSH y LH en hom-- bres	117
V.4. Influencia de las Catecolaminas en la secre- ción de las Gonadotropinas	120
V.5. Pubertad	122
V.6. Menopausia	124
VI.- Aplicación en la Clínica Humana de la determinación- de gonadotropinas por R.I.A.	125-1
<u>OBJETO</u>	126
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
I.- Radioinmunoensayo de FSH y LH por el método de -- N.I.H. (National Institute of Health):	
I.1. Iodación o marcaje de FSH y LH	131
I.2. Titulación de anticuerpos	141
I.3. Preparación de la curva standard o patrón ..	143
I.4. Forma experimental de realizar el radioinmu- noensayo de FSH y LH	144
I.5. Forma de expresar los resultados	147
I.6. Evaluación de la curva standard	149
I.7. Estudio de la especificidad del radioinmuno- ensayo	152
II.- Radioinmunoensayo de FSH y LH por "Kits" comercia-- les de Serono.	155
III.- Material humano.	159
IV.- Tomas de sangre y test de estudio del eje hipotála- mo - hipófisis-gonadal	160

I.- Radioinmunoensayo de FSH y LH por el metodo de N.I.H.:

I.1. Iodacion o marcaje de FSH y LH por el metodo de N.I.H.	163
I.2. Titulacion de anti-FSH y anti-LH.	172
I.3. Titulacion de anti-RGG.(segundo anticuerpo)	176
I.4. Curvas standard de FSH y LH	178

II.- Radioinmunoensayo de FSH y LH por el metodo SERONO:

II.1. Curvas standard de FSH y LH	198
II.2. Efecto del tiempo de incubacion en los diferentes estadios del R.I.A.	206

III.- Aplicacion en la clinica humana del R.I.A. de FSH y LH:

III.1. Concentración de FSH y LH en hombres.....	210
III.2. Concentración de FSH y LH en Mujeres.....	217
III.3. Dinamica de la secreción de FSH y LH en mujeres con ciclos anovulatorios.....	228
III.4. Comparación cuantitativa de las concentraciones de FSH y LH obtenidas por ambos metodos en sujetos normales.....	230

IV.- Respuesta de FSH y LH al test de LH-RH sintetico:

IV.1. En hombres normales.....	232
IV.2. En hombres con diversas patologias endocrinas.....	236
IV.3. En mujeres normales.....	238
IV.4. En mujeres con diversas patologias endocrinas.....	242
IV.5. Efecto de la testosterona i.v. en la respuesta de FSH y LH al test de LH-RH en hombres normales.....	245
IV.6. Efecto de los estrogenos (equinos) en la respuesta de FSH y LH al test de LH-RH en mujeres normales (fase folicular).....	247
IV.7. Concentración de FSH y LH en niños.....	250
IV.8. Respuesta de FSH y LH al test de LH-RH sintetico en niños prepuberales y puberales.....	253

V.- Test del Clomifeno:

V.1. En hombres adultos y en niños prepuberales.....	256
V.2. En patologias endocrinas masculinas y feminas.....	256

DISCUSION

261

CONCLUSIONES

295

I. RADIOINMUNOENSAYO

I. 1. INTRODUCCION HISTORICA

El descubrimiento de la técnica del radioinmunoensayo ha sido de gran importancia para la Medicina y especialmente para la Endocrinología, ya que ha constituido el punto de partida para la investigación de los diferentes mecanismos de regulación hormonal, así como para el estudio profundo de las diversas endocrinopatías producidas por alteraciones de la secreción hormonal.

Los pioneros del desarrollo del radioinmunoensayo fueron Berson y Yallow, al descubrir, en el plasma sanguíneo de los diabéticos tratados con insulina, una globulina unida a la misma y que definieron como anticuerpo anti-insulina, definición rechazada por muchos investigadores de la época que afirmaban categóricamente la incapacidad de la insulina para producir anticuerpos.

Este anticuerpo tenía capacidad para unirse a insulina marcada con I^{131} , in vitro, desplazándose esta hormona al añadir al medio insulina sin marcar (fria). - Aumentando la concentración de esta última, disminuía la cantidad de insulina marcada unida al anticuerpo, lo que

demostraba que el desplazamiento originado por la insulina - sin marcar era una función cuantitativa de su concentración. Estos resultados llevaron a concebir una técnica muy refinada para la valoración de la concentración de insulina en el plasma sanguíneo.

Históricamente los procesos encaminados al logro de esta técnica se desarrollaron de la forma siguiente : En 1950-53, Berson y Yallow (1,2,3) estudiaron, in vivo, el comportamiento de proteínas marcadas con el isótopo radiactivo I^{131} . Atraídos por la sugestiva hipótesis de Mirsky(4), que suponía que la diabetes en la edad adulta no obedecía siempre a una deficiencia de la secrección de insulina sino más bien a una degradación anormal de la insulina por la insulinasas hepática, investigaron el metabolismo de la insulina marcada con I^{131} en la diabetes (5,6,7).

Experimentando in vitro con el plasma de diabéticos, que contenía anticuerpos anti-insulina, observaron la competición, por la unión a este anticuerpo, entre insulina marcada y no marcada(8,9). Estos mismos autores, en trabajos sucesivos, estudiaron la cinética de la reacción entre insulina de buey y anticuerpos producidos con insulina humana y las reacciones cruzadas entre insulina de diferentes especies,

determinando las constantes de equilibrio en cada reacción(10, 11,12,13).

En 1.959 (14) publicaron que el anticuerpo producido por insulina de buey en conejillos de indias reaccionaba con la insulina humana, y en el mismo año (15) dieron a luz sus primeros resultados sobre la concentración de insulina humana presente en el plasma, culminando así una labor intensa de tres años dirigidos a este fin.

Al perfeccionamiento de esta técnica contribuyeron Nicol y Smith (16) al demostrar que la estructura de la insulina humana era más similar a la porcina que a la bovina ; basados en esta observación inmunizaron conejillos de indias con insulina porcina (17) y obtuvieron anticuerpos más potentes que los obtenidos con insulina de buey en la valoración de insulina humana, anticuerpos que se siguen usando actualmente.

Una vez demostrada la gran importancia de los trabajos de Berson y Yallow, numerosos investigadores aplicaron la base de esta técnica al estudio de valoraciones de otras hormonas.

El primero fué Unger (18) al desarrollar el radioinmunoensayo del glucagón. Aplicaciones posteriores se han ido realizando sobre infinidad de sustancias biológicas presentes en los organismos vivos en concentraciones mínimas.

Las técnicas del radioinmunoensayo y las relacionadas con ella, como los ensayos por unión competitiva a proteínas, ensayos enzimáticos, ensayos de radioceptores y ensayos inmunoradiométricos, se aplican actualmente para la valoración de muchas sustancias, entre las que se encuentran: Hormonas protéicas y no protéicas, vitaminas, ácidos nucleicos, enzimas, drogas, metabolitos, antígenos cancerosos, antígenos virales, anticuerpos y proteínas estructurales.

En la actualidad, el estudio de estas técnicas es tema de numerosos Congresos y de una amplia literatura, y su desarrollo ha iniciado una nueva era en la Endocrinología de la que estamos todavía empezando a ver los primeros resultados.

I. 2. PRINCIPIOS GENERALES DEL RADIOINMUNOENSAYO

La finalidad del radioinmunoensayo consiste en la valoración de ciertas sustancias biológicas que se hallan en mínimas cantidades en líquidos biológicos: plasma, -- suero, medios de cultivo in vitro, orina etc.

La Figura I representa esquemáticamente la reacción básica que se produce en todo radioinmunoensayo.

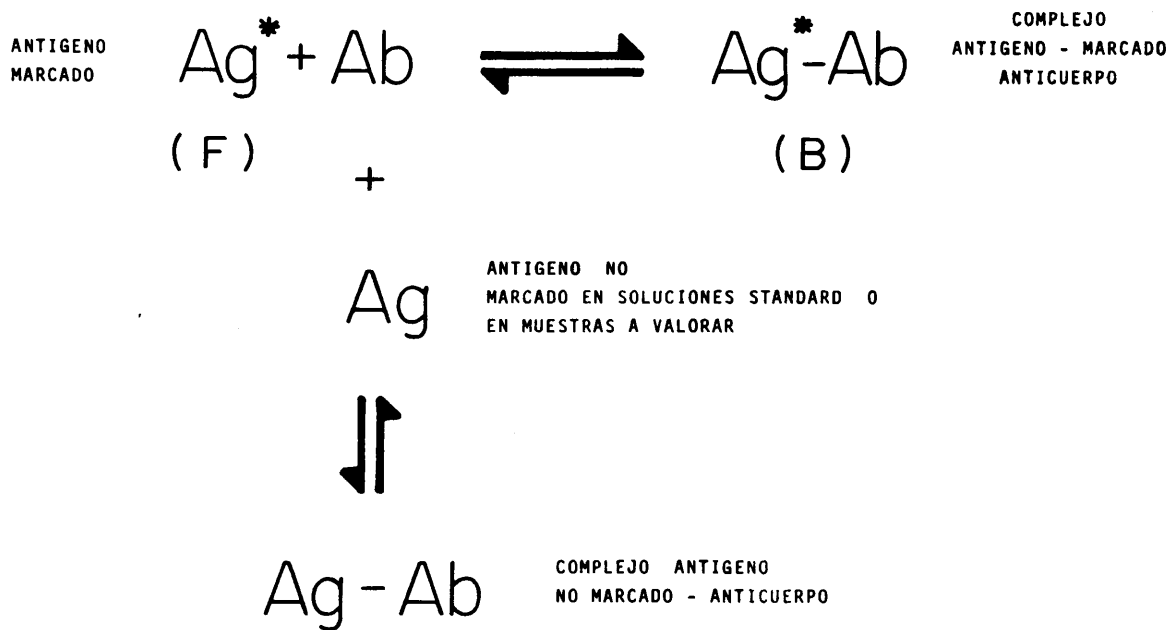


FIG. 1 - PRINCIPIO GENERAL DE UN R. I. A.

El antígeno marcado Ag^* reacciona reversiblemente con el anticuerpo Ab formando el complejo soluble antígeno marcado-anticuerpo (Ag-Ab). El mismo antígeno sin marcar Ag compite con el marcado en la reacción con el anticuerpo para dar el complejo soluble antígeno-Anticuerpo (Ag-Ab).

Con el fin de separar fácilmente el antígeno libre marcado del ligado al anticuerpo, se insolubiliza el complejo antígeno-anticuerpo por medio de procedimientos químicos o inmunológicos, en forma de un precipitado que puede separarse del sobrenadante que contendrá el antígeno no marcado libre.

El antígeno marcado contiene átomos de un isótopo radioactivo en sus moléculas, lo que va a permitir detectar, contando la radioactividad del precipitado, qué % de su radioactividad total se ha unido al anticuerpo: B, y por tanto determinar las relaciones B/T, B/F, etc.

Terminología: F: % de radioactividad correspondiente al antígeno marcado libre

B: % de radioactividad correspondiente al antígeno marcado unido al anticuerpo.

T: radioactividad total correspondiente al antígeno unido y libre.

En todo ensayo, se utiliza una serie de diluciones de antígeno sin marcar en concentraciones bien definidas (antígeno standard) y en los tubos restantes las muestras a valorar; los volúmenes de ambos han de ser idénticos.

En todos los tubos del ensayo, la cantidad de antígeno marcado que se añade debe ser constante.

La Figura 2 muestra esquemáticamente el proceso que se desarrolla:

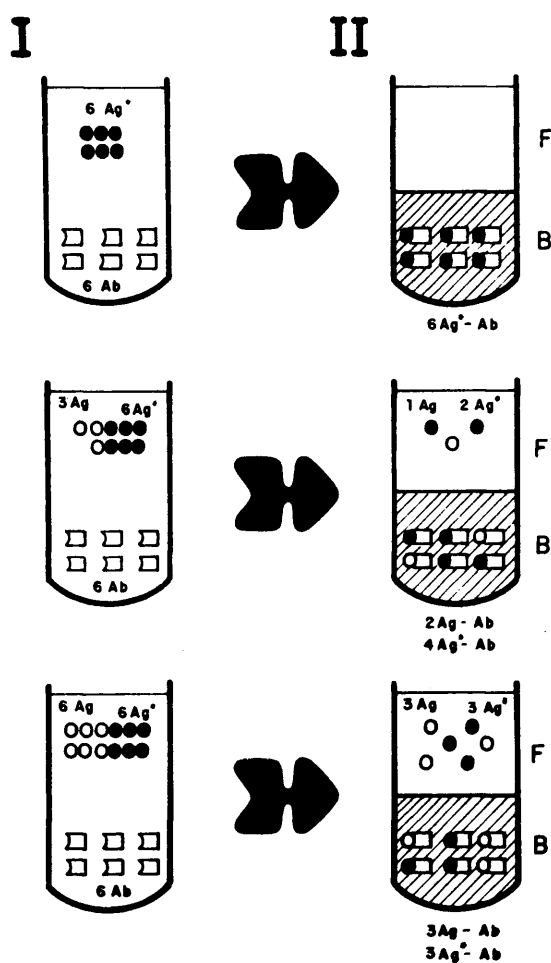


FIG. 2: REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESO QUE SE DESARROLLA EN UN RADIOINMUNOENSAYO (MODIFICADO DEL ESQUEMA DE HAWKER, C.D., ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL 45, N°11, 1.973)

Los tubos (I), muestran los componentes iniciales - de la reacción y los (II) los productos finales, representados por F y B respectivamente. En el primer tubo, todo el Antígeno marcado (Ag^*) reacciona con el Anticuerpo (Ab).

En los dos siguientes, adiciones de diferentes concentraciones de Antígenos sin marcar (Ag) producen uniones de Ag y de Ag^* con el Ab según la relación entre sus respectivas concentraciones, es decir, según la relación Ag/Ag^* , y como en todos los tubos la concentración de Ag^* es constante, la fracción B/F será función de la concentración de Ag (concentración de los standards o muestras a valorar).

Cada tubo correspondiente a una concentración del - standard dará una relación distinta de B/F, lo que va a - permitir la construcción de una gráfica que correlacione diferentes concentraciones de Antígeno no marcado con sus respectivos valores de B, F, y B/F. Estas gráficas se denominan: "Curvas Standards".

La cantidad de Antígeno presente en una muestra a - valorar se podrá obtener por comparación de la radioactividad presente en el tubo correspondiente (en forma de B, F o B/F) y las radioactividades obtenidas en la Curva Standard.

A cada valor de B , F o B/F , le corresponderá una cantidad - determinada de la concentración del Antígeno.

DIVERSAS FORMAS DE REPRESENTAR LA CURVA STANDARD

Se han desarrollado diversas formas de representar - las curvas standards, cada una de ellas ofrece ventajas junto a limitaciones.

Usando un sistema de ejes cartesianos, generalmente en el eje de abcisas se representa la dosis variable (concentración de Antígeno no marcado) en escala lineal o logarítmica, siendo ésta última la más frecuentemente usada, ya que - permite distancias determinadas para cada factor de dilución del standard, independientes de las unidades empleadas.

La variable que se representa en el eje de ordenadas varía según los diversos autores.

Yallow y Berson (19,20), siguiendo la linearización - introducida por Scatchard (21) para interacciones de peque- ñas moléculas de proteínas, representaron la relación B/F .

Otra forma más frecuente es la representación de B/T o de $\frac{B/T}{(B/T)_0} = \frac{B}{B_0}$

En esta última $(B/T)_0$ expresa la fracción de radioactividad ligada y total en los tubos en los que no hay Antígeno no marcado (unión del Anticuerpo al Antígeno marcado, tubos "cero"), y se toma como 100%. B/T expresa la fracción de radioactividad ligada y total del precipitado obtenido en la muestra y B_0 la radioactividad ligada en los "tubos cero". Tanto al numerador como al denominador se les resta la radioactividad de los tubos que no se les ha añadido anticuerpo específico (tubos blanco; radioactividad no específica).

Si en esta representación el eje de abcisas está en escala logarítmica, se obtienen curvas sigmoideas parcialmente linealizadas. (22 y 23)

Con el fin de linealizar totalmente la curva, -- aplicar técnicas de regresión lineal, basadas en los trabajos de Bliss y Finney (24,25), y automatizar los resultados se usó una transformación logarítmica según la fórmula:

$$\text{logit } Y = \log_e \frac{Y}{100-Y} \quad \text{siendo } Y = \frac{B/T}{(B/T)_0} = \frac{B}{B_0}$$

Las rectas así obtenidas son perfectamente lineales entre los valores de B/T comprendidos entre 10 y 90%.

La Figura 3, muestra diferentes curvas standards obtenidas por Rodbard (26) según las diferentes representaciones expuestas.

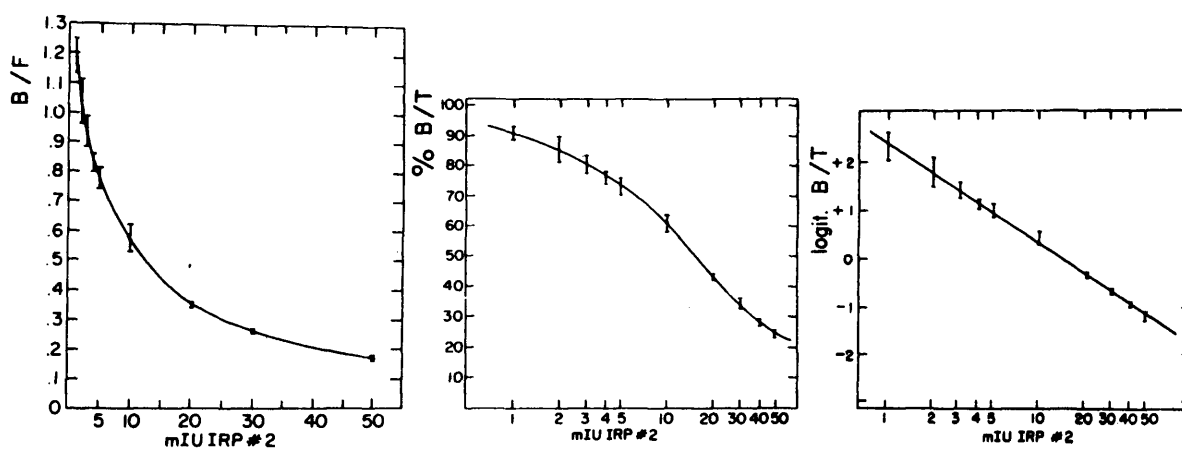


FIG. 3: DIVERSAS FORMAS DE REPRESENTACION DE LA CURVA STANDARD

1. EN ESCALA ARITMETICA
2. EN ESCALA SEMILOGARITMICA
3. EN ESCALA LOGIT. - LOG.

I. 3. GENERALIZACION DEL PRINCIPIO DEL RADIOINMUNOENSAYO

El principio de Radioinmunoensayo puede extenderse a Sistemas No Inmunes y No Hormonales, a los que se puede aplicar el término general de: Radioinmunoensayos competitivos.

La Figura 4, expresa la Reacción generalizada para estos Sistemas:

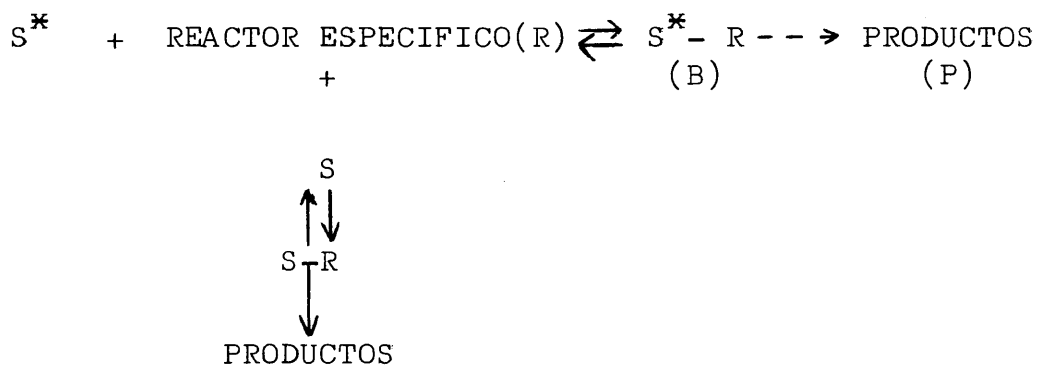


Fig. 4: Reacción generalizada de los Sistemas de Saturación.

S: representa cualquier sustancia medible.

R: representa un reactor específico de S.

P: representa el producto final de la reacción, cuando R y S son:

enzima y sustrato, respectivamente, o cuando R es un reactor capaz de alterar S específicamente.

Otros términos usados en la descripción de estos sistemas son:

Análisis de saturación y unión competitiva a proteínas --
(Competitive Protein Binding: C.P.B.) (27)

La 1ª. definición no es muy correcta, ya que a veces el Análisis se lleva a cabo en condiciones tales que la saturación de R no se ha logrado.

La 2ª. se aplica más frecuentemente en aquéllos casos en los que R es una proteína, como en el caso de c-AMP.

Cuando R es un receptor de membrana, se aplica el término de: Unión competitiva a Receptores (RADIOLIGAND ASSAY) (R.L.A.) (28), método que actualmente se está desarrollando muy ampliamente con el fin de estudiar las propiedades y estructuras de los receptores hormonales y no hormonales.

La Tabla I muestra algunas de las sustancias que pueden medirse con estos Métodos, aunque, el grado de aplicación es tan enorme, que resulta difícil hacer una relación completa de todas las sustancias asequibles a Los Análisis de Saturación.

RADIOENSAYO COMPETITIVO

Sistemas inmunes (El anticuerpo es el reactor específico)

<u>HORMONAS PEPTIDICAS</u>	<u>SUSTANCIAS NO HORMONALES</u>	<u>HORMONAS NO PEPTIDICAS</u>
Insulina	Factor intrínseco	Aldosterona
GH	Digosín	Testosterona
ACTH	Digitosin	Dihidrotestosterona
PTH	Morfina	Estradiol
Glucagón	cAMP, cGMP	Estrona
TSH	cIMP, cUMP	Estriol
HCG	Antígeno Australia	2-Hidroxiestrona
FSH	CEA	Prostaglandinas
HCS		Triiodotironina
Proinsulina		
Secretina		
LH		

Sistemas no inmunes

<u>HORMONAS</u>	<u>REACTOR ESPECIFICO</u>	<u>SUSTANCIAS NO HORMONALES</u>	<u>REACTOR ESPECIFICO</u>
Tiroxina	Proteínas plasmáti- cas de unión espe- cífica	Vitamina B ₁₂	Factor intrínseco
Cortisol		Acido fólico	Reductasa F.A.
Corticosterona		cAMP, cGMP	Fosfodiesterasas
Cortisona		Mensajero RNA	DNA complementario
Progesterona			
Testosterona			
11-Desoxi - cortisol			
ACTH	Puntos adrenales receptores		

I. 4. CONCEPTOS GENERALES DE INMUNOLOGIA

a.- Desarrollo Histórico.

Aunque Jenner y Pasteur fueron los precursores de la Inmunología (29), han sido en realidad los trabajos de Behring y Kitasato, Buchner, Mertchnikoff y Wright los que analizaron científicamente este apasionante campo de la Medicina, al descubrir la existencia de anticuerpos, complementos (alexinas), y desarrollar las teorías sobre la defensa contra la infección por medio de la fagocitosis reforzada por la acción de los anticuerpos (30, 31, 32 y 33).

b.- Sistemas celulares que intervienen en la respuesta inmunológica. Mecanismo de producción de anticuerpos.

El control tanto de la Inmunidad celular, responsable de las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado y del rechazo de los injertos, como de la Inmunidad humoral responsable de la producción de anticuerpos, descansa sobre una población de linfocitos existentes en los organismos. (34, 35) provenientes de unas "Células Madres" presentes en la Médula ósea del feto.

Durante el nacimiento, algunas de estas Células a -

través del torrente circulatorio llegan al Timo, diferenciándose y convirtiéndose en precursoras de linfocitos -- (timocitos). La mayor parte de los timocitos mueren dentro de él, y los restantes, a través del Sistema linfático eferente pasan a los tejidos linfoides (ganglios linfáticos, bazo). El haber residido en el timo les confiere la capacidad de alcanzar la longevidad y de poder circular desde el Sistema linfático eferente hacia el conducto torácico, pasar al flujo sanguíneo y volver de nuevo al tejido linfático, estableciéndose así un Sistema de Recirculación linfática constante. (36) Estos linfocitos, dependientes del timo, van a ser los responsables de la Inmunidad Celular. Un sistema de linfocitos, independiente del anterior, deriva también de las Células Madres de la Médula ósea. El emplazamiento de la diferenciación de estas células no se conoce exactamente todavía en el hombre, aunque se supone que es la médula ósea, si bien ha sido identificado en los conejos y peces (siendo en estos últimos la Bolsa de Fabricius). Estas células diferenciadas, linfocitos B (37) llegan al sistema Circulatorio del mismo modo que las anteriores y se sitúan en las regiones -- del sistema linfoide periférico, donde persisten durante un tiempo breve (linfocitos de vida corta), y no recirculan; estos linfocitos son células inmunocompetentes capa-

ces de producir anticuerpos, y por tanto son las implicadas en el proceso de Inmunidad Humoral. (38)

Cuando una sustancia extraña ataca un organismo, en la zona afectada, recubriendo a la sustancia, aparecen unas inmunoglobulinas especiales (opsoninas) junto con el complemento, y entonces se desencadena la producción de ciertos productos que quimiotácticamente atraen a los macrófagos. (39) Por acción de enzimas proteolíticos que contienen los macrófagos, el elemento extraño sufre alteraciones en sus moléculas hasta que es englobado por éstos.

No se conoce bien la interacción entre el macrófago que contiene el invasor fagocitado y el linfocito, pero se supone que la información antigénica que le transfiere el macrófago es a través de su ARN (Acido ribonucleico) ya sea de una manera directa o indirecta; esta información va a inducir la proliferación del linfocito y su transformación en células plasmáticas capaces de producir anticuerpos. (40)

El linfocito así transformado se convierte en un linfocito-memoria, de vida larga que recircula constantemente por el sistema circular y el linfático, y que con--

serva el recuerdo en forma de potencialidad de síntesis -
de anticuerpos específicos. (41)

c.- Antígenos e Inmunógenos. Haptenos Adjuvantes.

El término antígeno puede usarse para definir cualquier sustancia capaz de provocar o de estar involucrado, -
in vivo o in vitro, en una respuesta inmunológica específica.

El término Inmunógeno, a diferencia del anterior, -
puede aplicarse a las sustancias capaces de provocar una -
reacción inmunológica específica de novo, ya sea por formación de anticuerpos o por producción de una respuesta de -
hipersensibilidad de tipo retardada. (42)

La capacidad inmunológica de una sustancia depende de varios factores; entre los más importantes se encuentran: su estructura química y espacial y su peso molecular.

Cuanta mayor diferencia exista entre la estructura de la sustancia y de la sustancia propia del animal inmunizado, mayor respuesta inmunológica se obtiene. (43)

En cuanto al peso molecular, trabajos experimentales demuestran que existe una relación entre el peso mole

cular de varios polipéptidos y polímeros de polisacáridos (muy semejantes entre si, diferenciándose únicamente en su peso molecular) y su poder antigénico. (44,45) En general, para que una sustancia sea inmunógena, debe de formar parte de una macromolécula. Moléculas de peso molecular mayor de 10.000 tienden a ser muy buenos inmunógenos, mientras que las de peso molecular entre 1.000 y 5.000 -- tienen menor capacidad. (46,47)

Muchas drogas o metabolitos intracelulares, de peso molecular entre 200 y 1.000, no provocan ninguna respuesta inmunológica al ser inyectadas a un animal, al menos que se unan a una proteína con la que forman una unión (generalmente covalente) estable. Este tipo de sustancias de peso molecular bajo se les designa con el término de Haptenos. (48,49)

Cuando sustancias de gran interés biológico no se conjugan con las proteínas, es preciso activarlas con el fin de que se produzca la unión. Para ello se emplean activantes químicos, que pueden incluirse en dos clases. (50)

- 1.-) Activantes de los grupos carboxil, para formar la unión: CO-NH.
Ejemplo: carboimididas, cloroformatos, alquílicos etc....
- 2.-) Agentes que forman puentes entre grupos aminos.
Ejemplo: diisocianatos, diimidoesteres, etc....

En algunos casos especiales, en los que la conjugación no pueda realizarse, ya por que el hapteno no contenga grupos funcionales o por que estos grupos no puedan alterarse sin modificar la especificidad del anticuerpo, es necesario sintetizar un derivado del hapteno para emplearle como antígeno.

La conjugación de sustancias biológicas, como c-AMP, aldosterona, prostaglandinas, etc., con proteínas han contribuido al desarrollo del radioinmunoensayo de estos compuestos (51,52) y por consiguiente al estudio de sus mecanismos de acción (53,54).

Los adjuvantes son un tipo de sustancias, que mezcladas con inmunógenos, aumentan su respuesta inmunológica. Las sustancias más usadas son: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, emulsiones de aceite mineral, endotoxinas de gérmenes Gram negativo, exotocinas de Gram positivos. (55)

Estas mezclas retardan la destrucción eliminación del antígeno por los macrófagos y constituyen depósitos del inmunógeno que va saliendo lentamente durante varias semanas, previniendo así la entrada rápida en la circulación.

d.- Estructura de Anticuerpos.

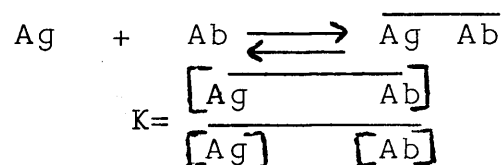
Los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas plasmáticas conocidas por inmunoglobulinas. Las clases de inmunoglobulinas humanas, conocidas hasta el presente, son cinco: IgG, IgA, IgD, IgM, e IgE; se diferencian en su comportamiento como antígenos, en su concentración en la san- gre, en su carga iónica, en su origen celular, en su dis- tribución en el cuerpo humano y en su actividad biológica e inmunológica in vitro. (56,57, y 58)

La más abundante es la IgG, que constituye un 80% de la inmunoglobulinas circulantes y la mayor parte de los anticuerpos totales. Su peso molecular medio es de 150.000 y posee un coeficiente de sedimentación de 6,5 a 7,0 S.

La estructura de la inmunoglobulinas (Fig. 5), consiste en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesa-- das (H) de peso molecular medio de 50.000 y dos ligeras -- (L) de peso molecular de 20.000. Cada una de las cadenas L está unida a una H por un enlace S-S y las dos cadenas H - están unidas a su vez entre sí por un enlace S-S.

Los anticuerpos se combinan específicamente con los grupos determinantes de los antígenos, ésta combinación es reversible y las fuerzas que intervienen son, - en su mayoría, debidas a la presencia de grupos con cargas opuestas que están en íntimo contacto (fuerzas iónicas); en menor proporción intervienen fuerzas de Van der Waals (fuerzas que actúan entre las moléculas independientemente de su carga y cuyo valor disminuye con la distancia). En estas uniones también intervienen puentes de hidrógeno. (56) Estas fuerzas son máximas en condiciones fisiológicas de pH (mayor de 3 y menor que 10,5) y de concentraciones iónicas; fuera de estos límites son tan débiles que el complejo antígeno-anticuerpo se disocia.

Los anticuerpos formados en un animal frente a un único determinante, puede sufrir variaciones de la energía con que se combinan o de su avidez. Estas variaciones se expresan en términos de la Constante de equilibrio: K, derivada de la ecuación de la ley de acción de masas aplicada al equilibrio:



K expresado en litros/mol, siendo más elevada cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo. (59)

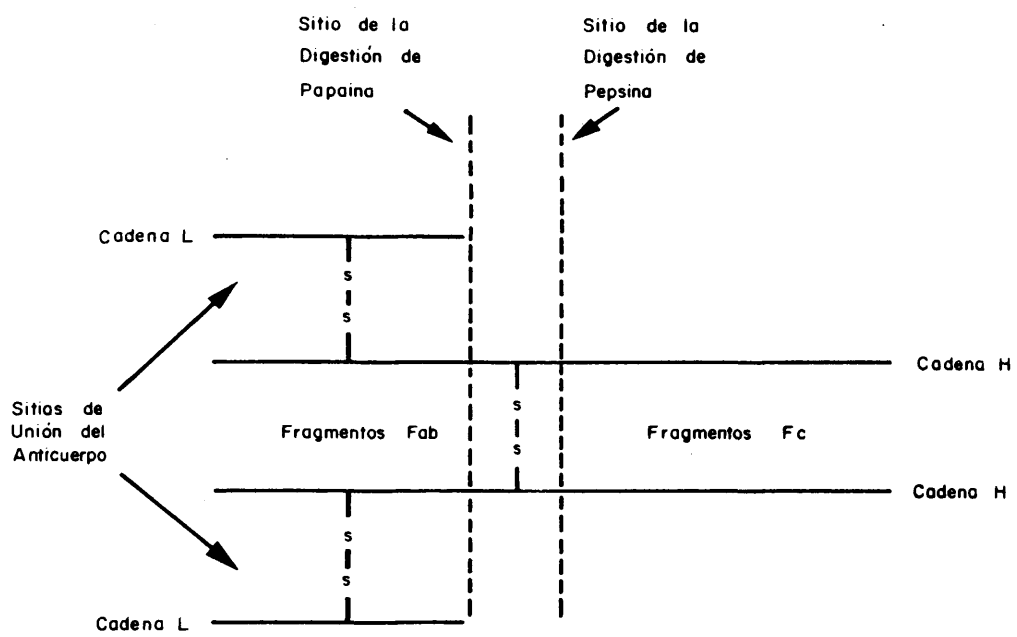


FIG. 5 - ESTRUCTURA DE INMUNOGLOBULINA.

I. 5. PRODUCCION DE ANTICUERPOS

a.- Elección de las Especies de Animales.

Individualmente, cada animal da un tipo de respuesta a un mismo inmunógeno en función, en parte, de su constitución genética (60). Si no se dispone de una generación de animales de la misma especie que responden bien a un determinado inmunógeno, es conveniente usar familias de animales elegidos al azar.

Las especies más frecuentemente usadas son conejos y conejillos de indias. Los conejos son fáciles de manejar y en las tomas de sangre por la vena de la oreja pueden obtenerse de 30 a 40 ml cada vez. Dan muy buenos resultados en los radioinmunoensayos de gonadotropinas, ACTH y glíceridos conjugados. (61)

b.- Forma de administración y Dosis del Inmunógeno.

La forma más común es inyectar el inmunógeno, emulsionado con adjuvantes, subcutánea o intramuscularmente. El inconveniente que ofrece esta técnica es la formación de abscesos en los sitios de inyección, aunque en el caso de los conejos y conejillos de indias parece

ser que no les causa ningún daño. (55) A veces se recomienda pinchar en las patas de estos animales, pero debe ser evitado ya que produce entumecimiento y dolor durante varios días.

En los últimos años, se han intentado otras vías de inmunización con el fin de obtenerse resultados más efectivos. Una de ellas ha sido la vía intranodal de Boyd y Peart en 1.968 (62), que ofrece dificultades técnicas de localización e inyección de nódulos linfáticos en operación abierta. En la comparación con los procedimientos comunes no tiene muchas ventajas (55), e incluso algunos animales no responden quizás por la destrucción de los nódulos linfáticos durante la inyección.

Otro procedimiento, que ha tenido más éxito por los resultados y su sencillez, ha sido el de la vía intradérmica (63), en el que el inmunógeno se inyecta en 40 o más sitios diferentes de la superficie corporal del animal.

En cuanto a la dosis del inmunógeno la respuesta inmunológica parece ser independiente de la dosis, aunque existe una dosis mínima por debajo de la cuál no se produce la respuesta. (64) Generalmente, si se usan los

adjuvantes de Freud, dosis del orden de 100 μ g son suficientes y en el caso de que el inmunógeno no es muy difícil de obtener y sus efectos fisiológicos no son tóxicos, se suelen usar dosis de 0,5-5 mg en la primera inoculación y de 0,2-2 mg en la siguiente. (62)

c.- Tiempos de Inyección y tomas de Sangre.

El tiempo de inyección es muy importante para -- conseguir una máxima respuesta con el mínimo esfuerzo.- Después de la primera inyección, el nivel de anticuerpo aumenta lentamente, alcanzando un pico al cabo de varias semanas; las inyecciones posteriores no deben darse -- antes de 4 semanas después de la primera inyección y con una frecuencia no mayor de una vez cada mes, incluso en algunos casos es muy conveniente dejar un período de descanso de 3 a 6 meses y continuar posteriormente el ritmo anterior. (55)

d.- Producción de Anticuerpos Anti LH- y Anti-FSH

Los anticuerpos contra LH y FSH, se obtienen en conejos y conejillos de indias. La dosis de antígeno -- suministrada y la forma de administración están sujetas a variaciones. Odell (65), recomienda: tres series de

inyecciones subcutáneas, que contengan de 200 a 300 μ g de hormona en un mililitro de solución salina homogeneizada con adjuvante de Freud, seguidos de varias inyecciones en períodos de 14 a 30 días. Las extracciones de sangre pueden hacerse a partir de la segunda serie en períodos de 10-14 días.

Franchimont (66) inyecta subcutáneamente, 1 mg de una preparación no muy pura, de hormona FSH o LH, en intervalos semanales.

Los anticuerpos obtenidos deben de someterse a un control riguroso con el fin de estudiar su especificidad, ya que debido a los grupos comunes que poseen -- las hormonas polipeptídicas, pueden contener una gran población de anticuerpos heterologos capaces de unirse a las demás hormonas, que no interesan valorar en un ensayo específico (El estudio de la especificidad de estos anticuerpos se verá en el capítulo de Especificidad de un Anticuerpo).

Especificidad de los anticuerpos contra FSH y LH.

La obtención de anticuerpos específicos contra LH y FSH, ha sido difícil, debido a las analogías inmunológicas existentes entre FSH, LH, TSH, y HCG. (65).

La base fundamental para la utilización de, por ejemplo, un anticuerpo anti-FSH es la demostración de que no se une a LH, TSH y HCG marcadas, y de que la unión con FSH marcada no es desplazada por LH, TSH y HCG sin marcar. En el caso de que se observe un desplazamiento (reacción cruzada), se podrá usar el anticuerpo si previamente se le neutraliza con la hormona que interfiere, o si se añade exceso de ésta en todos los tubos del ensayo.

Todos los anticuerpos anti-FSH son desplazados de la unión con FSH, por LH y HCG. Algunos de ellos, cuya unión con FSH marcada es totalmente inhibida por LH o HCG, contienen sólo anticuerpos contra los grupos antigénicos comunes a las hormonas polipeptídicas, mientras que aquellos cuya unión es parcialmente inhibida por LH o HCG, contienen dos poblaciones de anticuerpo: una con grupos específicos comunes a FSH, LH o HCG y otros específicos de FSH. Los anticuerpos específicos pueden neutralizarse añadiendo HCG pura.

I. 6. EVALUACION DEL ANTICUERPO PRODUCIDO

El desarrollo de un radioinmunoensayo específico, para medir hormonas en fluidos biológicos o cualquier sustancia química, requiere la obtención de anticuerpos de gran título, afinidad y especificidad. No existe ningún criterio absoluto para cada uno de estos parámetros, cada sustancia ofrece problemas muy particulares y requiere un criterio especial. La producción de anticuerpos específicos para las hormonas polipeptídicas no ha sido fácil, debido a las propiedades biológicas e inmunológicas que poseen en común y son la causa de la heterogeneidad de sus anticuerpos.

Las tres características apuntadas anteriormente, de todo anticuerpo merecen una discusión.

a.- Título.

Se define como la dilución final del anticuerpo específico, en el radioinmunoensayo, necesaria para conseguir una unión determinada del antígeno marcado al anticuerpo; generalmente se elige aquella que dé un valor de $B/F = 1,0$.

El título de un anticuerpo específico de una hormona antigénica depende de varios factores. (67):

- 1) El tamaño molecular y la composición de la hormona usada como antígeno.
- 2) La duración de la inmunización.
- 3) La dosis total de inmunógeno.
- 4) La vía de administración al animal.
- 5) El grado de extrañeza de la hormona inyectada al animal.

En general, polipéptidos de gran peso molecular producen títulos grandes excepto en casos como la vasopresina y la gastrina (68, 69), por lo que la mayoría de las hormonas se conjugan a proteínas de peso molecular grande antes de inyectarlas.

En cada toma de sangre del animal inmunizado se debe evaluar el título del anticuerpo. La forma experimental de hacerlo es la construcción de Curvas de Titulación, para lo cual se incuban concentraciones constantes del antígeno marcado con concentraciones variables del anticuerpo. Para cada dilución del anticuerpo se obtiene una relación B/F distinta, lo que permite la construcción de una gráfica como la representada en la Fig. 6.

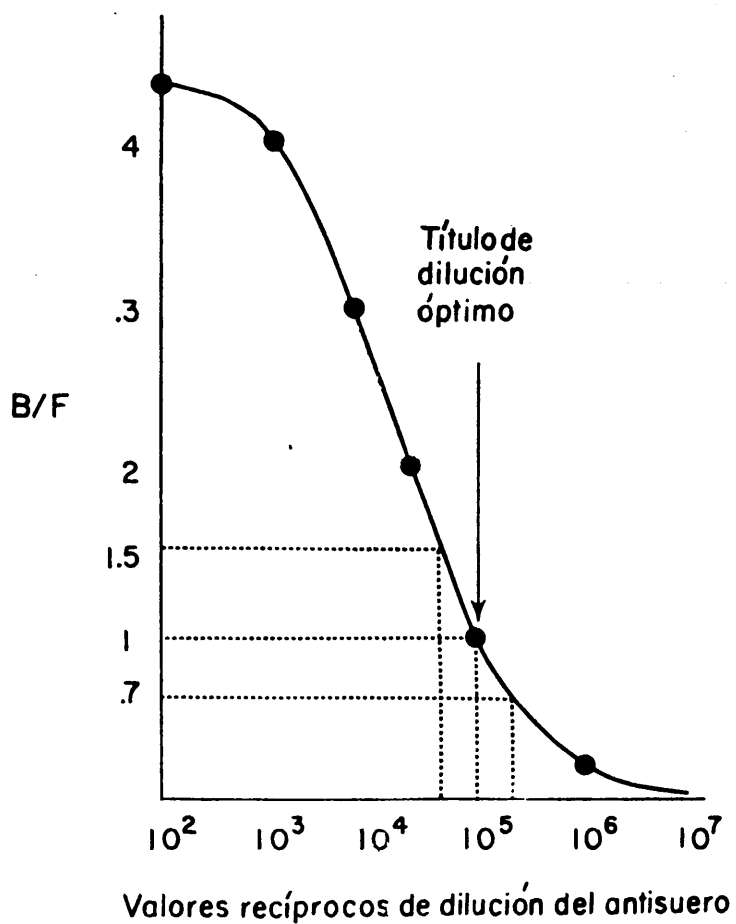


FIG.6: CURVA DE DILUCION DE UN ANTICUERPO PARA CALCULAR SU DILUCION OPTIMA EN EL R.I.A.

En el eje de abscisas se representan las diferentes diluciones del anticuerpo y en el de ordenadas la relación B/F obtenidas en cada dilución.

Para desarrollar el radioinmunoensayo se elige -- aquella concentración de anticuerpo que corresponda a un -- B/F = 1.0, es decir a una unión antígeno-anticuerpo com-- prendido entre 40 y 60 %, en relación con la concentración total de antígeno marcado (radioactividad total).

Salvo casos muy especiales, no debe usarse títulos de anticuerpos menores que 1:20, ya que además de tener -- una avidéz baja, ofrecen el inconveniente de que en el ra- dioinmunoensayo se precise añadir enormes cantidades de -- suero con el correspondiente riesgo de interferencias con hormonas endógenas o la presencia de enzimas proteolíticos que pueden dañar la hormona marcada, como en el caso de la angiotensina II. (70).

Durante la inmunización de un animal, es preciso hacer gráficas que relacionen el tiempo entre cada inyección, la dosis del inmunógeno y los títulos obtenidos en cada etapa, para tener un control de la potencia antigénica del animal correspondiente.

b.- Avidez o afinidad del Anticuerpo.

Según Berson y Yallow (71), puede definirse como la parte descendente de la curva de titulación del anticuerpo. Es decir, en una serie de curvas de titulación de diferentes anticuerpos, el de mayor avidez o afinidad sería aquél que diese una curva mayor pendiente. Más tarde se ha comprobado que este criterio es muy pobre ((Greenwood, 1.969) (72)), ya que no especifica nada respecto a otras variables del ensayo, como concentración de la hormona marcada.

Un método más exacto para definir la afinidad del anticuerpo es realizar curvas de titulación de un anticuerpo determinado, con diferentes concentración de hormona marcada. El anticuerpo de mayor afinidad, proporciona una mayor separación entre ellas que el anticuerpo de menor afinidad, lo que significa que es capaz de distinguir

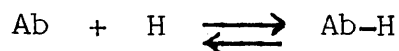
claramente diferentes concentraciones de hormona marcada; la mínima cantidad de ésta que dé una curva suficientemente separada de la concentración de hormona marcada más -- próxima, se considera la concentración óptima a utilizar en un ensayo de máxima sensibilidad y coincide con la mínima cantidad de hormona capaz de detectarse. (73)

Teniendo en cuenta que la introducción de Iodo -- radioactivo en la molécula de hormona puede alterar su -- configuración y por tanto sus determinantes antigénicos, la afinidad es mayor para la hormona marcada que para la no marcada (73), por lo que, en la práctica, la sensibilidad será menor que la teóricamente supuesta.

En el caso de que sea preciso ensayar un gran número de anticuerpos, se recomienda hacer curvas de titulación con y sin adición de una pequeña cantidad de hormona no marcada. El anticuerpo más ávido será el que dé separaciones mayores entre las curvas. (73)

La unión del antígeno con el anticuerpo, parece -- obedecer a la ley de acción de masas (74,75). Para poder aplicar esta ley, hay que suponer que los dos sitios de combinación idénticos que posee el anticuerpo funcionan -- independientemente y que poseen la misma afinidad y --

especificidad para el antígeno. Según estas hipótesis podemos escribir la reacción:



Siendo:

Ab = sitios de unión libres del anticuerpo.

H = hormona libre, y Ab-H = anticuerpo unido a la hormona.

La constante de asociación es: $K = \frac{K_1}{K_2} = \frac{[\text{Ab-H}]}{[\text{Ab}][\text{H}]}$

y siendo $[\text{Ab}^0] =$ concentración molar total de los sitios de unión del anticuerpo $= [\text{Ab}] + [\text{Ab-H}]$

y $[\text{H}] =$ concentración de antígeno libre = F

$[\text{Ab-H}] =$ concentración de antígeno unido al anticuerpo = B

Resultaría:

$$K = \frac{B}{[\text{Ab}^0] B/F} \quad \text{y por tanto}$$

$$B/F = K \left[[\text{Ab}^0] - B \right]$$

Lo que demuestra que la relación B/F es una función lineal de B. Este tipo de linealizaciones de primer orden, fué introducido por Scatchard (21) y aplicada al radioinmunoensayo por Berson y Yalow (71, 20). La constante, K, en esta ecuación representa la afinidad del --

anticuerpo: Ab. De esta manera, podemos obtener de una manera gráfica el valor de la afinidad, representando B/F en función de B; la pendiente de la recta obtenida nos dará el valor de K o afinidad del anticuerpo.

c.- Especificidad.

Una vez determinado el título y la afinidad del anticuerpo hay que controlar su especificidad. Teóricamente, en un anticuerpo producido por inmunización con una hormona pueden coexistir anticuerpos específicos para otras diferentes, es decir, un anticuerpo capaz de usarse en un radioinmunoensayo específico de una determinada hormona, puede tener capacidad de unirse también con otra hormona diferente marcada o no marcada. (65)

La especificidad de competición con la concentración de anticuerpo que de una unión del 50% con la hormona marcada que se desea medir. El esquema de la Figura 7 representa un anticuerpo heterogéneo que puede usarse en un radioinmunoensayo específico para H_3 :

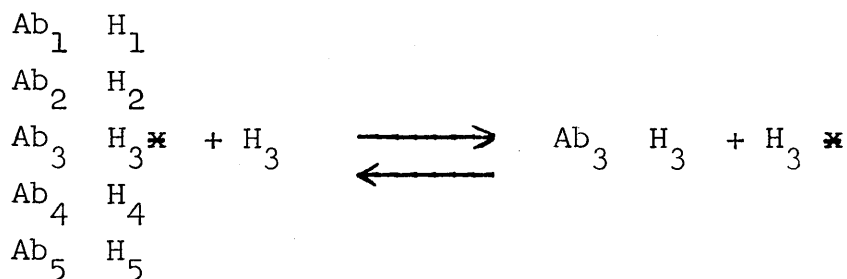


Fig. 7 Representación esquemática de un anticuerpo capaz de usarse en un Radioinmunoensayo específico para H_3 . -

Odell y col (65)

El Ab_3 reacciona con H_3 , pero esta interacción está influida por la inhibición competitiva de otras hormonas, que pueden estar presentes en el ensayo. (65)

Las sustancias que ofrezcan curvas standards en un radioinmunoensayo, idénticas o similares son inmunológicamente muy parecidas, sin embargo sustancias biológicamente idénticas pueden tener un comportamiento inmunológico muy diferente y no interferirse en su valoración.

Por ejemplo, en un radioinmunoensayo específico de tirotropina humana, la tirotropina de otras especies como perro, rata, y conejo, aunque tengan propiedades biológicas muy similares, no interfieren en el ensayo (76). Sin embargo, las hormonas HCG y LH, que no poseen actividad biológica similar a la tirotropina humana, interfieren en el radioinmunoensayo de ésta. (77)

En las diversas etapas de inmunización de un animal, la especificidad de un anticuerpo puede variar, como demostró experimentalmente Odell, en la valoración de un anticuerpo específico anti-FSH. (78)

Debido a que algunos anticuerpos presentan reacción de cruce con TSH (79), debe controlarse el desplazamiento de la unión con FSH marcada por TSH sin marcar.

Los anticuerpos anti-LH y Anti-HCG que reaccionen con FSH, deben rechazarse, pues su neutralización con FSH pura es imposible debido a su escasez. (80) También en estos anticuerpos debe de controlarse el desplazamiento con TSH.

Algunos autores como Catt. (81), Saxena (82), Dolais (83), debido a la reacción cruzada de LH y HCG, utilizan anticuerpos anti-HCG para el radioinmunoensayo de LH.

I. 7. CONCEPTOS BASICOS DE RADIOACTIVIDAD

Isotopos:

Son átomos que se diferencian solamente en el número de neutrones existentes en el núcleo.- Para diferenciarles se emplea un número escrito en la parte de arriba, antes del símbolo químico del elemento, que representa el número de protones más el número de neutrones.

Tipos de partículas radioactivas:

Alfa, Beta y Gamma. En el radioinmunoensayo de FSH y LH se utilizan las partículas alfa procedentes de la desintegración de los isótopos ^{125}I para detectar la radioactividad existente en el complejo hormona marcada-anticuerpo.

Vida media:

Es el tiempo necesario para la desintegración de la mitad de la actividad inicial de un radio nucleido, y viene dado por la expresión:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}, \text{ siendo } \lambda \text{ la constante de desintegración nuclear}$$

$$= - \frac{dN}{dt} / N \quad (N = \text{número de núcleos presentes en un tiempo } t).$$

Unidades empleadas:

De actividad: el curio ($= 3,7 \times 10^{10}$ desintegraciones por segundo).

De energía: el electrón voltio (eV), que es la energía cinética adquirida por una partícula al ser acelerada por una diferencia de potencial de un voltio.

De actividad específica:

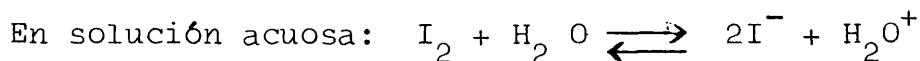
Se define actividad específica como la cantidad de radioactividad existente en una -- preparación de un isótopo; la unidad que se emplea, para su expresión en la relación en tre la radioactividad y el peso de la mez-- cla total de isótopos radioactivos y esta-- bles del elemento en cuestión: m Ci / mg, o, μ Ci / μ g.

I. 8. MARCAJE O IODACION DE POLIPEPTIDOS

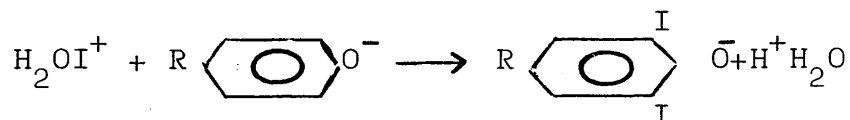
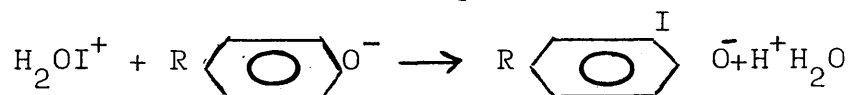
a.- Química de la iodación.

El proceso de la iodación consiste en la introducción de átomos de un isótopo radioactivo en las moléculas de un polipéptido. Cuando el isótopo usado es Iodo, se verifica una sustitución en el residuo tirosil del polipéptido que se marca (84, 85). Se ha podido comprobar que en el caso de exceso de Iodo, una vez saturado los radicales tirosil, el Iodo ataca los residuos de histidil; ésto explica el porqué sustancias, como PTH (paratormona) sin radicales tirosina pueden marcarse con Iodo radioactivo. Los residuos tirosil son más fáciles de marcar que los histidil.

La reacción transcurre del modo siguiente:

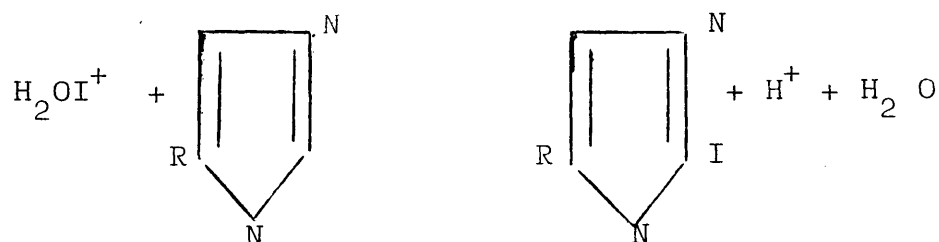


De este modo se suceden dos etapas:



Este mecanismo se ajusta a la evidencia experimental del marcaje en un medio ácido y pueden aplicarse a un medio de pH 7.- Freedlender (1969) (86), confirmó que el pH óptimo para la sustitución de átomos de Iodo en moléculas de polipéptidos es 7,5.

En la relación anterior, la introducción de un -segundo átomo de Iodo es más rápido que la del primero, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la reacción depende de iones tirosilatos. En condiciones normales durante el marcaje, se pueden afectar los grupos histidina y destruir los triptófanos. En el caso de moléculas de histidina el marcaje se realiza de la forma siguiente:



El marcaje de histidina es importante en el caso de péptidos sin residuos de tirosina.

b.- Métodos de iodación.

Los métodos de iodación se diferencian en los reactivos empleados en la oxidación del isótopo radioactivo presente en forma de Ioduro en Iodo libre, que ya

es capaz de reaccionar con las moléculas de proteína o polipéptidos como se ha indicado en la reacción anterior.

En el año 1.956 Berson y col. (6) usaron nitrito sódico, como agente oxidante y ^{131}I en una cantidad de 30 a 80 mCi. Para remover la sal usaron diálisis y para separar los productos dañados de la reacción una columna de celulosa. Mc. Farlane (87) modificó la técnica empleando monoclóro de Iodo, antes de mezclarlo con la proteína. Este método fué puesto en marcha, como una microtécnica (88). Rosa y col. (89) demostraron la facilidad de la conversión electrolítica de Ioduro a Iodo.

A pesar de las ventajas técnicas que ofrece este tipo de marcaje y del poco deterioro que causa a las proteínas, no se ha usado con mucha frecuencia.

Hunter y col., en 1.962, (90) emplearon cloramina-T como agente oxidante en el paso de conversión de Ioduro a Iodo. Usando 2 mCi de ^{131}I marcaron HCG consiguiendo una radioactividad específica alta (91). Actualmente este método es el que se utiliza normalmente para marcar proteínas y polipéptidos, pues reduce la radioactividad empleada y se consiguen rendimientos tan altos -

como 95% con radiactividades específicas de más de -
1.000 uCi/ug en algunos casos. Para la mayor parte -
de las hormonas polipéptidas es suficiente marcar --
con 1 mCi. de radioactividad. La reacción de oxida--
ción puede pararse por diálisis, por transporte de
los reactivos a una columna de resina (Amberlite --
IR-4B) o por la adición de metabisulfito. (91)

El marcaje por medio de una enzima procedente
de un extracto de leche fué introducido por Kes-
ton en 1.964 (92). Mas tarde, Marchalonis (1.969) -
(93) demostró que la enzima lactoperoxidasa, extraída
de la leche, diluida en peróxido de hidrógeno en
un buffer de fosfato a pH 7,3 catalizaba la iodación
del radical tiroxina. La optimización del pH repor-
tada por Morrison y col., (94) para esta reacción,
que resultó ser pH 5,0. Este método se ha aplicado
para algunas proteínas inestables, que resultaban -
muy deterioradas al marcadas por el método de Cloramina-T (95).

En los últimos tres años se ha desarrollado
un método de marcaje por conjugación con un agente
acetilado marcado con Iodo radiactivo, (96) que permite
marcar sustancias polipeptídicas que no contienen
residuos de tirosina en su molécula.

c.- Separación del iodo no reactivo y de los productos deteriorados.

Realizada la iodación es necesario separar la proteína marcada del iodo radiactivo que no ha reaccionado y de los productos de degradación de la proteína resultantes.

Existen muchas técnicas de separación como: -- Filtración en Sephadex, Bio-gel, cromatografía de absorción a ciertos silicatos (Quso G.32). Algunos autores emplean técnicas electroforéticas con poliacrilamida o almidón.

Todas estas técnicas se basan en las diferentes propiedades físicas y químicas de los productos. Al separar diversas modalidades pueden ser introducidas -- para cada polipéptido en particular, que incluso pueden variar de laboratorio en laboratorio.

d.- Elección del Isótopo Radioactivo.

El ^{131}I , que se obtiene comercialmente, es producido por el bombardeo con neutrones del Telurio natural y contiene del 20 al 25% de ^{131}I , siendo el resto

^{127}I y ^{129}I . Aunque la cualidad del ^{131}I producido por fisión da mayor abundancia isotópica, produce mayor deterioro en el marcaje. En la iodación de hormonas polipeptídicas, el ^{131}I produce hormonas marcadas de gran actividad específica, como lo demostraron Freedlender (86) y Yallow y Berson (97).

El ^{125}I se obtiene comercialmente en estado libre, irradiando Xelenio, y contiene una abundancia isotópica -- del 95%. Su decaimiento es, principalmente, por captura -- electronica con radiaciones X de baja energía, mientras -- que el ^{131}I emite partículas a cuatro niveles de energía, lo que constituye una ventaja en la elección de ^{125}I , ya -- que produce una menor radiación en el ambiente.

Por otra parte, la vida media del isótopo y la -- eficacia del contador empleado en su medición, son factores que van a influir en su elección. En cuanto a la eficacia, la mayoría de los sistemas de contaje de radiaciones son -- más eficaces para ^{125}I que para ^{131}I , ya que este último -- proporciona 80 fotones por 100 desintegraciones, mientras que el ^{125}I da 114 fotones.

La larga vida media del ^{125}I (60 días en compara-- ción con la del ^{131}I , de 8 días) hace posible el manteni-- miento de la hormona marcada en el congelador para su uso en múltiples ensayos.

La sensibilidad de los ensayos se incrementa con el uso de ^{125}I , pues se requiere menor cantidad de hormona marcada con ^{125}I que con ^{131}I para tener un mismo contaje.

Todos estos factores citados favorecen el empleo de ^{125}I en la iodación de polipéptidos.

Un fenómeno muy interesante, a tener también en cuenta, es el definido por Yalow y Berson (98) como "decay catastrophe", que ocurre cuando dos átomos de Iodo radiactivo están presentes en diferentes sitios dentro de la misma molécula del polipéptido; en estas condiciones hay gran probabilidad de que las moléculas se alteren por desintegraciones que ocurran en el átomo. Debido a la mayor abundancia isotópica de ^{125}I , la probabilidad de sustitución de dos átomos de Iodo en la misma molécula será mayor que en el caso de ^{131}I . Como ejemplo puede citarse el caso de ACTH marcada con ^{125}I , que tiene mayor deterioro en su almacenamiento que el marcado con ^{131}I , deterioro que se manifiesta en una pérdida de su capacidad de unión por su anticuerpo. (99)

e.- Deterioro producido en la Iodación.

En los primeros ensayos realizados con 30-80 mCi

de I^{131} el deterioro era similar al producido por irradiación con rayos X o con radio (100). Actualmente, debido a que se usan muy pequeñas cantidades de radioactividad (1-2mCi), no existe el problema de deterioro por radiación. Sin embargo la introducción de Iodo radioactivo o Iodo "frio" en el anillo aromático de tirosina - puede causar daños, producidos por cambios estructurales, que disminuyan la actividad biológica e inmunológica de la hormona e incluso inhibirla totalmente (91).

Estos efectos se observaron sustituyendo cantidades crecientes de Iodo "frio" (en forma de Ioduro potásico) con una pequeña cantidad de Iodo radioactivo y determinando el máximo Iodo que puede sustituirse sin que haya alteración de la inmunoreactividad de la hormona. Otros compuestos usados en el marcaje pueden también dañar el polipéptido; Yalow y col., (101) comunicaron que la incubación durante unos minutos de I^{125} -HCG con cloramina-T en la concentración usada durante el marcaje, produjo un tanto por ciento muy elevado de deterioro de la hormona. La exposición de oxitocina a Metabisulfito sódico provocó una alteración en la migración de I^{131} -oxitocina durante la cromatografía en capa fina. -- (102)

La calidad del isótopo radioactivo es también - un factor muy importante a considerar, (102). Si el -- Iodo radioactivo contiene cantidades pequeñas de sulfito para mantenerlo en un estado reducido, por lo que al cabo del tiempo, cuando se proceda a la reacción de marcaje, - puede contener sulfato que oxidaría el Iodo a Iodato e imposibilitaría la reacción. Aún no se conocen las impurezas que, al estar presentes en la solución del isótopo - radioactivo, provocan el deterioro en la iodación.

f.- Determinación del deterioro de los péptidos marcados.

La cantidad de deterioro producido durante el marcaje pueden determinarse por métodos físicos y por inmuno--reactividad.

Métodos físicos.

El método cromatoelectroforético de Berson y col., (6) es una técnica buena para la standarización de la - evaluación del deterioro producido en el polipéptido durante el marcaje, aunque en algunos casos, como en la insulinasulina, la pérdida de inmunoreactividad de la -- hormona no va acompañada de disminución de absorción - al papel. Sin embargo, un índice de pureza del 95% de terminado cromatoelectroforéticamente, generalmente indica una buena actividad inmunológica de la hormona -

en el ensayo. El método de charcol activado con dextrano, junto con otros métodos como el empleo de silicatos, (103) filtración en gel con Sephadex o Biogel, cromatografía, o columnas de celulosa, (Whistman DE11, DE23, - CM11, CH22) pueden ser usadas para separar la hormona - dañada de la no dañada.

Estos métodos físicos son muy rápidos, aunque - presenten el inconveniente, como en el caso de la cromatoelectroforesis, de no medir directamente la actividad inmunológica.

Inmunoreactividad.

El deterioro producido en una hormona durante su marcaje puede reducir la capacidad de la hormona marcada en su unión con su anticuerpo específico. Esto -- puede determinarse incubando la hormona marcada con un exceso de anticuerpo y aplicando un sistema bueno para separar la hormona ligada de la libre. El deterioro que se determina por este método será la suma del producido durante el marcaje más el producido durante la incubación. Es preciso, en cada ensayo determinado, controlar la máxima unión en exceso de anticuerpo.

g.- Deterioro de la Hormona marcada en la incubación.

Uno de los factores no específicos, que influyen -- en la sensibilidad de un radioinmunoensayo, es el deterioro que se produce en la hormona marcada, durante su incubación con el anticuerpo específico en presencia de plasma, suero u otros fluidos biológicos. Las porciones dañadas pierden su integridad y el resultado es una reducción en la unión de la hormona marcada con el anticuerpo y en la separación de la hormona ligada al anticuerpo de la no ligada. Una de las causas del deterioro, producido durante la incubación, es la presencia de enzimas proteolíticos -- presentes en el plasma o suero de las muestras a valorar, que pueden afectar también a la hormona endógena no marcada presente en la muestra, aunque en menor proporción. Cantidades grandes de plasma o suero producen un deterioro -- muy grande. Para controlar estos efectos, es preciso incluir en el ensayo unos tubos "control" que contengan todos los reactivos, excepto el primer anticuerpo.

En algunas determinaciones se añaden sustancias -- que disminuyen el daño de la hormona marcada durante la -- incubación, como mercaptoetanol (0.5%) para ACTH, 500 -- KIU Trasylol/ml para PTH y Glucagon y ácido aminocaproico

más Trasylol para calcitonina. En el caso de FSH y Lh no se añade ningún producto. En los ensayos de insulina y hormona de crecimiento, los efectos son mínimos, ya que se usan diluciones altas de plasma. Algunos autores intercalan en el ensayo tubos de control para cada plasma o suero, ya que el deterioro ocasionado puede depender de cada muestra por separado.

I. 9. SISTEMA PARA SEPARAR LA HORMONA LIGADA AL
ANTICUERPO Y LA NO LIGADA

Aunque algunas reacciones antígeno-anticuerpo precipitan cuando la concentración de los reactivos es muy alta, en las condiciones en que se trabaja en un radioinmunoensayo esto no se verifica, ya que la concentración es baja, por lo que el complejo antígeno-anticuerpo permanece en la solución y es preciso separarlos por otros medios. El método usado tiene que separar claramente los diversos componentes, no ser influenciado por los factores no-específicos, ser efectivo con largos volúmenes en la incubación y ser sencillo y rápido de manejar. Hay que tener en cuenta también la reproductibilidad, el coste de material a emplear etc... Se han empleado una gran variedad de técnicas basadas en propiedades físicas y químicas, que pueden agruparse de la manera siguiente:

- a.- Método electroforético y cromatografía electroforética.
- b.- Adsorción con adsorbentes sólidos.
- c.- Adsorción en base sólida.
- d.- Filtración en gel.
- e.- Precipitación no específica del complejo antígeno-anticuerpo.
- f.- Inmunoprecipitación del complejo antígeno-anticuerpo. Método de doble anticuerpo.

a.- Métodos electroforéticos y cromatoelectroforéticos.

Estos métodos se aplicaron en los primeros trabajos de Yallow y Berson (17) en el radioinmunoanálisis de insulina. En una cromatografía y electroforesis combinada, algunas hormonas se adsorben fuertemente al papel electroforético (Whatman 3MM y 3MC), mientras que las hormonas unidas al anticuerpo migran con las globulinas séricas.

Este método presenta muchos inconvenientes técnicos, ya que es un proceso lento y requiere ciertas condiciones especiales en su montaje, y ha sido superado por métodos más modernos y cómodos.

b.- Adsorción con adsorbentes sólidos.

Se basa, este método en la adsorción por un material insoluble de la hormona marcada libre al final de la primera reacción.. Los adsorbentes más usados son: charcol, talco, micro granos de silica (QUSO) florisil y algunas resinas, que son capaces de ligar instantaneamente ciertas hormonas polipeptídicas y esteroides.

Este método es muy cómodo por su rapidez, facilidad de separación, su reducido coste, y no requiere una gran

actividad específica de la hormona marcada. Para evitar la pequeña afinidad que pueden tener estas sustancias adsorbentes (charcol, talco, etc..) por el complejo antígeno-anticuerpo, se suelen tratar antes de su uso en el ensayo con sustancias especiales o añadiendo proteínas al sistema. En el caso especial del charcol, se le pretrata con dextrano de peso molecular de 10.000 a 250.000 según el tamaño menor o mayor, respectivamente, del antígeno, o se aumenta la concentración de proteínas en la mezcla para evitar la adsorción no específica del complejo en el charcol.(103)

El adsorbente QUSO, G-32 fué utilizado por Rosselin y col.: (104)

Una nueva modificación de este método, consiste en los ensayos inmunoradiométricos (105), en los que los anticuerpos se preparan por inmunoadsorbencia y elución. En estos ensayos, se marcan los anticuerpos y la hormona no marcada puede unirse al anticuerpo marcado. El antícuerpo marcado libre se separa por adición de la hormona unida a celulosa durante un minuto. Este método es muy útil en los casos especiales en los que hay dificultad de del marcaje de la hormona.

c.- Adsorción en fase sólida.

Uno de los más recientes métodos de separación con siste en la fijación del anticuerpo a materiales insolu -- bles, de este modo el antígeno unido al anticuerpo puede -- separarse fácilmente por decantación o por centrifugación; la unión que se produce es rápida e irreversible y la técnica es fácil de manejar aunque ofrece el inconveniente -- del gran coste de los tubos del ensayo.

El método más sencillo para fijar los anticuerpos, es la formación de agregados con etil-cloroformato o gluta aldehido. Esto se ha aplicado con muy buenos resultados a ensayos de LH, HCG y FSH (106)(107). En otras variacio-- nes del método, Catt (81) introduce la utilización de dis-- cos de Protapol DI/1 (para la fijación del primer anticuer po) o tubos de poliestireno o polipropileno (108). Para -- el caso de la angiotensina, Goodfriend (109) encontró que este método de separación es el más sensible de todos los usados.

La fijación de los anticuerpos puede realizarse -- también en matrices de carbohidratos, como dextrano (110) o agarosa, que deben de ser activados con cianógeno de bro mo. Otra matriz de fijación puede consistir en lechos de poliacrilamida.

d.- Filtración en Gel.

Como los complejos antígeno-anticuerpo tienen un peso molecular mayor que el antígeno libre marcado, se podrán separar perfectamente a través del gel. Esta separación se ha usado en los estudios de esteroides y en los análisis de desplazamiento competitivo. Genuth y col. (111) utilizaron microcolumnas de Sephadex G-75 para separar insulina libre de la ligada en sus radioinmunoensayos. La puesta en marcha de esta técnica requeriría el montaje de varias microcolumnas y por tanto se gastaría excesivo espacio y tiempo para la recogida de los eluatos, por lo que no resulta rentable.

e.- Precipitación no específica.

Este método consiste en la precipitación no específica del complejo antígeno-anticuerpo en condiciones tales que el antígeno marcado libre se queda en la solución. Grodsky y Forsham (112) precipitaron insulina ligada en una concentración del 17% de sulfito sódico, pero una cierta cantidad considerable de insulina no ligada quedaba incluida en el precipitado y pequeños cambios en las condiciones experimentales alteraban el grado de separación. En el caso de pequeños antígenos, esteroides, prostaglandinas, c-AMP, se utiliza una solución de sulfato amónico al 50%.

En el ensayo original de Odell, Wilber y Paul (113), precipitaron el complejo en una solución de etanol al 55% y de cloruro sódico al 5%.

f.- Inmunoprecipitación del método del doble anticuerpo.

La base de este método consiste en la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo de la primera reacción por la adición de un segundo anticuerpo contra las globulinas del primero, para dar un complejo insoluble (antígeno-primer anticuerpo-segundo anticuerpo). De esta forma se logra una separación completa del complejo, que puede hacerse por técnicas físicas de centrifugación o de filtración en filtros millipore. Un problema inherente a este método es que los sueros humanos pueden alterar la reacción del segundo anticuerpo. La explicación de este fenómeno, dependiente de la temperatura y de la concentración de EDTA a que se realiza el ensayo, fue interpretada por Burr y col. (114), admitiendo la presencia de una euglobulina, lábil al calor, perteneciente al sistema de complemento, y que actuaría facilitando la precipitación de los agregados de globulina. En este método el EDTA minimiza la acción del complemento (115) y, a su vez, potencia el tampón de ensayo estabilizando el pH.

Para standarizar un radioirmunoensayo basado en este método de separación es preciso evaluar la concentración óptima de segundo anticuerpo, que es aquélla que dé una máxima precipitación, y mantener siempre la cantidad de suero presente en el ensayo constante.

La presencia de suero en este método, suele deteriorar la hormona marcada durante la incubación, pero como Daughaday y Jacobs (116) expusieron, si la hormona marcada es de buena calidad y la concentración del suero en los tubos es menor que 10%, este efecto no es necesario tenerlo en cuenta.

Las ventajas que ofrece este método son que además de ser aplicables a los análisis de todas las hormonas, realiza una separación completa del complejo, es aplicable a volúmenes grandes es sencillo, preciso y barato.

g.- Elección de un método de separación.

Cada uno de los métodos descritos ofrecen sus ventajas e inconvenientes. En todos ellos es conveniente que la concentración de proteínas, y la concentración de todos los componentes de la reacción sea lo más homogénea posible

(116), ya que las más pequeñas alteraciones en la hormona marcada, anticuerpo, concentración iónica y concentración de suero pueden alterar la eficacia de la separación.

Es muy importante que en todos los sistemas, los efectos de proteínas presentes sean mínimos, que la velocidad con que actúen sean lo más rápida posible y que el deterioro de la hormona marcada en la incubación sea lo menor posible. (117)

Antes de comenzar a aplicar un método rutinariamente debe de controlarse todos los efectos mencionados e incluso sería muy práctico comparar los resultados obtenidos con diversos sistemas de separación.

I. 10. EXTRACCION Y CONCENTRACION DE HORMONAS POLIPEPTIDICAS

La metodología empleada para la extracción y purificación de hormonas polipéptidicas está íntimamente relacionada con el estado de la proteína y su estructura química. Las técnicas usadas se basan en experiencias, con éxito o sin él, realizadas por muchos investigadores en los últimos 50 años.

1.- En tejidos.

El método elegido está determinado por un número de factores, como la facilidad de obtención del tejido, la estabilidad de la hormona, y la presencia de otras hormonas o enzimas. (118)

Una vez extirpados los tejidos del animal, se procede a la extracción; el líquido empleado en la extracción ha de ser tal que sea soluble en el solvente en que se ha de diluir posteriormente la hormona. La extracción se basará en las propiedades de solubilidad de la hormona, en sus características anfóteras y en su peso molecular.

Las extracciones basadas en la solubilidad son las clásicas técnicas: de fraccionamiento de proteínas por el

uso de sales, con NaCl, Na_2SO_4 , y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el uso de disolventes orgánicos como alcohol, acetona para precipitación de proteínas y fraccionamientos de extractos por ajustes de pH. Estos métodos son muy útiles para el preparado de concentrados crudos que posteriormente serán purificados.

Las purificaciones posteriores de estos extractos se han realizado usando cambiadores de iones, como cambiadores de celulosa, de carboximetil celulosa (CM) y dietilaminoetil-celulosa (DEAE-), derivados de Sephadex y Amberlite IRC-50.

Otra técnica usada recientemente es la Filtración en gel; los tipos más usados son Sephadex y Bio-gel.

Cualquiera que sea el método elegido, debe ser lo más sencillo y rápido posible y debe de proporcionar una buena cantidad de hormona pura. En paralelo con estas técnicas se han de desarrollar otras que permiten la caracterización inmunológica y biológica de las hormonas purificadas. (118)

2.- Del plasma.

La extracción de hormonas polipéptidas del plasma se ha usado, generalmente, con el fin de concentrar la --

hormona en un determinado volumen de tal modo que pueda - medirse en un ensayo específico.

Las técnicas más frecuentes son:

- a) Precipitación por calor.- Algunos péptidos, estables al calor, pueden precipitarse alcanzando temperaturas altas, 100°C, en pH 5, y después separar las proteínas desnaturalizadas por centrifugación. Coch y col usaron este método para la oxitocina. (119)

- b) Solventes orgánicos.- Este método consiste en añadir el plasma a 4 volúmenes de alcohol ácido, acetona o una mezcla de las dos, ya que algunas proteínas son solubles en el sobrenadante mientras otras precipitan. El precipitado se separa por centrifugación o precipitación y el disolvente se remueve por evaporación a 40°C si la proteína es estable a esa temperatura. Este método ha tenido éxito en la extracción de ACTH, por Parrott (120), Yallow (121) y Demara (122) y en gonadotropinas por Apostolaskis (123), Keller y Rosenberg (124).

- c) Precipitación ácida.- El método más comunmente usado es la precipitación de proteínas por ácido tricloroacético en una concentración del 7,5 a 25%. Oxitocina --

y vasopresina se han extraído con éxito usando este método. (125)

- d) Repartición en dos solventes.-- Este método se basa en la separación de los componentes de una mezcla por repartición cuantitativa en dos fases diferentes, una orgánica y otra inorgánica (generalmente acuosa), según su coeficiente de repartición, característico de cada sustancia en particular. Este método no debe aplicarse como una primera etapa de extracción sino en un segundo paso, por ejemplo después de una precipitación por etanol.

Este método ha sido aplicado por Yamashiro en 1.964 con éxito en la separación de oxitocina. (126)

- e) Diálisis.-- Se basa en que algunas hormonas polipeptídicas son lo suficientemente pequeñas para poder pasar a través de celofan Visking. Sin embargo esta técnica presenta muchos inconvenientes y no ha sido usada. (127)

- f) Filtración en gel.-- El uso de geles, como Sephadex o Biogel es muy importante en los últimos pasos de purificación de polipéptidos; con geles que tienen poros

muy pequeños, como Sephadex G-10 y Biogel P-2, se pueden separar péptidos de peso molecular alrededor de -- 1.000.(128)

g) Electroforesis.-- La electroforesis se usa, generalmente para el control de la pureza de la hormona procedente de plasma o para su identificación comparando su posición con respecto a un standard puro. Se utiliza papel o acetato de celulosa. (127)

h) Adsorción.-- 1.- No específica: consiste en la propiedad de algunos adsorbentes, como el charcol, polvos de talco, de adsorber sustancias protéicas. (128)

2.- Inmunoadsorbentes específicos: Anti--cuerpos unidos a adsorbentes sólidos tienen capacidad para unirse con proteínas específicas. (129)

I. 11. FACTORES QUE AFECTAN LA VALIDEZ DE UN RADIOINMUNOENSAYO

Para demostrar que un ensayo es válido, se debe de comprobar que la hormona endógena, presente en la muestra - a valorar, y la hormona usada en las diluciones standards - reaccionan de forma idéntica con el anticuerpo y que, en las condiciones del análisis, otras sustancias presentes en el plasma o suero no interfieren en el ensayo (130). Por otra parte, los resultados de muestras de pacientes deben de -- coincidir con sus diversos estados patológicos, y con los niveles esperados después de un tratamiento terapéutico -- con hormona exógena.

Una condición necesaria, aunque no suficiente, para comprobar el comportamiento idéntico de la hormona standard y la hormona de la muestra, es que las gráficas obtenidas al representar diferentes diluciones del plasma o -- suero en función de las concentraciones encontradas (al referir los resultados a la curva standard) sean líneas rectas, lo que significa que la concentración de la hormona - en el suero o plasma es independiente de la dilución empleada en la valoración .(130) Esto es equivalente a decir -- que existe un paralelismo entre la curva standard y la curva de dilución de la muestra.

Cuando no se cumple esta condición de linealidad, diferentes factores se deben de considerar. Estos se pueden agrupar en la forma siguiente:

1.- Factores no específicos:

- a) El medio iónico en el ensayo.

En algunos ensayos, la reacción antígeno-anticuerpo -- puede ser influenciada por la naturaleza de tampon o por la concentración salina del plasma, suero u orina. (131)

Deben hacerse siempre experimentos de control para ver los efectos no específicos de la muestra a valorar; -- uno muy práctico consiste en diluir la hormona standard en diferentes diluciones de plasma o suero y calcular las valoraciones obtenidas en la relación B/F; si los valores de B/F son mayores en las soluciones más diluídas significa -- que hay un efecto salino, que puede compensarse con el empleo de tampon con una determinada concentración de NaCl.

Si la sensibilidad del ensayo es tal que permite valoración de muestras en diluciones de 1:10 o mayores no deben de tenerse en cuenta estos efectos, pero en los ensayos que sólo permitan diluciones menores es conveniente diluir los standards en plasmas o sueros que no contengan la

hormona específica del ensayo (101). Estos plasmas pueden obtenerse de pacientes con una deficiencia hormonal o de pacientes normales cuya secreción hormonal haya sido suprimida por un apropiado inhibidor; otro tipo de plasma que puede usarse es un plasma muy antiguo ya que las enzimas proteolíticas destruyen las hormonas polipéptidas con el tiempo, o también plasmas sometidos al tratamiento con adsorbentes específicos de algunas hormonas.

b) Heparina.

Teniendo en cuenta que la heparina es un polianión fuerte, es lógico pensar que puede ejercer una acción salina, inhibiendo la reacción antígeno-anticuerpo (132). Generalmente debido a la baja concentración que se usa en la extracción del plasma no suele tener ningún efecto.

c) Ph.

El complejo antígeno-anticuerpo se disocia en medios muy ácidos o muy básicos. La mayor parte de los radioinmunoensayos son estables en un pH comprendido entre 7,4 y 8,6.

d) Hormona marcada deteriorada en la incubación.

El último factor que debe ser considerado es el deterioro de la hormona marcada en los standards, en las diluciones

del plasma o suero o en diferentes muestras, este deterioro es producido por las enzimas proteolíticas y puede manifestarse de varias formas: por alteración de adsorción de la hormona marcada al adsorbente usado en el ensayo, -- por reducción de la unión con el anticuerpo, etc.

Para impedir este efecto durante la incubación se añaden agentes protectores, como Trasylol, mercaptoetanol etc.(130)

Su control se hace añadiendo al ensayo tubos que no tengan el anticuerpo específico. El deterioro que produce disminución en la unión con el anticuerpo se controla añadiendo exceso de anticuerpo en los tubos control al final del período de la incubación.

2.- Factores que causan competición inmunológica no específica.-

- a) Reacción cruzada entre hormonas de diferentes especies y fragmentos hormonales.

Algunos anticuerpos son capaces de distinguir hormonas que son extraídas de diferentes especies animales, y que solamente se diferencian estructuralmente en algún residuo o residuos de aminoácidos teniendo posiblemente la misma potencia biológica. En los ensayos realizados con estos anticuerpos, no se obtendrá linearización en las curvas de --

dilución de la muestra, si la hormona usada como standard es de diferente especie a la hormona endógena que se pretende valorar (133). Otro aspecto interesante a considerar es la existencia de fragmentos hormonales en la circu-lación que algunos antisueros no reconocen, como en el caso de la gastrina, (134) y por tanto son irreconocibles inmunológicamente.

b) Reactividad cruzada entre diversas hormonas polipéptidicas:

Debido a que muchas hormonas polipéptidas poseen deter-minantes antigénicos comunes, es posible que en la valora-ción de una en particular interfieran las demás. Para el control de estas interferencias hay que hacer curvas -- standards, variando la hormona standard y la hormona mar-cada. Este problema se estudió más ampliamente en: Titu-lación de Anticuerpo.

c) Heterogeneidad de las hormonas en plasma, suero o stan-dard.

Algunas hormonas en particular (PTH, insulina y gastri-na) (135,136 y 137) han planteado problemas de heteroge--neidad, tanto en extractos pituitarios como en plasma, de-bido a su posibilidad de plantearse bajo diferentes formas

estructurales que difieren únicamente en algún aminoácido. Esto ha sido demostrado y comprobado al obtener de un mismo plasma valores muy discrepantes de la hormona estudiada, al ser analizado en radioinmunoensayos empleando diferentes anticuerpos.

I. 12. CRITERIOS DE EVALUACION DE UNA CURVA STANDARD

Los criterios de evaluación de la curva standard son numerosos y complejos, y dependen de la elección del sistema de coordenadas.

En general, se puede decir que toda curva standard debe de reunir las máximas condiciones de: sensibilidad, precisión, reproductibilidad y exactitud.

SENSIBILIDAD.

Debido a las múltiples controversias existentes entre diferentes autores, para definir la sensibilidad de un ensayo (Ekins y Newman, 1.970) (22), es necesario señalar los parámetros fundamentales de toda curva standard - que van a influir sobre sus características.

a) PENDIENTE DE LA CURVA.

La pendiente de la curva como definición de la sensibilidad fué establecida por Berson y Yallow (104) estableciendo que cuanto mayor sea la pendiente de la curva mayor será su sensibilidad.

En las representaciones gráficas de Scatchard o en las de logit-log, la pendiente es constante; sin embargo en muchos casos la pendiente es variable en cada punto

de la curva, y entonces tendremos que referirnos a la pen
diente correspondiente al punto cuya concentración en hormona
fria es cero (tubos cero) (138, 139).

Aunque este parámetro no debe de tomarse como índice
de sensibilidad y precisión, es fundamental en la --
evaluación de la curva.

b) ORDENADA EN EL ORIGEN (INTERSECCION EN EL EJE OY)

Un buen índice de una "buena" curva standard, es
que la respuesta en ausencia de hormona fria (tubos cero)
sea muy alta, ya que así una pequeña cantidad de hormona
fria provocaría una disminución significativa en relación
con la respuesta anterior. Existen exposiciones algebráicas
que definen este parámetro, según las coordenadas elegidas. (138)

c) PUNTO MEDIO.

Es el punto correspondiente a una determinada --
concentración de hormona fria tal que su respuesta produce
una reducción del 50% del valor inicial. En la representación
gráfica es el punto de intersección en el eje -
OX correspondiente a un valor en el eje de la OY: $B/B_0 =$
50%, o a $\text{logit-log } B/B_0 = 0$.

Este parámetro, según Borth, (140) define el orden de magnitud de la escala de concentraciones que se utilizan en el estudio de la curva.

d) COEFICIENTE LAMBDA = λ

Este concepto, introducido por Gaddum (141), define, en cada punto de la curva, la desviación standard de la respuesta variable partido por la pendiente de la curva en ese punto. Puesto que la curva puede considerarse una línea recta en una zona pequeña alrededor del punto, este coeficiente nos da una medida de la desviación standard o del coeficiente de variación del resultado de una muestra a valorar en ese punto.

e) LIMITES DE DETECCION.

Se define como la mínima dosis detectable de hormona fría capaz de producir una respuesta significativamente distinta de la producida por las soluciones que no contienen hormona fría (tubos cero). Por respuesta significativamente distinta entendemos que ha de ser la correspondiente al punto, con una desviación standard igual a la de los tubos cero, multiplicado por un valor significativo de la t de Student (aproximadamente 2) (140, 142).

PRECISION.

Midgley (1.969) (143) define precisión como: la medida en que una serie de resultados correspondientes a la valoración de una muestra coinciden con el valor medio, y la expresa como la cantidad de variación en su estimación.

Este término refleja la reproducibilidad de la medida y generalmente se representa como la desviación standard de las estimaciones de los replicados (duplicados, triplicados etc...), suponiendo que se distribuyen normalmente respecto a la media.

Como Midgley indica, no puede hablarse de la precisión de un ensayo, en un sentido general, ya que cada punto de la curva tiene su desviación standard diferente.

Los índices de sensibilidad y precisión de un ensayo deben darse siempre asociados, y el experimentador debe de intentar conseguir detectar la mínima dosis de hormona fría con la máxima precisión.

EXACTITUD.

Es la medida en que una concentración conocida y standarizada de hormona coincide con el valor media en el ensayo.

A veces, se usan los resultados de los correspondientes bioensayos como referencia.

Así muestras de origen urinario medidos en bioensayos y en radioinmunoensayos empleando standard de orina, han mostrado excelentes concordancias (Ryan 1.969) (144), del mismo modo que extractos pituitarios parcialmente purificados, con diferentes contenidos en LH, FSH, y TSH, - usando como standards preparaciones de origen hipofisario.

Un buen método para determinar la exactitud relativa es comparar resultados obtenidos en diferentes radioinmunoensayos.

REPRODUCIBILIDAD.

Es la variabilidad en los resultados de una misma muestra:

- a) En un mismo ensayo.
- b) Entre ensayos diferentes.
- c) Entre las diferentes personas técnicas que lo realizan.

(Bliss 1970) (145) (Finney 1.964) (25).

Los métodos usados en el estudio de la reproducibilidad de un ensayo se estudiarán en el apartado correspondiente a control de calidad.

Factores que influyen en la sensibilidad, precisión y exactitud.

Todos los parámetros anteriormente citados, que definen la sensibilidad, precisión y exactitud de un ensayo, están influenciados por:

- 1) La concentración de los reactivos (anticuerpo, hormona marcada etc.)
- 2) La constante de afinidad del anticuerpo (K).
- 3) El error del contaje (dependiente de la actividad específica, de la hormona marcada, del tiempo de contaje y del volumen de la mezcla)
- 4) El error experimental (dependiente del experimentador).

Ekins y Newman (22) han establecido una Teoría matemática de los análisis de saturación, en la que aportan ecuaciones matemáticas que relacionan los factores citados con el fin de conseguir una máxima sensibilidad, precisión y especificidad.

El límite de detección de un ensayo depende de la energía de la reacción del anticuerpo (K= constante de equilibrio) y según Ekins (22) viene definido por la expresión

ϵ/K , siendo ϵ el error experimental. Una manera experimental de preveer este límite consiste en realizar diferentes curvas de dilución del anticuerpo con diferentes concentraciones de hormona marcada (como vimos en el capítulo de Titulación de anticuerpos). La concentración mínima de hormona marcada que es capaz de distinguir el anticuerpo coincidirá con la mínima dosis capaz de valorarse en el ensayo (102).

De este modo, es conveniente usar pequeñas cantidades de hormona marcada, lo que requiere que su actividad específica sea grande, para tener suficiente radioactividad con la mínima concentración, en un tiempo determinado.

Otras formas de mejorar el límite de detección y los demás parámetros consisten en aumentar el volumen de la mezcla en el ensayo, y en la adición tardía de la hormona marcada; esto último es válido siempre que la constante de velocidad de reacción inversa entre Ag y Ab sea pequeña en relación con la constante de asociación.

La concentración del anticuerpo que debe usarse en el ensayo, debe de ser la correspondiente a un valor de B/F aproximadamente de 1.0, pues una buena competición requiere -

que los sitios de unión del anticuerpo estén saturados. - En estos casos la concentración de anticuerpo es baja, y es importante que el tiempo de incubación sea lo suficiente para que la reacción alcance el equilibrio.

Sin embargo, la máxima precisión se obtendría con concentraciones altas de anticuerpo, aunque existe un límite en esta consideración ya que los anticuerpos son heterogéneos y a grandes dosis podrían haber reacciones cruzadas con otras hormonas que no interesa medir en el ensayo y se obtendrían resultados erróneos. (73)

Cuando interesa medir concentraciones altas de -- hormona, el sistema debe de ser más preciso que sensible, por lo que se elegiría una concentración de anticuerpo mayor que la usada en los ensayos que son capaces de detectar dosis muy pequeñas.

I. 13. CONTROL ESTADISTICO DE UN RADIOINMUNOENSAYO Y SISTEMAS DE AUTOMATIZACION DE LOS RESULTADOS.

Es esencial el estudio de la calidad de todo radioinmunoensayo, para evaluar su estabilidad y reproducibilidad.

Para ello es necesario disponer de dos mezclas de sueros procedentes de varios pacientes y analizarlos, por duplicado o triplicado, en cada ensayo. Aplicando las fórmulas y criterios de evaluación establecidas por Rodbard (146), con los resultados obtenidos, se puede:

- 1.- Construir gráficas de control que expresen en abscisas el número de ensayos y en ordenadas los resultados obtenidos. Junto con estas gráficas es conveniente añadir las diferentes características de la curva standard, obtenidas en cada ensayo (pendiente, intersección con el eje -OX, etc...).
- 2.- Calcular la variabilidad de los resultados en un mismo ensayo (Reproducibilidad inter-ensayo).
- 3.- Calcular la variabilidad de los resultados en diferentes ensayos (Reproducibilidad intra-ensayo).
- 4.- Analizar el paralelismo entre las muestras a valorar y las soluciones standard.

Debido al gran número de muestras que se pueden valorar en un radioinmunoensayo se han estudiado diversos sistemas de computación automática (146, 147). Con estos sistemas

que generalmente se basan en la transformación lineal logit-log, se pueden calcular automáticamente los resultados en las muestras a valorar, dentro de unos límites de confianza establecidos (normalmente se usa - el 95%), así como todas las características que determinan la curva standard.

I. 14. DIFERENCIA ENTRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA

Antes de descubrirse el Radioinmunoensayo como el método más idóneo para la valoración de gonadotropinas, - se usaban los métodos biológicos para su detección.

Las gonadotropinas, extraídas de la orina, precipitadas y purificadas, se inyectaban a ratas inmaduras y se observaba el peso del ovario (148) El método más sensible para LH es el de Parlow (149) que consiste en inyectar intravenosamente a ratas pseudoembarazadas los extractos purificados y determinar la depleción del ácido ascórbico en el ovario. Otro ensayo consistía en inyectar a ratas hipofisectomizadas el material a valorar y observar el crecimiento de la próstata. (150)

Los valores obtenidos por estos ensayos biológicos no siempre coinciden con los obtenidos por métodos inmunológicos debido a los siguientes factores:

- 1.- En las manipulaciones de extracción y manipulación pueden destruirse las propiedades biológica y sin embargo mantenerse las inmunológicas (151)
- 2.- Las discrepancias pueden depender del anticuerpo usado en el radioinmunoensayo. (144)

3.- El patrón elegido como referencia puede ser de origen urinario o pituitario. En el caso de LH o FSH el patrón que normalmente se usa es el internacional de orina procedente de mujer menopaúsica (2nd IRP-HMG). Los valores correspondientes a extractos pituitarios en referencia a este patrón son mayores en los ensayos biológicos que en los radioinmunoensayos. Esta diferencia disminuye cuando el patrón elegido es el procedente de pituitaria humana (52). Otra forma de expresar los resultados es tomar como referencia los extractos pituitarios en unidades de peso (μg o μg).

II. HORMONAS PITUITARIAS E HIPOTALAMICAS. CARACTERI-
ZACION BIOQUIMICA DE FSH, LH Y SUS HORMONAS LI-
BERADORAS.

II. 1. Generalidades

La pituitaria es una glándula de secreción interna asentada en la silla turca, una concavidad del hueso esfenoides; está constituida por tres zonas muy definidas : la parte anterior o adenohipófisis que está relacionada con el hipotálamo a través de los vasos portales hipotalamo-hipofisario, la parte posterior o neurohipófisis inervada por fibras desde los núcleos paraventricular o supraóptico del hipotálamo y la parte intermedia o lóbulo intermedio, que se adhiere a la parte anterior en la edad adulta (153,154).

La adenohipófisis es una confederación de varias unidades funcionalmente independientes, cada una compuesta de un tipo de células que sintetizan y segregan las hormonas polipeptídicas. La clasificación tradicional de esta células, en función de la reacción manifiesta en el tinte con hematoxilina o eosina, en acidófilas, basófilas y cromófobas, no es adecuada para explicar la liberación

independiente de las seis hormonas conocidas y de la secreción de otros péptidos, cuya significación fisiológica aún no está establecida. Es más lógico clasificar las células según las hormonas conocidas que segregan, - que actualmente son las siguientes : somatotropina u hormona de crecimiento (GH), corticotropina (ACTH), tirotropina (TSH), prolactina (PRL), hormona folicular (FSH), hormona luteinizante (LH), y hormona estimulante de melanocitos (MSH) (155,156).

II. 2. Analogía estructural entre las Hormonas Glicoproteicas : FSH, LH, y HCG

Las hormonas FSH, LH, TSH, junto con la hormona placentaria HCG están constituidas por cadenas constituidas por cadenas polipeptídicas con grupos sustitutivos de carbohidratos, en una relación de 15 a 30 % respecto de su peso molecular. Los azúcares que contienen son fucosa, manosa y galactosa, y en su composición intervienen el ácido siálico en una proporción no constante (157,158)

Cada molécula de estas hormonas está formada por dos subunidades designadas por alfa y beta; la secuencia de las cadenas es idéntica o muy similar entre ellas y es la que confiere las funciones más generales, como el transporte o activación de su receptor (159, 160). La subunidad , cuya secuencia es muy diferente de una hormona a otra, da la especificidad a la molécula completa, y posee ligera actividad biológica que la completa con la unión de la cadena (161, 162).

Los híbridos formados por combinación de una subunidad α de una hormona y de la β de otra, poseen la actividad biológica propia de la que dona la subunidad β ; así el híbrido formado por la unión de la cadena α de TSH y de la β de LH, poseerá actividad luteneizante (163). El conocimiento de la semejanza estructural de las cadenas α de las hormonas glicoproteicas explica la reacción cruzada entre ellas en su valoración radioinmunológica.

III.3. Caracterización Bioquímica de LH.

Los procedimientos más usados para la extracción de FSH y LH fueron descritos por Wilhelmi en 1.961 (164), por Parlow (165) y por Hartree en 1.966 (166). Uno de los pasos más laboriosos en su extracción es la separación de --

estas dos hormonas, independientemente, sin contaminación entre ellas, y a su vez, la obtención de LH pura sin presencia de TSH. En estas separaciones se usa cromatografía en celulosa DEAE (167) y cromatografía en columna de Sephadex G-100 (158).

Una vez extraídas y purificadas se procedió al estudio de sus características estructurales y bioquímicas. La LH es una hormona glicoprotéica de peso molecular aproximado de 30.00 y con un contenido en carbohidratos del 20% -- (168). Su composición en aminoácidos ha sido calculado por varios autores: Reichert en 1.968 (169) Bell en 1.969 (170), etc.

El contenido en ácido siálico es del 1%; este ácido juega un papel muy importante en la prolongación de la vida media de las glicoproteínas y contribuye a la propiedades biológicas de sus moléculas; al separar este ácido de la molécula de LH, ésta pierde gran parte de su actividad biológica (171).

La LH ovina, bovina, porcina y de rata contienen menos cantidad de ácido siálico que la humana y mayor contenido en prolina. El punto isoeléctrico de LH es de 7,5 y es más ácido el del LH de las especies primates que no primates (172).

Howard y Pierce en 1.969 (162), describieron las dos subunidades de TSH y LH bovinas poniendo de manifiesto las analogías en las secuencias de sus aminoácidos. Las subunidades α de TSH, LH y FSH son muy analógicas y presenta reacción cruzada (161).

El peso molecular de las dos subunidades α y β de LH, estimadas por Reichert en 1.971 (173) son de 15.300 y de 14.600, respectivamente. La secuencia completa de los 96 aminoácidos de la subunidad α y de los 120 de la β de LH - ovina han sido determinados por Sairam, Packoff, LY y col - en 1.972 (174, 175) y 1.973 (176).

II. 4. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE FSH

La FSH es una hormona polipeptídica de peso molecular aproximado de 36.000 (177) y su contenido en carbohidratos es de 25%. La Composición de aminoácidos fué determiado -- por Roos en 1967 (178), por Perckhan y Parlow en 1969 (179).

El 5%, en peso, de FSH humana es de ácido siálico, -- que es necesario para su actividad biológica pero no inmunológica. La molécula de FSH es ácida, con un punto isioelectrico entre 4 y 5 (180) y al parecer no hay diferencias con el de los no-primates.

La LH se inactiva por digestión por quimiotrópica, - mientras la FSH no sufre este proceso (181). Al igual que la LH, la FSH consiste en dos subunidades α y β , inicialmente separadas por Saxena y Rothman (182). La secuencia - de la subunidad α de FSH humana, caracterizada(en 1.974) -- por Shomey y Parlow, (183) tiene 89 aminoácidos y es totalmente idéntica a la subunidad α de LH; la secuencia de la subunidad β , caracterizada por los mismos autores tiene - 115 aminoácidos y presenta más analogía con la subunidad β de TSH que con la subunidad β de LH.

La Tabla 2 muestra la composición de aminoácidos de FSH humano y sus subunidades en comparación con la - composición de LH, TSH humana y sus subunidades (184).

COMPOSICION AMINOACIDA DE FSH Y SUS SUBUNIDADES
COMPARACION CON LAS SUBUNIDADES DE LH Y TSH

INOACIDOS	FSH- α (moles/100 moles de aminoácidos analizados)	LH- α	TSH- α	FSH- β	LH- β	TSH- β	FSH completo
sina	7.3	5.8	4.9	6.2	2.6	6.3	6.1
stidina	3.4	3.3	2.7	3.0	3.2	2.5	2.7
ginina	3.6	4.4	4.4	5.0	12.3	4.7	3.8
ido aspartico	6.4	6.1	7.2	7.9	6.6	8.7	7.6
eonina	8.8	8.6	8.5	10.6	5.6	9.7	9.2
rina	7.8	7.9	8.0	5.7	4.6	5.2	6.7
ido glutamico	9.9	10.7	10.2	9.1	8.5	7.4	10.0
olina	7.3	8.0	8.1	5.5	11.9	6.2	6.1
icina	4.9	4.9	5.5	5.9	3.4	4.5	5.5
anina	5.2	4.5	5.2	6.4	2.8	6.3	6.9
stina	9.9	10.5	7.9	8.9	9.3	7.1	9.1
lina	7.6	8.1	8.3	5.8	9.2	4.2	6.5
tionina	2.9	2.6	2.5	0.6	1.9	1.6	1.7
oleucina	1.2	1.7	2.5	5.1	4.2	7.0	2.6
ucina	4.7	5.1	5.3	5.0	7.4	5.8	5.4
rosina	4.4	3.8	4.3	6.2	2.8	3.8	5.2
nilalanina	4.7	3.9	4.2	3.2	2.5	3.8	3.8
iptófano	---	0.3	---	0.9	1.6	---	1.1

TABLA 2

II. 5. HORMONAS HIPOTALAMICAS

El hipotálamo es un área del diencéfalo situado en la base del cerebro, ventral al tálamo y que forma el suelo y parte de las paredes laterales del tercer ventrículo; anteriormente está limitado por el quiasma óptico y posteriormente por los cuerpos mamilares (185).

Las bases anatómicas del control de la adenohipófisis fueron claramente establecidas por Harris en 1.955 -- (186). Tanto en el hombre como en los demás mamíferos e incluso en los vertebrados inferiores, la conexión entre el hipotálamo y la adenohipófisis se establece a través - de un sistema porta sanguíneo; la teoría más aceptada explica esta conexión del modo siguiente: las terminaciones nerviosas de las células de los núcleos hipotalámicos liberan sustancias hormonales, en los capilares de la eminencia media, que se distribuyen en las venas del tallo y son transportadas a la adenohipófisis a través de un segundo "plexus" de capilares que forman el sistema porta hipofiso-hipotalámico.

La acción de estas sustancias hipotalámicas es la estimulación o inhibición de la síntesis y secreción de las

hormonas pituitarias, por lo que se las denomina: Hormonas liberadoras o inhibidoras hipotalámicas; (187).

Las hormonas liberadoras conocidas, hasta el presente son las siguientes:

Hormona liberadora de la corticotropina (ACTH): CRH o CRF

Hormona liberadora de la tirotropina (TSH): TRH o TRF

Hormona liberadora de la hormona luteneizante (LH) y de la hormona foliculo-estimulante (FSH): LH-RH o LH-RF

Hormona liberadora de la hormona de crecimiento(GH): GH-RH o GH-RF

Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento(GH): GIH o GIF

Hormona liberadora de la Prolactina (PRL): PRH o PRF

Hormona inhibidora de la Prolactina (PRL): PIH o PIF

Hormona liberadora de la hormona melanocito-estimulante -- (MSH): MRH o MRF

Hormona inhibidora de la hormona melanocito-estimulante -- (MSH): MIH o MIF

De todas estas hormonas, solamente tres de ellas han sido aisladas y caracterizadas y sintetizadas:

TRH : es un tripéptido, aislado de extractos hipotalámicos porcinos y caracterizado por Schally y col en 1.969 y 1.970 (188,189,190).

GIH : o somatostatina, compuesta de 14 aminoácidos, fué aislado de extractos hipotalámicos ovinos y porcinos (191,192), por Shally y Col., y Guillemin y Col.

LH-RH : La presencia de LH-RH en extractos hipotalámicos de ratas se demostró por primera vez en el año 1.960 (193) y - fue aislado de hipotálamos de cerdo por Schally y col. (194) y por Guillemin y col. (195), en 1971. Su determinación de aminoácidos y su síntesis se realizaron en el mismo año (196,197). La Figura 7 muestra la estructura de LH, RH y TRH:

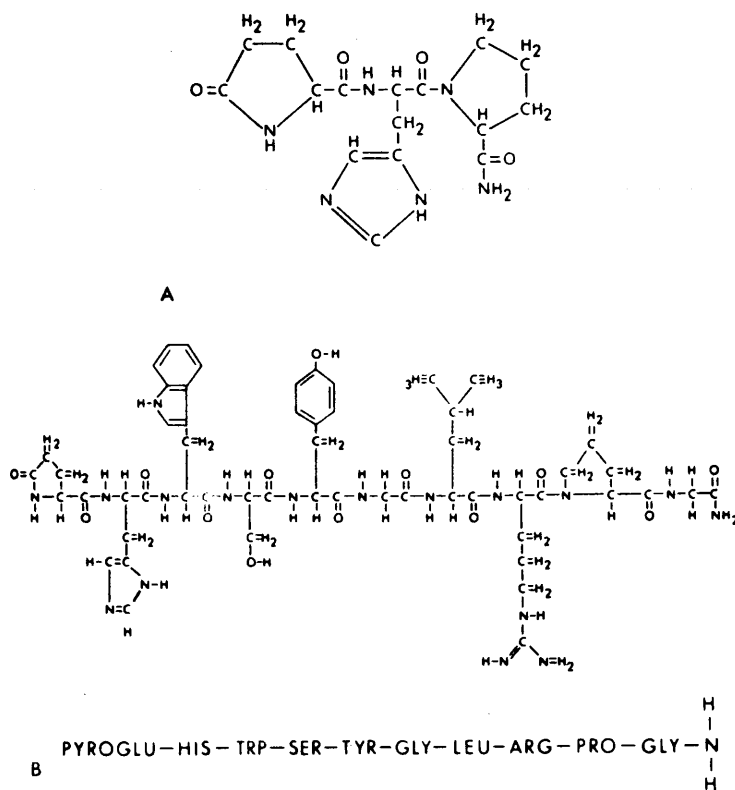


FIG.7:(A): FORMULA DE LA HORMONA LIBERADORA DE TSH : TRF
(B): FORMULA DE LA HORMONA LIBERADORA DE LH : LH-RH

De los estudios realizados para relacionar la estructura con su actividad, se ha llegado a la conclusión de que el anillo imidazol de histidina en posición 2 y el anillo indólico en posición 3, son necesarios para la actividad bioquímica del LH-RH (1.975) (198).

Aunque su aislamiento se basó en la capacidad de liberación de LH, también estimula la secreción de FSH, pero en menor grado.

Arimura y col en 1.973 (199), efectuaron un radioinmunoensayo específico y sensible para su valoración en sueros. Los anticuerpos se obtuvieron en conejos, que desarrollaron atrofia de las gónadas por neutralización del LH-RH endógena con los anticuerpos formados.

Se han sintetizados compuestos análogos al LH-RH, que se diferencian en algún aminoácido y poseen una acción más prolongada en la secreción de LH y FSH. (200) Entre ellos:

D-Ala⁶-des-Gly¹⁰-LH-RH etilamida; D-Leu⁶-des-Gly¹⁰-LH-RH etilamida; y D-Trp⁵-LH-RH.

Otros compuestos sintéticos, con distintas variaciones en algún aminoácido presentan una acción inhibidora del LH-RH, entre ellos:

D-Phe⁶-LH-RH y D-Leu⁶-LH-RH, sintetizados por el grupo de Schally (201) inhiben el pico de LH y FSH durante la ovulación en hamsters. Estos inhibidores pueden presentar una gran importancia en el futuro para su uso como anticonceptivos en humanos.

III. ACCION DE LAS GONADOTROPINAS

III. 1. GENERALIDADES

La FSH y LH, sintetizadas y liberadas por la adenohipófisis, ejercen su acción en las gónadas sexuales, ovarios y testículos, estimulando su diferenciación y evolución durante la vida fetal, su desarrollo en la infancia y pubertad y el mantenimiento de su función hormonal y reproductiva en el estado de madurez. (202)

Cuando la FSH y LH llegan a las glándulas diana, el primer paso que se produce es una interacción hormona-receptor específico, localizado en las membranas de las células de la glándula. El segundo paso ha sido explicado por la teoría desarrollada por Sutherland (203,204), aplicable a la gran mayoría de las hormonas. Esta teoría supone que el resultado de esta interacción, es un aumento (o, a veces, disminución) de la actividad de la enzima adenil-ciclasa, enzima morfológicamente relacionada con el receptor y que cataliza la transformación de ATP en c-AMP en la membrana celular.

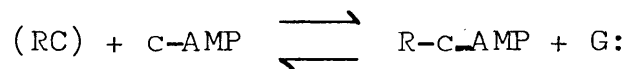
Este aumento, por tanto, provoca una subida de los niveles de c-AMP, que a su vez induce alteraciones

enzimáticas y otros procesos celulares que conducirán a la respuesta biológica específica al mensaje transmitido por la hormona.

En todo el proceso global, la hormona sería el primer mensajero mientras el c-AMP el segundo, razón -- por la que se conoce esta teoría como "Teoría del segundo mensajero". Se ha pensado que las Prostaglandinas actúan también controlando la actividad de la adenil-ciclasa(205).

Krebs y col (206) demostraron que el c-AMP formado activa unas enzimas catalizadoras de la transferencia del fosfato terminal del ATP a una proteína, a las que denominaron: "protein-kinasas dependientes del c-AMP".

Apoiados en estas observaciones Bronstom y col -- (207) proponen que estas kinasas están compuestas de una subunidad reguladora (R) y otra catalítica (G) y que el c-AMP al actuar sobre ellas se uniría a la subunidad R dejando libre la subunidad catalítica G activa para desencadenar reacciones enzimáticas propias de la célula:



La Figura 8 muestra un esquema del proceso.

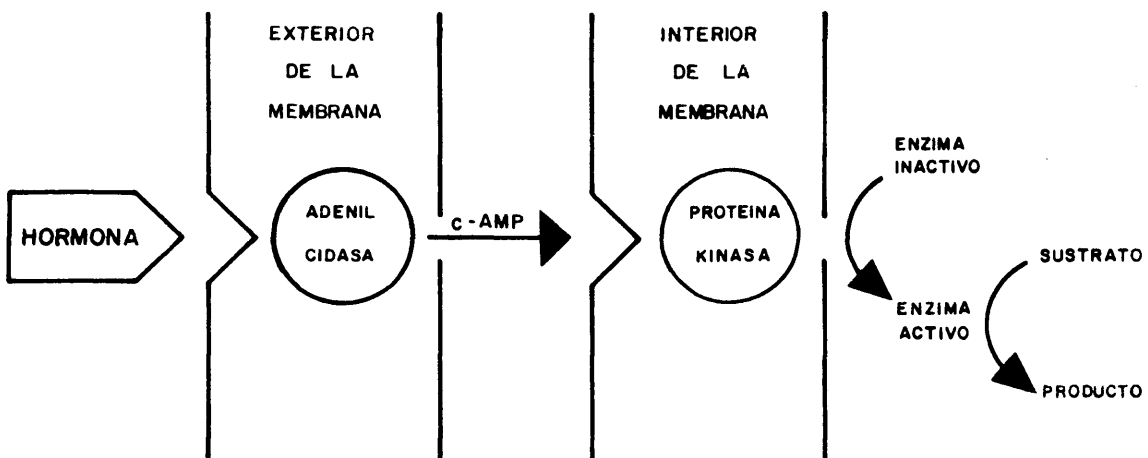


FIG.8: MODELO DE LA ESTIMULACION DE LA REACCION ESPECIFICA ENZIMATICA HORMONAL VIA c-AMP.

III. 2. ACCION DE LH Y FSH EN LOS OVARIOS

Los ovarios tienen dos funciones primordiales : una hormonal, con producción de estrógenos y progesterona fundamentalmente, controlada por las células tecales y las de la granulosa de los folículos y por el cuerpo lúteo, y otra reproductiva que consiste en el desarrollo y maduración del folículo y maduración y expulsión del óvulo para su posible fecundación (208)

Los estrógenos son esteroides con 18 átomos de Carbono y se caracterizan por poseer un anillo aromático A y un grupo hidroxifenólico en el Carbono-3. La Figura 9 muestra un esquema de la biosíntesis de los estrógenos que se produce en las células de la teca (209) por medio de un sistema enzimático capaz de hidrolizar la progesterona y transformar los esteroides de 21 átomos de Carbono en esteroides de 19 átomos de C (andrógenos) y de 18 átomos de C (estrógenos).

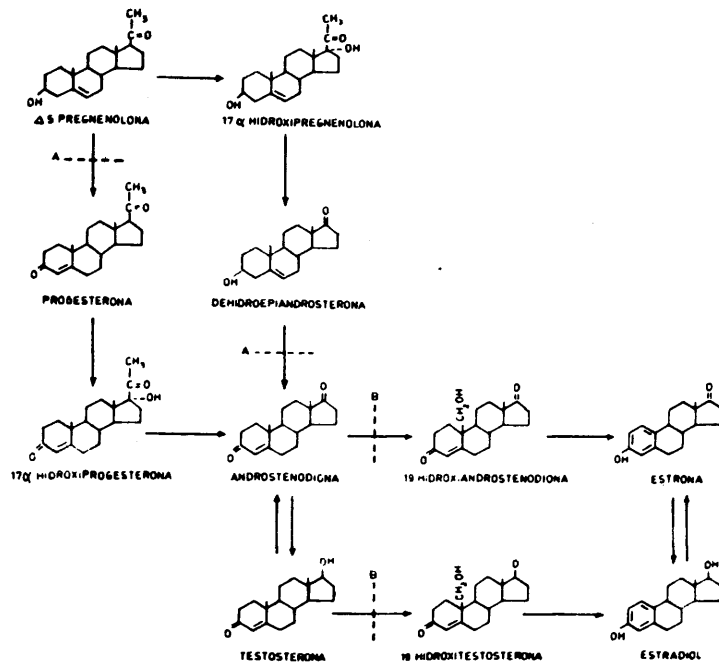


FIG. 9 : REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA BIOSINTESIS DE ESTROGENOS POR LAS CELULAS DE LA TECA EN EL OVARIO. LOS TRAZOS A SEÑALIZAN LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LA DESHIDROGENASA DE LOS 3 HIDROXIL ESTEROIDES. LOS TRAZOS B SEÑALIZAN LAS REACCIONES QUE CONDUCEN A LA AROMATIZACION DE LOS ANDROGENOS.

Las células de la granulosa, poco numerosas en la fase folicular y que constituyen la parte esencial - del cuerpo lúteo, convierten más eficazmente la 5-preg_unenolona en progesterona, pero su hidrólisis posterior no se verifica o lo hace con muy poco rendimiento (210).

Es posible que la progesterona de la granulosa - sea utilizada por la teca como precursor de producción - de estrógenos. (211).

Aunque está bien comprobado que la LH actúa en - la luteneización del folículo (212) y en la esteroidogé- nesis a nivel de las células de la granulosa y de la te_uca (213), queda por explicar el mecanismo de acción com- pleto.

Los primeros estudios realizados por March y col (214, 215), in vitro, demostraron que la LH aumenta - - la síntesis de progesterona en cuerpos lúteos bovinos -- (216). Estos trabajos, junto con otros más recientes -- (217, 218), apoyan la idea de que la actuación de la LH en la esteroidogénesis está mediada por el c-AMP, según la teoría de Sutherland.

Esta acción mediadora del c-AMP parece ser que se sitúa en la transformación de colesterol a pregnenolona, - tal como indica la Figura 10 (219):

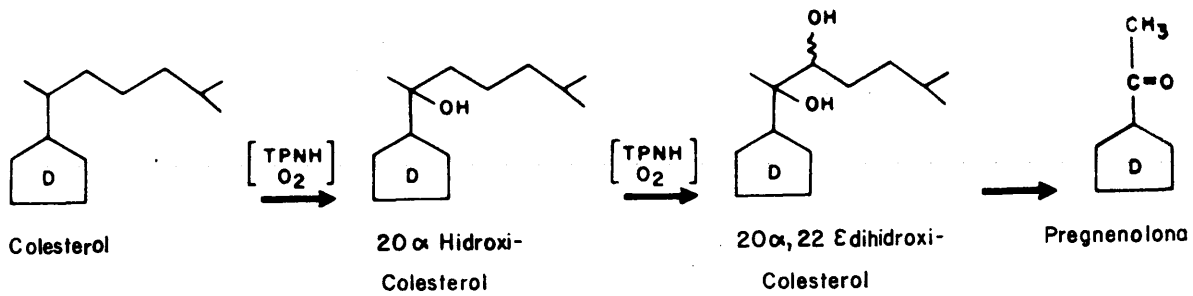


FIG.10: VIA HIPOTETICA DE LA CONVERSION DE COLESTEROL A PREGNENOLONA .(REPRODUCIDO DE P.F.HALL, EN : THE ANDROGENS OF THE TESTIS, EDITADO POR K.B.EIK-NESS NEW YORK, 1970). TPNH: FORMA REDUCIDA DEL NUCLEOTIDO TRIFOSFOPIRIDINA.

La hipótesis de que las prostaglandinas pueden jugar un papel importante en este aún oscuro mecanismo de acción de LH, se apoya en trabajos que demuestran que estas sustancias estimulan la síntesis de progesterona induciendo la formación de c-AMP en ovario de gato y cuerpo lúteo bovino (220) y de que LH, in vitro, y c-AMP aumentan la síntesis de prostaglandinas en folículos de conejos (221).

Siguiendo los trabajos de Krebs y col (206), Me-
non (222) purificó una kinasa del cuerpo lúteo bovino y
al comprobar que era activada por LH, in vitro, indepen-
dientemente de c-AMP sugirió que la LH ejerce un control
directo de la actividad de esta kinasa.

La FSH parece ser la responsable de la maduración
folicular, crecimiento del óvulo y proliferación de las -
células de la granulosa, no interviniendo, al parecer en
la biosíntesis de los estrógenos. Experimentos, in vivo
e in vitro, (223), han demostrado que esta acción se ejer-
ce por la inducción de la síntesis de ADN (ácido dexosi--
rribonucléico) en la división de las células del folículo
y células germinales, y de m-ARN (ácido ribonucléico-men-
sajero), que está implicado en la síntesis de proteínas.-
Aunque se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción de
la FSH parece que está mediada también por el c-AMP(224).
Las acciones de la FSH y LH son complementarias y es impo-
sible una función normal de las gónadas si sus actuaciones
gónado-estimulantes no están bien equilibradas (225). La
FSH produce crecimiento de los componentes del folículo,
que una vez desarrollado estará en condiciones de asumir
su función endocrina bajo el control de la LH.

III. 3. ACCION DE LH y FSH EN LOS TESTICULOS

Los testículos ejercen dos funciones principales, una hormonal y otra reproductiva. En la primera está involucrada la síntesis y secreción de la testosterona, por las células intersticiales de Leyding, y en la segunda la espermatogénesis, es decir, el desarrollo y maduración de las células germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos (226).

El esquema de la Figura 11 muestra las dos vías de producción de la testosterona, andrógeno principal secretado en los testículos. (227, 228).

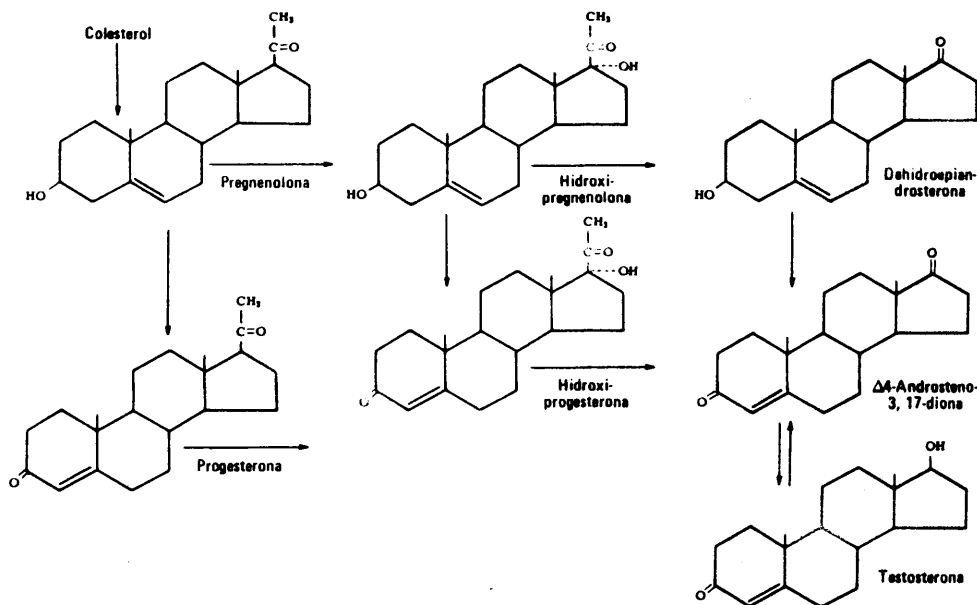


FIG.11: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA BIOSINTESIS DE LA TESTOSTERONA POR LAS CELULAS DE LEYDING DEL TESTICULO.

Se ha demostrado que la LH (I.C.S.H.) y HCG estimulan la esteroidogénesis in vivo, (229); experimentos realizados, in vitro, con células intersticiales aisladas de ratón apoyan la hipótesis de que esta acción está mediada por el c-AMP (230, 231).

Sin embargo, estudios realizados con pequeñas dosis de HCG y LH (232, 233), revelan que la esteroidogénesis alcanza su máximo sin que se observe incremento de los niveles de c-AMP, lo que hace pensar que otro sistema, distinto del de la adenilciclase, puede regular la acción del LH, o que las técnicas usadas no sean capaces de detectar pequeñas diferencias en los valores de c-AMP.

Al igual que en el ovario, la LH actúa en la esteroidogénesis en el paso de colesterol a pregnenolona, (234).

En estas reacciones, el proceso más lento y complejo es la α -hidroxilación y puede ser donde reside la clave del mecanismo de estimulación trópica del LH (235).

Aunque se sabe desde hace mucho que la FSH estimula el epitelio germinal, el sitio de acción no está definido -- con exactitud (236). Existen claras evidencias de que la FSH estimula el sistema adenilciclasa (237) y la síntesis de proteínas en los túbulos seminíferos (238). Aún queda -- por esclarecer qué procesos de la espermatogénesis son no -- dependientes de FSH.

Desde hace varios años, han sugerido que el epite-- lio germinal segrega una sustancia, a la que denominaron -- "inhibin", que puede actuar bloqueando la secreción de FSH (239). Franchimont y col (240), Lugaro y col (241), muy re-- cientemente, han confirmado esta hipótesis demostrando que es una sustancia peptídica.

Es interesante hacer notar que las experiencias de-- muestran que la FSH y LH actúan sinérgicamente en la este-- roidogénesis (242); ésto mismo podría suceder en el caso de la espermatogénesis.

IV. RECEPTORES GONADALES

IV . 1. RECEPTORES

Los receptores son moléculas o complejos moleculares, cuya misión es reconocer e interaccionar específicamente con la hormona que actúa en la célula diana. Este primer contacto de la hormona con el receptor, presente en la célula, es la primera señal que inicia una cadena de procesos destinados a una respuesta biológica específica.

Es estudio de los receptores específicos testiculares de LH y HCG se han llevado a cabo, "in vitro", por incubación de LH y HCG marcados con ^{125}I con homogeneizados de testículos de ratón y células de Leyding aisladas (243), e "in vivo", inyectando las hormonas marcadas al animal (244).

Una vez comprobada su existencia, se les ha extraído con detergentes no iónicos (Triton X) y caracterizado bioquímicamente. (245).

Se ha demostrado también que la LH y FSH se unen de una forma muy específica a receptores presentes en el ovario (246, 247) localizándose en las membranas plasmáticas (248).

Los receptores testiculares de FSH, demostrados por la unión de FSH marcada con tritio, parecen estar situadas en las membranas celulares de los túbulos seminíferos de ratón (249).

El estudio de los receptores gonadales ha conducido a Catt y col (250,251) al desarrollo de un análisis muy específico de las gonadotropinas, basándose en la inhibición competitiva de la hormona endógena a valorar o la hormona - standard, en la unión hormona marcada-receptor y al estudio de las características bioquímicas de esta unión hormona-receptor.

V. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE FSH y LH

V. 1. MECANISMOS DE FEEDBACK

La liberación de las gonadotropinas, no se realiza de una forma tónica sino pulsátil (252), más acusada en LH que en FSH, quizás debido a la vida más larga de FSH (253). Esta secreción pulsátil, según Vande Wiele y Ferrin (254), parece ser dependiente de un mecanismo propio de la adenohipófisis más bien que del sistema nervioso central.

La regulación de la secreción de FSH y LH por los esteroides gonadales, tienen diferentes mecanismos en -- hombres y mujeres; su control, en ambos casos, está bajo la acción de las hormonas liberadoras del hipotálamo y a su vez bajo la influencia de los centros corticales del -- sistema nervioso central.

Los mecanismos de Feedback, que regulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, pueden clasificarse de la manera siguiente:

Mecanismos "Feedback largos", en los cuales los mensajes de inhibición provienen de los esteroides producidos por las gónadas.

Mecanismos "Feedback cortos", en los cuales los mensajes de inhibición vienen dados por las gonadotropinas -- sintetizadas en la adenohipófisis.

Mecanismos "Feedback ultracortos", en los cuales las hormonas liberadoras del hipotálamo controlan su propia síntesis.

Los mecanismos de "Feedback cortos", fueron observados por Motta y col. (255) al comprobar que los valores de LH, muy altos, en ratas castradas, eran reducidos al hacer una implantación de LH en la eminencia media, sugiriendo que ésta contiene receptores sensibles al cambio de LH y que actuarían inhibiendo la secreción de LH al ser activadas por altos niveles de esta hormona. Del mismo modo, Fraschini y col. (256) han descrito un mecanismo -- análogo para FSH.

Los mecanismos de "Feedback ultracortos", fueron descritos por el grupo de Martini y Motta (257,258), al comprobar una disminución del contenido de la hormona liberadora de LH y FSH, en ratas hipofisectomizadas y castradas, después de la administración subcutánea de extractos hipotalámicos, lo que hace suponer que el cerebro contiene receptores sensibles a las hormonas liberadoras, y que ellas mismas regulan su propia producción.

V. 2. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE FSH Y LH EN MUJERES.

El funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisogonadal en la mujer, constituye un mecanismo muy complejo

en el que están involucrados efectos de Feedback positivos y negativos de los esteroides ováricos, sobre el control de la secreción de FSH y LH.

La figura 12 presenta la secreción de estos esteroides, junto con los valores de FSH y LH durante un ciclo menstrual normal (259). En la 1ª parte de la fase folicular, que morfológicamente comienza por un crecimiento del folículo, hay una subida en los niveles de FSH -- que va descendiendo lentamente a medida que ascienden -- los de LH.

En todos los ciclos normales existe un pico máximo de LH y FSH, coincidente con el día en que la temperatura basal es más baja. La rotura del folículo (ovulación) ocurre entre 16 y 24 horas después del pico de LH (260). Ambas concentraciones máximas de FSH y LH, habitualmente aparecen el mismo día, aún cuando algunos autores como Franchimont (261), Migdley y Jaffe (262), han encontrado que en casi el 40% de las jóvenes estudiadas el pico de LH puede preceder al de FSH. El pico de LH parece ser una descarga bifásica de duración 48 horas (263).

Durante la fase luteínica, generalmente, no -- hay cambios notables en los valores de FSH y LH, lo que sugiere la idea de que el cuerpo lúteo es autónomo; en esta fase los valores de FSH y LH son menores que en la fase folicular (261, 262),

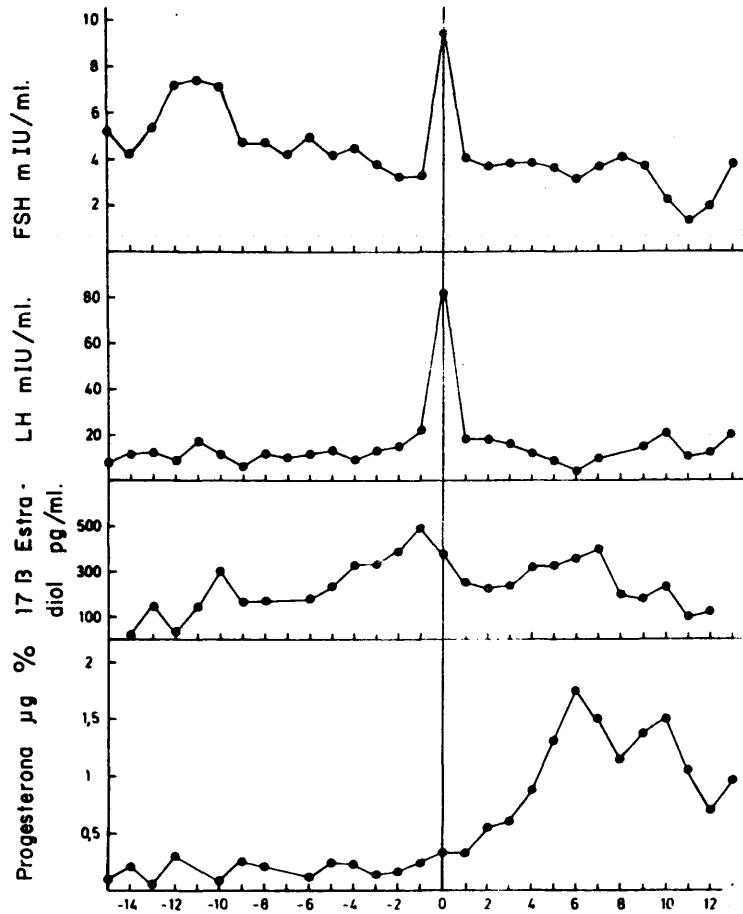


FIG. 12: REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS CAMBIOS DE FSH, LH, ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN 25 CICLOS MENSTRUALES NORMALES. EL DIA CERO CORRESPONDE AL DIA DE MAXIMA CONCENTRACION DE LH (REPRODUCCION DE P. FRANCHIMONT, EN METHODS IN INVESTIGATIVE AND DIAGNOSTIC ENDOCRINOLOGY, EDITADO POR S.A. BERSON Y R.S. YALOW . NEW YORK, 1973)

El mecanismo de acción de los estrógenos sobre la secreción de FSH y LH no está aún claramente establecido. Los niveles altos de estradiol que preceden al pico de LH, han sugerido la hipótesis de un efecto de Feedback positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario (264,265), mientras que la subida de FSH en la primera parte de la fase folicular podría explicar un efecto de Feedback negativo producido por el descenso de los niveles estrogénicos en la fase luteínica anterior.

Con el fin de esclarecer este mecanismo de acción - se han administrado compuestos estrogénicos, en mujeres - normales y patológicas, y se han observado las variaciones en los niveles de gonadotrofinas. Los resultados dados -- por los diversos autores discrepan notablemente, en parte, debido a las dosis empleadas y a la fase del ciclo en que realizaron los experimentos.

En mujeres post-menopaúsicas, dosis bajas de estrógenos (etinil-estradiol) Franchimont y col. (266) consiguieron una disminución de los niveles de FSH, sin variación de los de LH; en mujeres normales Toci y col. (267) observaron una disminución de los niveles de FSH con dosis suficientes de estrógenos.

La acción de los estrógenos sobre la secreción de LH es mucho más difícil de analizar. En mujeres post-menopáusicas dosis elevadas produjeron una disminución de LH en los estudios realizados por Cargille (269); estudios realizados en mujeres normales manifiestan que la sensibilidad del eje hipotálamo-hipofisario a los estrógenos, varía durante las distintas fases del ciclo menstrual.

A los 3-4 días después del pico ovulatorio, los niveles de progesterona alcanzan un máximo y descienden después rápidamente (270, 271). Inyecciones de progesterona no producen ningún cambio en los valores de FSH y LH, sin embargo sus derivados, como acetato de noretisterona, bloquean la secreción máxima de FSH y LH en la mitad del ciclo (272, 273), razón por la que se les ha empleado como agentes contraceptivos.

El tratamiento no-secuencial con agentes contraceptivos que contienen estrógenos y progestágenos, suprimen el pico máximo de ambas gonadotropinas así como los valores altos de FSH en la primera parte de la fase folicular (274, 273, 271).

La Figura 13A muestra los diferentes Mecanismos de Feedback que regulan el eje Hipotálamo-hipofiso-ovárico.

Estudios , in vitro, demuestran que los esteroides pueden actuar tanto a nivel hipotalámico como hipofisario.(275, 276).

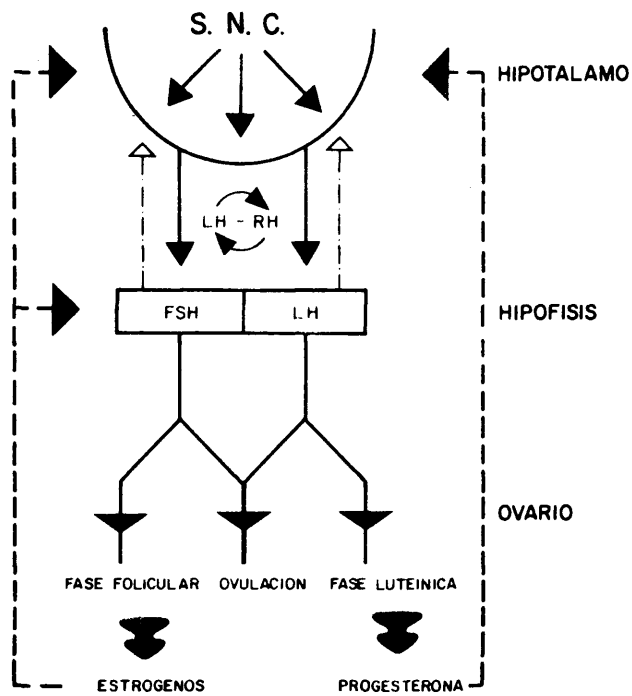


FIG. 13 (A): MECANISMOS DE FEEDBACK QUE CONTROLAN EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS - OVARICO.

- - - : FEEDBACK LARGO
 - · - : FEEDBACK CORTO
 ~ ~ ~ : FEEDBACK ULTRA-CORTO
 S.N.C. : SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

V. 3. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE FSH Y LH EN HOMBRES

La disminución de los valores de LH observados al inyectar propionato de testosterona a hombres (277,278), y la relación inversa entre los valores de LH y testosterona existentes en el ciclo diurno normal (279), demuestran que la testosterona, per se, o por su transformación periférica en estrógenos, es el factor más importante en el mecanismo de Feedback largo de control de LH.

Experimentos realizados "in vitro" por Massa y col (280), demuestran que la adenohipófisis y el hipotálamo son capaces de transformar la testosterona en dihidrotestosterona (DHT) y apoyan la hipótesis de que esta transformación es necesaria para la inducción de los efectos de Feedback y para un comportamiento sexual normal.

La naturaleza exacta del control de la FSH aún no se conoce muy bien; los valores altos de FSH encontrados en algunos casos clínicos, como en el caso del Síndrome de Klinefelter, con lesiones en los túbulos seminíferos, y en los casos de Azoospermia y Oligospermia, con espermatogénesis anormal (281), hacen suponer que las células germinales segregan una sustancia, de naturaleza proteica, que ejercería un efecto de Feedback negativo en la liberación de FSH (281,

240 Y 241). Aunque aparentemente parece ser que la testosterona no interviene en la regulación de FSH, algunos trabajos, basados en la disminución de FSH por altas dosis de este andrógeno (278) demuestran que puede existir un mecanismo de feedback negativo de la testosterona sobre la secreción de FSH.

La localización de estos mecanismos de Feedback por la testosterona se han llevado a cabo con estudios autoradiográficos (282, 283). La concentración de andrógenos marcadas con Tritio en el hipotálamo, hipocampo y amígdala, así como en la pituitaria de rata sostiene la hipótesis de que estos mecanismos se realizan a nivel del sistema nervioso central y a nivel de la pituitaria

La Figura 13 B muestra los diferentes mecanismos de Feedback que controlan el eje hipotálamo-hipófisi-testicular.

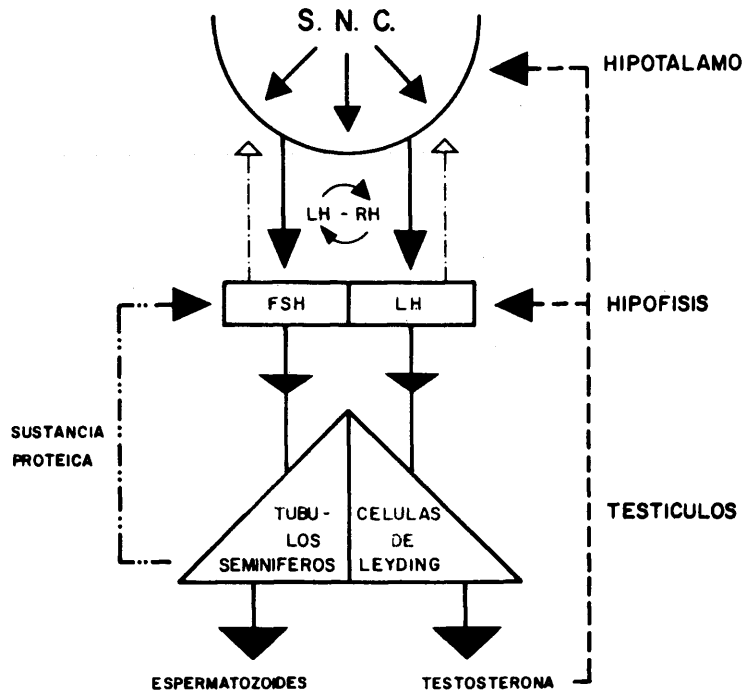


FIG.13(B): MECANISMOS DE FEEDBACK QUE CONTROLAN EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULAR

- : FEEDBACK LARGO
- - - : FEEDBACK CORTO
- : FEEDBACK ULTRA-CORTO.
- S.N.C.: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

V. 4. INFLUENCIA DE LAS CATECOLAMINAS EN LA SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS.

Sawyer y col. (284) fueron los primeros en demostrar una influencia de las catecolaminas en el control de FSH y LH, al conseguir inhibir la ovulación por medio de un bloqueante α adrenérgico (dibenamina). Estudios posteriores "in vitro" demostraron que la adrenalina y norepinefrina estimulaban la liberación de FSH en pituitarias de ratas, sin embargo la dopamina no la alteraba (285). Cuando se añadía al cultivo de pituitaria anterior extractos de hipotálamo - la dopamina incrementaba los niveles de FSH y LH (286), del mismo modo que cuando se inyectaba dopamina en el 3º ventrículo de rata (287, 288).

Todos estos trabajos hacen suponer que la acción de las catecolaminas se localiza principalmente a nivel hipotálamico. Esta acción puede inhibirse con bloqueadores β adrenérgico, pero no con α (289).

Un tema de gran controversia es el de qué tipo de catecolaminas es el más activo en el control de la adenohipófisis.

Füxe y col. (290) sostienen que la catecolamina que controla el pico ovulatorio es la norepinefrina, mientras

Sawyer y col. (291) opinan que es la epinefrina; otros autores, como Kamberi (287), Kordon y Glowinski (292) piensan -- que es la dopamina la controladora de la descarga cíclica go nadotrópica.

El estímulo provocado por estrógenos y progesterona en la secreción de gonadotropinas observado por Kalra y Mc Caan (293) fué inhibido con un bloqueante α adrenérgico, lo que hace suponer que el mecanismo producido por los estrógenos se -- realiza a través de un mecanismo α adrenérgico y parece ser po sible que esté mediado por la epinefrina.

En conclusión Mc Caan (294) explica el mecanismo de -- acción a través de una sinapsis norepinefrínica presente en -- la región preóptica, que media el efecto estimulatorio de pro gesterona y estrógenos en la liberación de LH y FSH, y de una sinapsis dopaminérgica localizada en la eminencia media que -- mediaría el estímulo de LH y FSH a través de una acción sobre LH-RH.

V. 5. PUBERTAD.

El comienzo de la pubertad es uno de los más misteriosos procesos de la biología animal; en el hombre la pubertad lleva consigo cambios de maduración que envuelven secuencialmente al sistema nervioso central suprahipotalámico, el hipotálamo, la pituitaria y las gónadas. Actualmente los investigadores en este campo enfocan la atención en el papel del sistema nervioso central para llegar a la explicación de este fenómeno.

El estudio de la secreción de FSH y LH durante la infancia, adolescencia y pubertad ha conducido al desarrollo de varias hipótesis para explicar la clave de los procesos que llevan a cabo la maduración sexual.

Durante la vida fetal se detectan valores de FSH y LH, alcanzando entre los 110-140 días de gestación unos niveles tan altos como los observados en sujetos castrados, siendo los valores de FSH más altos en fetos femeninos que en masculinos (295). A partir de esta fecha comienzan a bajar, lo que sugiere que comienza a funcionar un efecto de feedback negativo de los esteroides gonadales.

Durante la infancia los valores son muy bajos, con la particularidad de que el rango de valores de FSH en niñas es mayor que en los niños (296).

A medida que se va alcanzando la pubertad los valores de las gonadotropinas aumentan, siendo la subida de FSH siempre anterior a la de LH (296, 297, 298) lo que hace pensar en el papel predominante de la FSH en el crecimiento y desarrollo de las gónadas. En paralelo con este incremento, los esteroides gonadales van aumentando sus niveles.

A la edad de 10 años para FSH y 13 para LH se alcanzan los valores normales de la edad adulta para el varón y de 14 a 16 años para las hembras, según los trabajos de Faiman y Wainter (296).

El mecanismo que desencadena la pubertad ha sido asociado con un cambio de sensibilidad en el eje hipotálamo-hipofisario al efecto de feedback negativo de los esteroides (295, 299). Durante la infancia, la sensibilidad a este efecto sería muy grande y por tanto muy bajos los niveles de FSH y LH, mientras que en la pubertad la sensibilidad disminuiría aumentando, por tanto, la concentración de FSH y LH.

Otro cambio de maduración que se manifiesta en la pubertad es el aumento de la secreción de LH durante el sueño (300), fenómeno que no se observa en la edad adulta; este hecho confirma la idea de que los centros cerebrales: hipotálamo, sistema límbico e incluso la glándula pineal (301) están involucrados en el control de la iniciación de la pubertad.

El medio hormonal existente durante la vida fetal y neonatal juega un gran papel en la diferenciación sexual -- del hipotálamo. Parece ser que la presencia de andrógenos en ratas machos en las primeras fases del desarrollo es esencial para establecer un comportamiento masculino de la actividad hipotalámica (302); la administración de testosterona en ratas hembras durante el período neonatal anula el ritmo cíclico normal de secreción de LH, y por tanto induce ciclos anovulatorios (303).

V. 6. MENOPAUSIA.

La menopausia es la fecha señalada por la última regla. Se encuentra incluida dentro del período climatérico que representa el declinar sexual de la mujer y se acompaña habitualmente de ciclos anovulatorios.

En las mujeres postmenopáusicas los niveles de FSH -- son muchos más elevados que los correspondientes a mujeres normalmente regladas, debido a la pérdida de la función -- germinativa del ovario en este período; los valores de LH también son elevados, aunque no tanto como los de FSH, ya que no hay un cese total de la secreción ovárica y al mismo tiempo las glándulas suprarrenales suministran estrógenos al organismo. (268, 304, 305).

La secreción rítmica, característica de un ciclo mensural normal, de ambas gonadotropinas se pierde totalmente en esta fase, y los valores altos de FSH y LH persisten durante muchos años después de la iniciación de la menopausia -- (268).

Los valores altos de FSH y LH constituyen un buen argumento para diagnosticar menopausia precoz en presencia de una amenorrea.

VI. APLICACION EN LA CLINICA HUMANA DE LA DETERMINACION DE GONADOTROFINAS POR R.I.A.

En el momento actual, el diagnóstico sindrómico de los diferentes tipos de Hipogonadismos en el hombre y en la mujer, depende fundamentalmente de las determinaciones de LH y FSH.

En los Hipogonadismos hipotálamo-pituitarios, existe un defecto de secreción de LH, FSH o ambas a la vez, -- que se traduce en cifras muy bajas de estas hormonas en el suero o plasma; por el contrario, en las enfermedades primarias del testículo y ovario, al alterarse los mecanismos de feedback que regulan el eje hipotálamo-hipofisogonadal, nos conducen a un cuadro de Hipogonadismo-Hipergonadotrópicos, con enorme aumento de las cifras de LH y FSH en sangre periférica. (306, 307, 308, 309)

La diferenciación del origen del Hipogonadismo, según su localización hipotalámica o hipofisaria, se puede hacer hoy en día mediante los tests dinámicos con clomipheno y LH-RH y con las valoraciones en suero de las gonadotrofinas. (310, 311, 312, y 313)

Así mismo los problemas de esterilidad, tanto masculinos como femeninos, pueden ser en determinadas situa--

ciones favorablemente encauzadas por el estudio dinámico de la secreción de gonadotrofinas, así como por el análisis de tenido de los ritmos de secreción horaria de LH y FSH (314, 315, 316).

Otro aspecto de enorme transcendencia es el que se refiere al inicio de la pubertad y su patología, pubertad retrasada, problema que se está empezando a comprender mediante la monitorización electroencefalográfica coordinada con las tomas de sangre para valoración de gonadotrofinas (317, 318).

Es indudablemente útil en el diagnóstico precoz del embarazo; por la reacción cruzada de la HCG con la LH, podremos suponer un embarazo cuando los niveles de esta última estén elevadas (319, 320).

Por último, se muestra imprescindible para el control eficaz de la terapia con clomipheno y LH-RH (320, 321).

Las determinaciones de las hormonas pituitarias que controlan el desarrollo y funcionamiento de los ovarios y testículos, es fundamental para el estudio de las diversas patologías gonadales y para analizar las causas que producen la esterilidad.

Hasta el momento actual en nuestros hospitales, se vienen utilizando métodos biológicos que, de una forma grosera, sirven para valorar la secreción global en la orina, de estas gonadotropinas (FSH y LH).

La necesidad de disponer de un método analítico a nuestro alcance, capaz de detectar, por separado, valores de FSH y LH con la máxima precisión y reproducibilidad, ha sido la razón primordial de esta Tesis.

Las técnicas más empleadas hoy en día, para el análisis de sustancias biológicas presentes en muy pequeñas concentraciones, son las radioinmunológicas. El material necesario para el desarrollo de estas técnicas puede ser obtenido a través del N.I.H. (National Institute of Health) o bien en forma de "Kits" comerciales de los Laboratorios Serono.

La puesta en marcha del R.I.A. con el material donado por NIH exige :

- 1º) La preparación de las hormonas marcadas con Iodo radioactivo, con el mayor grado de pureza posible.
- 2º) La titulación de los anticuerpos específicos : Anti-FSH y Anti-LH, para elegir aquéllas concentraciones que proporcionen mejores curvas standard o patrones.
- 3º) La evaluación de la sensibilidad, recuperabilidad, variabilidad y precisión de estas curvas.

La comparación de los resultados obtenidos con este material y el adquirido a través de "Kits" comerciales, convenientemente preparados para su uso inmediato (aunque muy costosos), nos permitirán considerar sus ventajas e inconvenientes.

Una vez desarrollada la metodología, hemos pretendido - analizar nuestros patrones de normalidad para así poder clasificar los diferentes síndromes de hipogonadismo masculinos y femeninos.

Al mismo tiempo, estos resultados analíticos nos van a permitir adentrarnos en algunos aspectos de investigación básica y aplicada, tan atractivos como son : control de la secreción de LH y FSH, pubertad maculina y femenina, y tests dinámicos de aplicación clínica, aún mal conocidos.

Independientemente de las aportaciones metodológicas -

y clínica que hayamos podido realizar, hemos intentado hacer una revisión detallada y exhaustiva, así como una puesta al día de los temas más discutidos en la actualidad, en el apasionante campo de La Endocrinología sexual.

M M M M M M M M
M M M M M M M M
M M M M M M M M
M M M M M M M M

M M
M M
M M
M

M M M M M M M M
M M M M M M M M
M M M M M M M M
M M M M M M M M

I. RADIOINMUNOENSAYO DE FSH Y LH POR EL METODO
DE N.I.H. (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH)

I. 1. IODACION O MARCAJE DE FSH Y LH

MATERIALES EMPLEADOS

A.- SOLUCIONES TAMPON :

- 1) Tampón fosfato 0,5M, pH=7,5 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 155,76g;
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 9,4g; se enrasa a 1 litro con agua des-
 tilada y se ajusta el pH.)
- 2) Tampón fosfato 0,05M, pH=7,5 (Se obtiene diluyendo -
 la solución anterior 1:10 y se añade mertiolato sódico a una concentración de 1:10.000)
- 3) Tampón fosfato 0,01M, 0,14M NaCl (PBS), pH=7,6 :
 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 4,11g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,117g, se en-
 rasan con agua destilada hasta 1 litro y se ajusta el
 pH.)
- 4) Tampón BSA-PBS al 5%, pH=7,6; es el tampón anterior
 al que se le añade albúmina bovina (BSA, Sigma Fra-
 ccion V), al 5%.
- 5) Tampón BSA-PBS al 1% y 0,1%, pH=7,6 (Se preparan di-
 luyendo la solución anterior 1:5 y 1:10, respectiva-
 mente.

3.- HORMONAS :

FSH : LER - 1366 (1 mg: 3400 IU, 2nd IRP-HMG). Se recibió 100 μg en 1 ml y se dividió en alícuotas de - 25 μl (2,5 μg), que se guardaron congeladas a -20°C en unos microtubos donde se realizarán sus iodaciones.

LH : LER- 960 (1 mg: 4620 IU de LH, 2nd IRP-HMG). Se recibió 200 μg en 1 ml y se dividió en alícuotas de - 25 μl (5 μg) a -20°C .

Estas dos hormonas, puras, extraídas de pituitarias humanas por el Dr. Reichert, fueron donadas por "Human Pituitary Agency of the National Institute of Health (NIAMD, - NIH, Bethesda, U.S.A.)

C.- MATERIAL RADIOACTIVO :

^{125}I Na, fabricado especialmente para el marcaje de proteínas, procedente de Amersham (Inglaterra), diluido en solución NaOH pH: 8-11 y con una actividad específica de 14 mCi/ μg .

D.- SUSTANCIAS QUIMICAS :

Cloramina-T ($\text{CH}_3 \text{C}_6\text{H}_4 \text{SO}_2\text{N Na}$)Cl $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. BDA. Se prepara una solución de 50 mg en 10 ml de tampón fosfato 0,05M, pH=7,5.

Metabisulfito sódico : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Se prepara una solución de 120 mg en 25 ml de tampón fosfato 0,05M.

Estas dos soluciones han de prepararse inmediatamente - antes de su uso, ya que la presencia de polvo y aire -- pueden alterar su estabilidad.

IK: Se prepara una solución que contenga 100 mg de IK y 1,8 g de sacarosa en tampón 0,05M.

E.- Sephadex G-75 y Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden).

Preparación de las columnas de Sephadex G-75

Se pesa, aproximadamente, 1g de Sephadex y se diluye en exceso de tampón fosfato 0,05M. Con el fin de que el gel - se hinche se deja, por lo menos, durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente, o durante 3 horas en baño maría. El gel, así preparado, se añade a una columna de cristal de 0,9 x 15 cm; una vez empaquetada la columna se equilibra con 0,5 ml de tampón BSA-PBS al 5% y se lava con 40 ml de tampón fosfato 0,05M. Para evitar la formación de burbujas es conveniente, antes de añadirlo a la columna, calentar el gel en - baño maría.

Preparación de las columnas de Sephadex G-100

Se diluyen 4 g de Sephadex G - 100 en exceso de tam pón fosfato 0,05M. Se deja, como mínimo, tres días a tem

-peratura ambiente, o, 5 horas en baño maría, y a continuación se añade a la columna de 1,2 x 40 cm. Se equilibra con 3 ml de tampón BSA - PBS y se lava con 80 ml de tampón fosfato 0,05M.

La albúmina añadida a las columnas satura los sitios de adsorción de la hormona a las paredes y por tanto - aumenta el rendimiento del marcaje.

PROCEDIMIENTO DE IODACION O MARCAJE

En esencia, se sigue el método original de Greenwood, Hunter y Clover (91) modificado. En un microtubo, se añaden - los siguientes reactivos en el orden en que se describen:

- 1º.- 25 μ l (5 μ g) de LER-960 de LH, o
25 μ l (2,5 μ g) de LER-1366 de FSH, recién descongeladas.
- 2º.- 10 μ l de tampón fosfato 0,5M . Esta solución se añade para aumentar la capacidad de tampón de la mezcla.
- 3º.- 10 μ l (1 mCi) de 125 INa.
- 4º.- 10 μ l (50 μ g) de la solución de Cloramina-T.
Se agita la mezcla durante 85-120 segundos.
- 5º.- 25 μ l (100 μ g) de la solución de metabisulfito sódico.
- 6º.- 100 μ l de la solución de IK.

PURIFICACION DE 125 LH y 125 FSH

La separación entre la hormona marcada pura, la hormona deteriorada y el 125 I libre, se realiza por cromatogra-

-fía en Sephadex G-75 .

Todo el contenido del Vial anterior se lleva a la columna, previamente preparada, de Sephadex G-75; al vial vacío se le añaden 75 μ l de la solución de IK, para lavar los residuos y se transfieren a la columna. A continuación se eluye la columna con tampón 0,05M y se recogen fracciones, del eluato, de 0,5 ml, en tubos que contienen 0,1 ml de tampón BSA - PBS al 5%, con el fin de evitar la adsorción de la hormona a las paredes. Se recogen 40 fracciones usando un colector de fracciones "Gilson, 1AMTDC".

De cada fracción se toman 10 μ l y se cuenta su radioactividad en un contador de radiaciones gamma (Nuclear-Chicago) durante 0,1 minuto.

Los resultados se expresan en unos ejes cartesianos; en el eje de abcisas se representa el número de la fracción, y en el eje de ordenadas su radioactividad, expresada en cuentas por 0,1 minuto.

CALCULO DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

Para calcular la actividad específica con exactitud, es preciso tener en cuenta:

- 1º.- Que las hormonas FSH y LH, del mismo modo que otras proteínas, se adsorben a las paredes de vidrio de las columnas de cromatografía, a las pipetas y a los tubos

usados en el ensayo durante la iodación.

2º.- Que la medición de la radioactividad comprendida entre límites muy extensos y disuelta en diferentes volúmenes resulta en variaciones de contaje.

Esto significa que para tener un valor exacto -- habría que aplicar el método usado por Greenwood y Col.(91) que consiste en contar la radioactividad inicial del Iodo radioactivo, el vial, las pipetas, la columna y las fracciones del eluato. Suponiendo que el Iodo radioactivo libre - no se adsorbe, se podría calcular la cantidad de hormona - marcada adsorbida al material usado.

Utilizando un contador Geiger-Müller, modelo - 2652, se cuenta la radioactividad inicial del vial que contiene la hormona y el ^{125}I , y al resultado se le resta la suma de radioactividades obtenidas al contar el vial vacío, las pipetas y la columna usadas después del proceso. Las pérdidas de la hormona por adsorción se expresan en % respecto de la radioactividad inicial. La eficacia de la iodación, es decir, la incorporación de ^{125}I a la hormona, se calcula integrando las áreas correspondientes a la hormona marcada y al Iodo libre y calculando el % de Iodo incorporado a la hormona.

Para calcular la actividad específica, en nuestras condiciones, se aplica la fórmula :

$$A.E. = \frac{\% \text{ de } ^{125}\text{I-incorporado}}{\text{ug de hormona}} \times 1 \text{ mCi.}$$

Como las condiciones experimentales del proceso - se mantienen siempre constantes, las pérdidas de la hormona por adsorción serán también constantes, de esta manera los valores obtenidos de la actividad específica serán medidas relativas que sirven de control.

CRITERIOS DE PURIFICACION DE $^{125}\text{I-LH}$ y $^{125}\text{I-FSH}$. ESTUDIO -
DE LAS DIFERENTES FRACCIONES CORRESPONDIENTES A LA HORMONA
MARCADA.

El grado de pureza que deben de tener las hormonas marcadas, para poder ser aplicadas a un radioinmunoensayo - sensible y específico, debe ser por lo menos de un 90 %. - Cada una de las fracciones, recogidas en la purificación - en Sephadex G-75, se someten a una evaluación utilizando - los siguientes métodos:

1) Electroforesis:

Se realiza en papel Whatman nº 1, usando tampón veronal de pH 8,6. La muestra, consistente en 10 ul de cada - fracción, se coloca en el centro de las tiras de papel (2,3 x 26 cm) junto con 10 ul de suero. Se hace pasar una corriente de 400 V, se secan las tiras, se cortan fragmentos de 2mm y se llevan a contar en el contador gamma.

La hormona pura no se desplaza del punto de aplicación, por lo que cuanto más pura sea la fracción proteica aplicada, más definido será el pico de radioactividad - obtenido en ese punto, y menor el cociente entre su base - y su altura. La hormona deteriorada y el Iodo libre se desplazan a la región anódica. Otro índice de pureza lo indica el % de radioactividad adsorbida en el origen, en relación con la radioactividad total de la muestra.

2) Inmunoprecipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Se toma un volumen determinado de cada fracción - y se diluye hasta 1 ml (20.000 cpm), a continuación se añae de 0,1 ml de albúmina bovina al 22%, en hielo; después de añadir 4 ml de ácido tricloroacético al 10%, se agita y se deja en reposo, en hielo, durante 30 minutos. Se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos.

El precipitado se lava con 6 ml de TCA al 10% y - se centrifuga, después de decantar se añade un volumen de NaOH 4N igual al volumen de una muestra de referencia, que se establece para calcular un factor de corrección entre - las c.p.m. antes y después del análisis.

El TCA precipita la proteína pura, cuyo porcentaje se calcula hallando el % de radioactividad del precipitado, en relación con el conteje inicial.

3) Estudio Inmunológico

Se incuban, por triplicado, 0,1 ml de hormona - marcada (10.000 cpm) con 0,2 ml de anticuerpo específico a una concentración determinada (dilución final de anti-FSH.1:10.000, y de anti-LH 1:40.000), y con 0,5 ml de tam-- pón PBS - BSA al 1%, durante 24-36 horas; a continuación se añaden 0,2 ml de anti-gamma-globulina de conejo (2º -- anticuerpo). Al cabo de 24 horas, se añade 1 ml de tam-- pón PBS, se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos, se decanta y se cuenta el precipitado.

En paralelo, se ponen tubos a incubar, durante - el mismo periodo de tiempo, a los que se le añade los mis mos reactivos, excepto el anticuerpo específico (en su lu gar se añade 0,2 ml de tampón), para estudiar la unión no específica. Al contaje de los tubos que contienen anti- - LH, o, anti-FSH, se le resta la radioactividad de los tu- bos anteriores. La reacción no específica y la de la - hormona marcada al anticuerpo se expresa en % en relación a la radioactividad inicial de la hormona marcada.

ALMACENAMIENTO DE LA HORMONA MARCADA

Después de cada iodación, se guardan las fraccio- nes que reúnen los criterios establecidos, divididas en ali cuotas, cuyo volumen depende del número de tubos que vayan

a ensayarse en análisis posteriores; éstas, se congelan y se guardan a -20°C . Es conveniente añadir unas gotas de solución PBS al 5% de BSA a los recipientes para prevenir la adsorción de la hormona a las paredes.

ESTABILIDAD DE LA HORMONA MARCADA

Antes de proceder a utilizar la hormona marcada en un radioinmunoensayo, se debe de repurificar la alícuota en la columna de Sephadex G-100, del modo siguiente: - Esta, se añade a la columna y se eluye con tampón fosfato 0,05M y se recoge en fracciones de 1 ml en tubos que contienen 0,2 ml de tampón BSA-PBS al 5%. De cada fracción - recogida se toman 10 μl y se llevan a contar. Integrando las áreas correspondientes a la hormona marcada y al Iodo libre se calcula el % de éste.

Las fracciones correspondientes a la hormona marcada se someten a evaluación, siguiendo los criterios anteriormente establecidos, y la fracción seleccionada, se diluye en tampón BSA-PBS al 0,1%, de modo que 0,1 ml de - la solución den, aproximadamente, 12.000-10.000 c.p.m. .-

Si la hormona se usa inmediatamente después de - su iodación y purificación en Sephadex G-75, se repurifica de nuevo en Sephadex G-100, del modo descrito, con el fin de aumentar su grado de pureza.

I. 2. TITULACION DE ANTICUERPOSMATERIALES EMPLEADOS

A.- SOLUCIONES TAMPON :

- 1) Tampón EDTA-PBS, pH = 7,6 ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$: 9,2g;
 $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$: 9,5 g; se enrasa con tampón PBS
 hasta 1 ml y se ajusta el pH).
- 2) Tampón EDTA-PBS-NRS, pH = 7,6 : 1 suero de conejo normal (NRS), se diluye en el tampón anterior en la proporción de 1:400 .

B.- ANTICUERPOS :

Anti-FSH: preparado en conejos, contra FSH pituitaria y adsorbido con HCG.

Anti-LH : preparado en conejos, contra LH pituitaria.

Ambos anticuerpos se recibieron en 1 fracción de - 1 ml, diluido 1:2; una vez diluidos en tampón BSA-PBS a 1:100, se guardaron en fracciones de 1 ml, - a -20°C. Este material fué generosamente donado por NIAMDH,NIH (Bethesda, U.S.A.).

2º anticuerpo: Anti-gamma-globulina de conejo (anti-RGG), obtenido en cabras, suministrado por Antibodies Inc.Davis,(California).

PROCEDIMIENTO DE TITULACION DE ANTI-FSH Y ANTI-LH

Se hacen diferentes diluciones de anticuerpos en el tampón EDTA-PBS-NRS, y 0,2 ml de cada dilución se incuban con 0,1 ml de hormona marcada y con 0,5 ml de tampón BSA-PBS al 1%, durante 4 días . A continuación se añade 0,2 ml de anti-RGG de una concentración fija (1:120 diluido en PBS), y al cabo de 24 horas se centrifuga a 4.000 r.p.m., después de lavar con 1 ml de PBS durante 40 minutos; se decanta el sobrenadante y se cuenta el precipitado.

El % de la hormona marcada ligada, se calcula tomando como 100 x 100 la radioactividad total puesta en los tubos y restando, de la radioactividad de cada precipitado, la correspondiente a los tubos en que no se añade el primer anticuerpo (tubos "blanco").

Se seleccionan las diluciones de anticuerpo que den una unión, con la hormona marcada, entre 30 y 50 %, y se hacen diferentes curvas standards con cada disolución del anticuerpo. Aquella concentración que corresponda a la curva standard de máxima pendiente y que permita detectar la mínima dosis de hormona fría (standard) será la más idónea para el radioinmunoensayo.

PROCEDIMIENTO DE TITULACION DEL ANTI-RGG (2º ANTICUERPO)

La potencia del anti-RGG varía en cada lote recibi

-do, por lo que es preciso evaluarlo antes de su aplicación en el radioinmunoensayo.

Para ello se incuban 0,2 ml de anti-FSH o, anti-LH en una concentración fija (se elige la seleccionada en la titulación anterior) con 0,1 ml de hormona marcada, y 0,5 ml de tampón BSA-PBS al 1%, durante 24 horas. A continuación, se añade 0,2 ml de diferentes concentraciones de anti-RGG, y se procede del mismo modo que la titulación de anti-FSH y anti-LH. Se elige aquella concentración que dé una máxima unión del anticuerpo a la hormona marcada.

I. 3. PREPARACION DE LA CURVA STANDARD O PATRON

HORMONA STANDARD:

LER-907 : Se recibió 1 mg de extracto purificado, procedente de pituitarias humanas, en 1 ml de tampón fosfato PBS, como preparación de referencia para FSH y LH. Su potencia biológica es de 20 IU de FSH y 60 IU de LH por cada miligramo (determinación por bioensayo, 2nd IRP-HMG).

El mismo día en que se recibió, se diluyó en tampón BSA-PBS al 1% a una concentración de 200 µg/ml, añadiendo 4 ml al vial recibido, y se dividió en alícuotas de 0.1 ml, que se congelaron y se almacenaron a -20°C.

A partir de estas alícuotas se preparan los dife-

-rentes puntos de la curva standard, que tienen las siguientes concentraciones, en mIU/ml.:

FSH: 40 20 10 5,0 1,2 0,6 0,3.

LH: 120 30 15 7,5 3,75 1,8 0,9 0,4.

Con el fin de que la cantidad de proteínas presentes en todos los tubos sea lo más homogénea posible, sería conveniente hacer las diluciones anteriores, con sueros humanos, procedentes de sujetos hipofisectomizados, o pacientes hipogonadales-hipogonadotrópicos, es decir, libres de FSH y LH; pero para ello se necesitaría grandes cantidades de estos sueros que, en la práctica son muy difíciles de conseguir.

Para resolver este problema, y ver las interferencias producidas por las proteínas sédicas, hemos disuelto la hormona standard en : tampón BSA-PBS al 1%, suero de caballo, suero de buey y suero de un hipofisectomizado.

I. 4. FORMA EXPERIMENTAL DE REALIZAR EL RADIOINMUNOENSAYO DE FSH Y LH

Se usan tubos de polietileno de 1 x 7 cm, y se añaden los reactivos, por triplicado, según se indica en las tablas 3 y 4. Es conveniente realizar los ensayos a 4°C.

TABLA 3

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA USADA
EN EL RADIOINMUNOENSAYO DE FSH (NIH)

- 1°.- 200 μ l DE LAS DILUCIONES DE LA CURVA STANDARD, O 200 μ l DE LAS MUESTRAS A VALORAR.
 - 2°.- 500 μ l DE UNA MEZCLA QUE CONTIENE: 40% DE TAMPON EDTA-PBS-NRS, Y 60% DE TAMPON BSA-PBS AL 1%. EN ESTE ULTIMO TAMPON ESTA DILUIDO EL ANTI-FSH EN UNA CONCENTRACION DE 1:6.000 (DILUCION FINAL 1:30.000)
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN 24 HORAS A 4°C
 - 3°.- 100 μ l DE 125 I-FSH PURIFICADA Y DILUIDA EN TAMPON BSA-PBS AL 0,1%, DE MODO QUE 0,1 ml. DEN 10.000 c.p.m.
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN DURANTE 4 DIAS A 4°C.
 - 4°.- 200 μ l DE ANTI- RGG EN LA DILUCION ADECUADA OBTENIDA EN SU TITULACION.
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN DURANTE 48 HORAS A 4°C.
 - 5°.- SE AÑADE UN ml. DE TAMPON PBS PARA LAVAR; SE CENTRIFUGAN A 4.000 r.p.m. DURANTE 40 MINUTOS. SE ASPIRA EL SOBRENADANTE Y SE CUENTAN LAS RADIOACTIVIDADES DE LOS PRECIPITADOS.
-

o

TABLA 4

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA USADA
EN EL RADIOINMUNOENSAYO DE LH (NIH)

- 1°.- 200 μ l DE LAS DILUCIONES DE LA CURVA STANDARD, O 200 μ l DE LAS MUESTRAS A VALORAR.
 - 2°.- 500 μ l DE UNA MEZCLA QUE CONTIENE: 40% DE TAMPON EDTA-PBS-NRS, Y 60% DE TAMPON BSA-PBS AL 1%. EN ESTE ULTIMO TAMPON ESTA DILUIDO EL ANTI-LH EN UNA CONCENTRACION DE 1:40.000 (DILUCION FINAL 1:120.000).
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN 24 HORAS A 4°C.
 - 3°.- 100 μ l DE 125 I-LH PURIFICADA Y DILUIDA EN TAMPON BSA-PBS A 0,1%, DE MODO QUE 0,1 ml. DEN 10.000 c.p.m.
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN DURANTE 4 DIAS A 4°C.
 - 4°.- 200 μ l DE ANTI- RGG EN LA DILUCION ADECUADA OBTENIDA EN SU TITULACION.
SE AGITAN LOS TUBOS Y SE INCUBAN DURANTE 24 HORAS A 4°C.
 - 5°.- SE AÑADE 1 ml. DE TAMPON PBS PARA LAVAR; SE CENTRIFUGAN A 4.000 r. p.m. DURANTE 40 MINUTOS. SE ASPIRA EL SOBRENADANTE Y SE CUENTAN LAS RADIOACTIVIDADES DE LOS PRECIPITADOS.
-

Junto con los tubos que contienen las soluciones standard y los sueros a valorar, se preparan los correspondientes al punto cero (que no contienen hormona standard), y los tubos control (tubos "blanco"); en paralelo con los anteriores se ponen tubos que solamente tienen -- hormona marcada (tubos "cuentas totales"). Los tubos del punto cero se preparan del mismo modo que se indica en -- las tablas 3 y 4, con la particularidad de que en vez de añadir 200 μ l de standard o suero, se añade la misma cantidad de tampón BSA-PBS al 1%. Los tubos "blanco" se preparan igual que los anteriores, pero en la mezcla de los 500 μ l, no se añade anticuerpo anti-FSH o anti-LH. En los tubos "cuentas totales" se añade 0,1 ml de hormona marcada y 0,9 ml del tampón del ensayo.

I. 5. FORMA DE EXPRESAR LOS RESULTADOS

De cada punto de la curva standard, analizado por triplicado, se hace una media de la radioactividad de los precipitados, desechando los valores que se desvían en -- más de un 5% de la media.

Una manera de normalizar la curva standard es -- representar la radioactividad de los precipitados en %, -- tomando como 100 x 100 la radioactividad de los tubos cero, es decir, aquellos que contienen hormona marcada solamente.

A todas las radioactividades de los precipitados se les resta la radioactividad inespecífica, es decir, la de los tubos "blanco" que no contienen el primer anticuerpo.

El cálculo se realiza según la expresión:

$$\text{RPB (Relative Percent Bound)} = \frac{C - N}{C_0 - N} \times 100 = \frac{B}{B_0} \times 100$$

Siendo: C_0 la radioactividad de los tubos cero, C la radioactividad de los tubos standard o sueros a valorar, y N la radioactividad inespecífica (de los tubos "blanco").

Los resultados correspondientes a las concentraciones de las diferentes soluciones standard, se representan en ejes de coordenadas, en el eje de abscisas se expresa el logaritmo de la concentración de la hormona standard y en el eje de ordenadas el RPB correspondiente a cada concentración; uniendo los puntos obtenidos se obtiene una curva sigmoidea, definida como curva standard.

Para calcular las concentraciones de los sueros a valorar, se lleva al eje de ordenadas de la curva standard su RPB correspondiente, obtenido según la fórmula anterior; la abscisa correspondiente al punto de intersección con la curva dará la dosis de FSH o LH presentes en el suero.

Con el fin de linealizar la curva sigmoidea, utilizamos la transformación logit-log, basada en la expresi-

-sión matemática siguiente:

$$\log_e Y = \frac{RPB}{100-RPB} = \frac{B}{B_0} \times 100$$

En un eje de coordenadas, se representan estos valores en el eje de ordenadas y en el eje de abcisas los -- logaritmos decimales de la concentración de la hormona -- standard. Los valores de RPB, a los que se aplica la transformación lineal deben de estar comprendidos entre 10 y 90%. El resultado obtenido será una línea recta, cuya pendiente se calcula por el método de los mínimos cuadrados en una -- computadora HP-65. Para que estas rectas sean válidas y -- aplicables al cálculo automático de la concentración de -- hormona, en un determinado suero, su coeficiente de regresión no debe de ser menor de 0,99.

I. 6. EVALUACION DE LA CURVA STANDARD

La mínima cantidad de hormona standard que dé un valor de RPB ($B/B_0 \times 100$), significativamente diferente -- del valor correspondiente al punto cero (tubo sin hormona standard) determina la mínima dosis detectable en el ensayo. Se eligen los términos de confianza del 95%. La forma experimental de realizarlo se hace del modo siguiente: en un mismo ensayo se ponen 10 tubos cero (sin hormona stan--

-dard), 10 tubos que contengan 0,625 mIU/ml de FSH y otros 10 con 1,25 mIU/ml. A los resultados se les aplica la " t " de student para observar la significancia estadística. -- Esto mismo se aplica para el cálculo de la sensibilidad -- del radioinmunoensayo, con tubos que contengan 0,46 y 0,93 mIU/ml.

Existen diferentes formas de calcular la reproducibilidad inter e intra-ensayo. Nosotros hemos aplicado el método descrito por Rodbard (146). Para ello se hace una mezcla de sueros, se dividen en alícuotas y se guardan congelados a -20°C. Cada una de estas, junto con su dilución 1:2, se introducen como muestras a valorar, por duplicado, en todos los ensayos que se realicen. Utilizando las concentraciones de FSH y LH en mIU/ml, obtenidas para cada duplicado, se procede a calcular los siguientes parámetros:

- 1) La media de cada duplicado en cada ensayo
- 2) La diferencia entre los dos valores de los duplicados
- 3) La desviación standard, según la fórmula:

$$s = |x_1 - x_2| / \sqrt{2}$$

En el caso de que se pongan más de 2 tubos por suero, se aplica la fórmula siguiente:

$$s^2 = \sum (x - \bar{x})^2 / (r - 1) \quad \text{siendo } r = \text{n}^\circ \text{ de muestras}$$

- 4) La varianza o reproducibilidad inter-ensayo, se calcula según la fórmula siguiente:

$$s_w^2 = \sum_i s_i^2 (r_i - 1) / \sum (r_i - 1).$$

La variabilidad intra-ensayo, lo da el coeficiente de variación :

$$\%C.V. = 100 \times \frac{s}{\bar{X}}$$

siendo \underline{s} la desviación standard y \underline{X} la media total de todos los valores en todos los ensayos. Generalmente, este %C.V. se divide por la raíz cuadrada del nº de replicados y el resultado es el factor que se usa para expresar la reproducibilidad intra-ensayo.

La varianza inter-ensayo, cuando las muestras se analizan en duplicado, es el cuadrado de la desviación standard total, es decir, considerando todos los valores en todos los ensayos, y la reproducibilidad inter-ensayo se expresa como el %C.V, calculado según la fórmula anterior, - donde \underline{s} sería la desviación standard total y \underline{X} la media de todos los valores obtenidos en todos los ensayos.

La recuperabilidad (%R) la hemos calculado añadiendo 0,5 ml de una dilución del standard definida a 1 ml de un suero (cuya concentración se analiza) y otros 0,5 ml a 1 ml de tampón fosfato BSA-PBS al 1,0 %. En las determinaciones de FSH y LH del suero se añaden 0,5 ml de éste a

1 ml del tampón, para evitar variabilidad debida a la forma de dilución.

El %R se calcula según la fórmula siguiente:

$$\%R = \frac{\text{concentración (mIU/ml) de la mezcla standard + suero}}{\text{concentración del standard + concentración del suero.}}$$

Para el cálculo de la reproducibilidad en el ensayo de FSH hemos utilizado un standard cuya dilución nos ha dado una concentración de 20 mIU/ml, y para el de LH una concentración de 15 mIU/ml.

Para que una recuperabilidad, obtenida en un ensayo, sea un buen índice de que la cantidad de hormona que se determina es la presente en la muestra, ha de estar comprendida en unos valores muy próximos al 100%.

I. 7. ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DEL R.I.A.

En el R.I.A. de LH, se estudia la posible interferencia de FSH pituitaria, HCG, TSH y LH de origen urinario, en la unión de $^{125}\text{I-LH}$ con Anti-LH, y en el de FSH, la de LH pituitaria, HCG, TSH y FSH de origen urinario, en la unión de $^{125}\text{I-FSH}$ con Anti-FSH.

Con este fin, se hacen curvas standard, sustituyendo los 200 μ l de LH o FSH standards por los standards de las diferentes hormonas cuya interferencia se va a estudiar; los tiempos de incubación a que se realizan estos estudios son los mismos que se usan en los R.I.A. propios de FSH y LH .

Las interferencias observadas se expresan como la relación entre la cantidad de hormona standard propia del ensayo y la de la hormona que interfiere que dan un mismo valor de RPB; otra forma es la expresión en %, tomando como 100 x 100 la cantidad de hormona standard propia del ensayo.

Otra forma de calcular la especificidad y validez de todo R.I.A. es determinando las concentraciones de hormona presente en el suero y en sus diferentes diluciones.

De dos sueros, procedentes de mujeres menopáusicas (con dosis altas de gonadotrofinas), se hacen diferentes diluciones en el tampón del ensayo (BSA-PBS al 1%) y se valoran las muestras en un mismo ensayo. Los resultados obtenidos se representan graficamente, asociados con la curva standard del ensayo para observar el paralelismo que debe de existir; otra forma de representación es colocar las cantidades de μ l de suero real que se valora

en relación con la concentración de FSH o LH, en mIU/ml -
determinadas; uniendo los puntos obtenidos se debe de con
seguir una línea recta que pase por el origen.

II. RADIOINMUNOENSAYO DE FSH Y LH POR

"KITS" COMERCIALES DE SERONO

Simultáneamente con el método anterior hemos utilizado los "Kits", procedentes de los laboratorios Serono (Italia), para la valoración de FSH y LH humanas en suero. Estos "Kits", se basan en la precipitación del complejo -- antígeno-anticuerpo por el método del doble anticuerpo.

II. 1. COMPOSICION DE LOS "KITS" . KIT DE FSH:

- ^{125}I -FSH : Preparada por la iodación de FSH humana de origen urinario con ^{125}I , por el método de cloramina -T, según el método de Greenwood- y col.(91) y purificada en celulosa-DEAE, por el método descrito por Donini (306). La actividad específica es de 150-250 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$. La solución recibida se diluye 1:12,5 para conseguir una concentración de 1 ng/ml.
- ANTI-FSH : Preparado en conejos inyectando FSH humana semipurificada de origen urinaria.
- FSH-STANDARD : Preparada con gonadotrofinas humanas procedente de orinas de mujeres menopaúsicas. La solución recibida, al diluirla 1:25 -- tiene una concentración de 50 mIU/ml de

FSH (2nd IRP-HMG). Los demás puntos de la curva, se obtienen por dilución 1:2 de la anterior.

"KITS" DE LH

^{125}I -HMG : Preparada por la iodación de HCG, altamente purificada, según el método de Greenwood y Col (91), y purificada en celulosa DEAE (322). La actividad específica es de 150--250 uC/ug. La solución recibida se diluye 1:12,5 para obtener una concentración de 1 ng/ml.

ANTI-HCG : Preparado en conejos, por inyección de una preparación altamente purificada de HMG -- (323).

LH STANDARD : Consiste en HMG obtenida de gonadotrofinas humanas procedentes de orinas de mujeres -- menopaúsicas. La solución recibida se diluye 1:25, para obtener una concentración de 50 mIU/ml (LH 2nd IRP-HMG). Los demás -- puntos de la curva standard se preparan -- por diluciones sucesivas 1:2.

La precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, en ambos "Kits", se realiza por la adición del 2º anticuerpo, anti-

RGG, que consiste en anti-gamma-globulinas de conejo obtenidos en ovejas.

El tampón usado en las diluciones del material anterior y en el R.I.A., es tampón fosfato 0,01M al -- 0,25% de BSA, que contiene 5,827 g de EDTA₄ y 0,1 g de azida sódica, en 1 litro de agua destilada.

El cuadro que se representa en la Tabla 5, ex plica esquemáticamente la forma de realizar estos radio inmunoensayos. Los tubos standard, muestra, y "cero" tie nen el mismo significado que en el método anteriormente descrito de N.I.H.; del mismo modo en cada ensayo se po nen los tubos "blanco", para el cálculo de la radioacti vidad inespecífica.

Los cálculos necesarios para construir la cur- va standard, evaluar los resultados, estudiar la especi ficidad y validez del método, se realizan del mismo mo- do que se describió en el método de N.I.H.

TABLA 5

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA USADA
EN EL R.I.A DE FSH(SERONO)

REACTIVOS	TUBOS STANDARD	TUBOS MUESTRA	TUBOS "CERO"
MUESTRA	-	0,2ml	-
FSH STANDARD	0,2ml	-	-
TAMPON	-	-	0,2ml
ANTI-FSH	0,2ml	0,2ml	0,2ml
MEZCLAR E INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE DE 6-20 HORAS			
¹²⁵ I-FSH	0,1ml	0,1ml	0,1ml
MEZCLAR E INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE 24 HORAS			
ANTI-RGG	0,2ml	0,2ml	0,2ml
MEZCLAR E INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE 24 HORAS			
CENTRIFUGAR A 2.500-3.000 r.p.m.			

III. MATERIAL HUMANO

- A) SUJETOS NORMALES: Este grupo comprende hombres y mujeres, que no padecían de enfermedad endocrinológica o general alguna, y cuyos análisis elementales de sangre y orina eran normales. En este grupo se incluyeron, estudiantes de Medicina del Hospital Clínico de San Carlos, Facultad de Medicina, y estudiantes de la Escuela de enfermeras del mismo Hospital.
- B) PACIENTES: Procedentes, fundamentalmente, de los Servicios de Endocrinología de la 1ª Cátedra de Patología General (Prof. A. Fernández-Cruz), y del Servicio de Endocrinología Ginecológica del Dpt. de Obstetricia y Ginecología (Prof. J. Botella-LLusía).

IV. TOMAS DE SANGRE Y TEST DE ESTUDIO DELEJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADALA) TOMAS DE SANGRE

Los pacientes, o sujetos normales, a los que se les va a realizar las extracciones de sangre, necesitan estar en ayuno; los niveles de FSH, y LH, no están afectados por la postura, stress o actividad física. Debido a -- las fluctuaciones pulsátiles de estas hormonas, más -- acusadas en LH que en FSH y teniendo en cuenta que no presentan, al parecer, ritmo circadiano, las muestras se pueden tomar a cualquier hora del día, aunque es -- preferible tomarlas en la s primeras horas de la mañana. Nosotros, por rutina, hemos hecho las extracciones de 8 a 9 de la mañana. Una vez centrifugada la sangre, se guardan los sueros, en el congelador a -20°C , hasta el día en que se vaya a realizar su valoración. Cada -- suero se añade por duplicado en cada ensayo.

Se deben de hacer por lo menos 2 o 3 tomas de sangre, en cada sujeto, en días diferentes, sobretodo en mujeres , ya que, debido a las variaciones de estas -- hormonas, los datos obtenidos de una sola toma basal -- nos llevaría a falsas conclusiones.

B) TEST DE CLOMIFENO

Después de efectuar una extracción basal, se administran, por vía oral, 100 mg de clomifeno, repartidos - en 4 tomas, durante 5 días; en el 1º y 2º día post - clomifeno se hacen nuevas extracciones para la deter_uminación de FSH y LH .

C) TEST DE LH-RH

Por vía intravenosa se administra una dosis de 100 ug de LH-RH sintético, y se efectúan extracciones antes y después de 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos de la inyección.

D) EFFECTO DE LOS ESTROGENOS EN LA RESPUESTA DE FSH Y - LH AL TEST DE LH-RH EN MUJERES NORMALES.

Se realiza un goteo, i.v. de suero fisiológico, durante 4 horas, en el que se disuelven 20 mg de Conestrón (estrógenos equinos), que es una dosis sobradamente superior a la fisiológica.

A las 2 horas de comenzar el goteo, se inyectan 100 µg de LH-RH; las extracciones se realizan del modo siguiente: una toma basal y diferentes tomas - a los 30, 60, 90, y 120 minutos después de comenzar el goteo con Conestrón; se siguen tomando muestras

a los 15, 30, 45, 90, y 120 minutos después de la -
inyección de LH-RH en algunas mujeres se continúan
las tomas a los 150, 180, 210 y 240 minutos.

E) EFECTO DE LA TESTOSTERONA EN LA RESPUESTA DE FSH Y
LH AL TEST DE LH-RH EN HOMBRES NORMALES.

De forma similar al test descrito anteriormente, se
inyectan 12 mg de testosterona disuelta en 0,5 ml -
de alcohol absoluto, dosis con la que se logra un -
efecto farmacológico.

I. RADIOINMUNOENSAYO DE FSH Y LH POR EL METODO
DE N.I.H. (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH)

I. 1. IODACION O MARCAJE DE FSH Y LH

Las purificaciones de ^{125}I -FSH y ^{125}I -LH, después de su iodación en Sephadex G-100, se representan en las Figuras - 14 y 15, respectivamente, que muestran las radioactividades, en cuentas $\times 10^3$, durante 0,1 minutos, de cada 10 μl de las fracciones de 0,5 ml (Tubo nº) recogidas de las columnas. En ambas Figuras aparecen dos picos de radioactividad, el primero (marcado con círculos) corresponde a la hormona marcada, y el segundo al ^{125}I libre (en forma de Na^{125}I), no incorporado.

Cuando se añade a las columnas $^{125}\text{I}\text{Na}$, en las mismas condiciones de la iodación pero sin hormona, la distribución de la radioactividad del eluato coincide con el segundo pico de las Figuras.

La cantidad de Iodo radioactivo incorporado a la hormona, expresado en % de radioactividad del primer pico en relación con la radioactividad total, que da un índice de la eficacia de la iodación, junto con las actividades específicas conseguidas en cuatro iodaciones de FSH y LH se ilustra en la Tabla 6.

TABLA 6
VALORES DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA Y DEL % DE ^{125}I INCORPORADO
A LA HORMONA EN CUATRO IODACIONES DE FSH Y LH.

% DE ^{125}I INCORPORADO A 2,5 μg DE FSH	ACTIVIDAD ESPECIFICA RELATIVA
51,9	207
40,6	162
46,5	185
38,5	160

MEDIA \pm D.S. = 44,38 \pm 6,05	178,5 \pm 22,13

% DE ^{125}I INCORPORADO A 5 μg DE LH	ACTIVIDAD ESPECIFICA RELATIVA
41,6	83,2
59,5	119,0
75,5	153
76	151

MEDIA \pm D.S. = 63,15 \pm 16,28	126,55 \pm 32,83

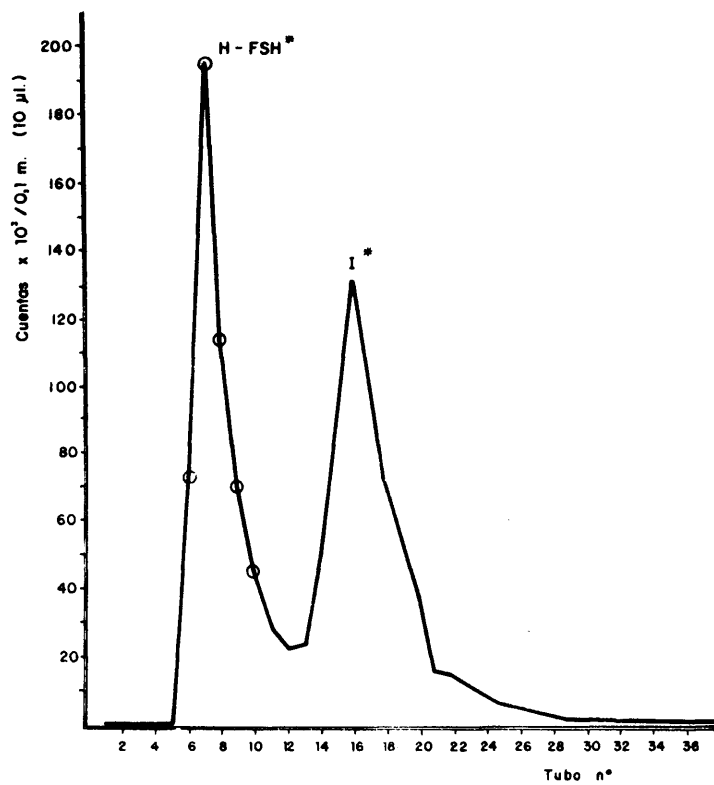


FIG. 14: SEPARACION DE ^{125}I -FSH Y DE ^{125}I LIBRE, DESPUES DE UNA IODACION DE 2,5 μg DE FSH(LER-1366) CON 1 μCi DE Na^{125}I , EN SEPHADEX G-75 (0,9 x 15 cm). EL PRIMER PICO ES DE ^{125}I -FSH Y EL SEGUNDO DE ^{125}I LIBRE. LAS FRACCIONES RECOGIDAS EN CADA TUBO SON DE 0,5 ml.

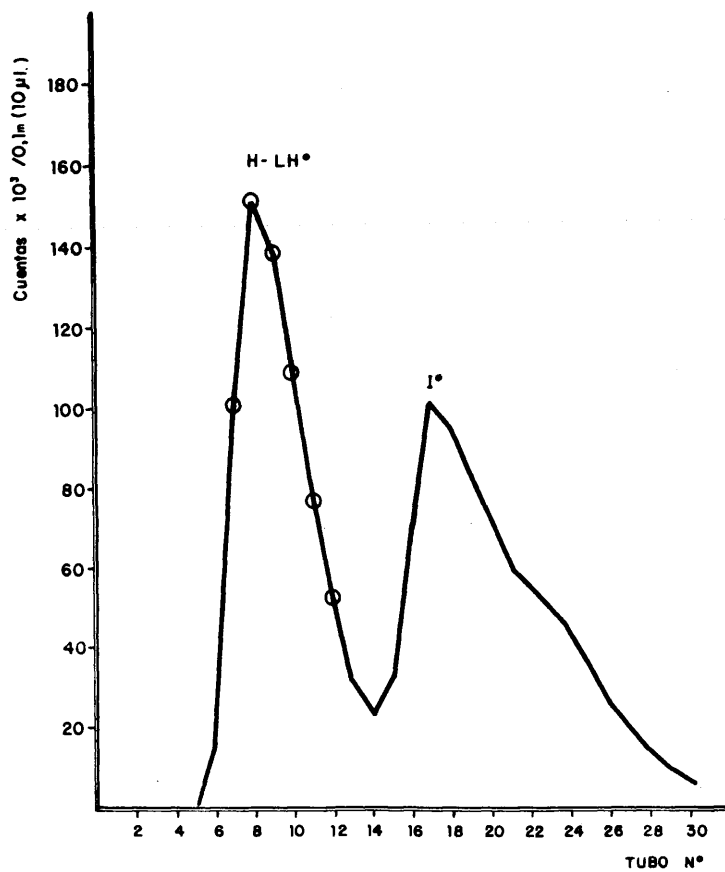


FIG. 15: SEPARACION DE ^{125}I -LH Y DE ^{125}I LIBRE, DESPUES DE UNA IODACION DE 5 μg DE LH(LER-960) CON 1 mCi DE Na^{125}I , EN SEPHADEX G-75 (0,9 x 15 cm). EL PRIMER PICO ES DE ^{125}I -LH Y EL SEGUNDO DE ^{125}I LIBRE. LAS FRACCIONES RECOGIDAS EN CADA TUBO SON DE 0,5 ml.

El % de ^{125}I incorporado a FSH es menor que el de LH lo que demuestra que la FSH es más difícil de iodar.

Con el fin de conocer qué fracciones del primer pico (hormona marcada) son las más puras, y por tanto las más idóneas para el R.I.A., hemos realizado electroforesis, en papel-Whatman nº 1, de los tubos 6,7 y 8 de la purificación de ^{125}I -FSH; como puede observarse en la Figura 16, que expresa las radioactividades, en cuentas $\times 10^3$, durante 0,1 minutos, de cada una de las fracciones de 2 mm de las tiras del papel electroforético, la hormona pura no se desplaza del punto de aplicación (punto 0), mientras el ^{125}I libre (I) se desplaza hacia la región anódica (+).

El grado de pureza de cada tubo, expresado por \underline{R} (relación entre la base y la altura del primer pico situado en el punto 0) y por %E (% de radioactividad en el origen en relación con la total), obtenidos en la electroforesis, junto con los resultados conseguidos al someterlos a la precipitación -- por TCA (Acido tricloroacético) e Inmunoprecipitación con Anti-FSH (ver Material y Métodos), se representan en la Tabla 7.

Los tubos 7 y 8, que dan mayor precipitación con -- TCA (%TCA) y con Anti-FSH (%B/T), menor \underline{R} en la electrofore-- sis (y por tanto mayor %E) y menor precipitación inespecífica

TABLA 7

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ELECTROFORESIS, PRECIPITACION POR TCA, E INMUNOPRECIPITACION DE LOS TUBOS 6,7 Y 8 DE LA PURIFICACION DE ^{125}I -FSH (FIG.14) Y DE LOS TUBOS 7,8 Y 9 DE LA PURIFICACION DE ^{125}I -LH (FIG.15) EN SEPHADEX G-75.

TUBOS	ELECTROFORESIS		TCA INMUNOPRECIPITACION			
	R	%E	%TCA	%B/T	%R.I(N)	
^{125}I -FSH	6	0,71	35	83	38	6
	7	0,31	42	90	46	3,2
	8	0,34	37	90	45	3
^{125}I -LH	7	0,69	33	83	58	8
	8	0,28	45	91	65	3,8
	9	0,31	38	90	62	2,5

R=COCIENTE ENTRE LA BASE Y ALTURA DEL PICO DE LA HORMONA MARCADA
 %E= % DE RADIOACTIVIDAD EN EL ORIGEN DE APLICACION DE LA MUESTRA
 %TCA=% DE RADIOACTIVIDAD EN EL PRECIPITADO OBTENIDO POR TCA.

%B/T= % DE RADIOACTIVIDAD PRECIPITADA POR EL ANTICUERPO ESPECIFICO Y RESTADA DE N.(TUBOS CERO).

%R.I =% DE RADIOACTIVIDAD PRECIPITADA EN AUSENCIA DEL ANTICUERPO ESPECIFICO (TUBOS BLANCO)

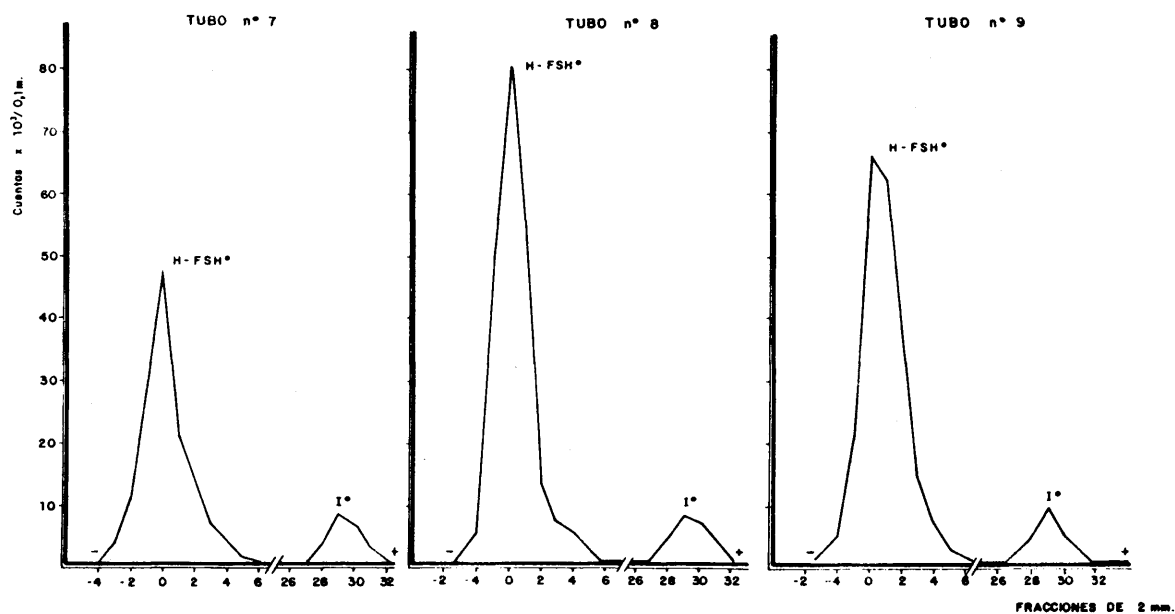


FIG.16: ELECTROFORESIS EN PAPEL WHATMAN N°1, DE LOS TUBOS 6,7, Y 8 DE LA PURIFICACION EN SEPHADEX G-75 DE FSH (FIG.14). EL PUNTO CERO ES EL PUNTO DE APLICACION DE LA MUESTRA. EL ^{125}I LIBRE SE DESPLAZA A LA REGION ANODICA(-) Y LA HORMONA PURA MARCADA SE QUEDA EN EL ORIGEN.

(%R.I.), son los de mayor pureza. En la misma Tabla anterior aparecen los resultados, basados en los mismos criterios de pureza, aplicados a los tubos 7, 8 y 9 de la purificación de $^{125}\text{I-LH}$; los tubos más adecuados para el R.I.A. de LH son los 8 y 9.

Estos resultados nos llevan a la conclusión de que, en ambas purificaciones de FSH y LH, en Sephadex G-75, deben de elegirse los tubos que corresponden a la máxima radioactividad del primer pico (hormona marcada) y los más próximos en la parte descendiente de la curva.

Una vez elegidas las fracciones de mayor pureza de la hormona marcada, se mezclan y divididas en alícuotas se guardan congeladas a -20°C . para su uso en ensayos posteriores. Antes de comenzar un R.I.A. se debe de repurificar cada alícuota en Sephadex G-100. Como se puede observar en la Figura 17, a medida que transcurre el tiempo después de la iodación de la hormona, aumenta el segundo pico correspondiente al ^{125}I libre; al cabo de 2 días de la iodación de $^{125}\text{I-FSH}$ el % de Iodo libre es de 7,2, de 22 días es de 29,6% y de 44 días de 38%. Por otra parte, la base del primer pico (hormona marcada) va aumentando y aparece un tercer pico, en la parte ascendiente del primero, que corresponde a hormona deteriorada.

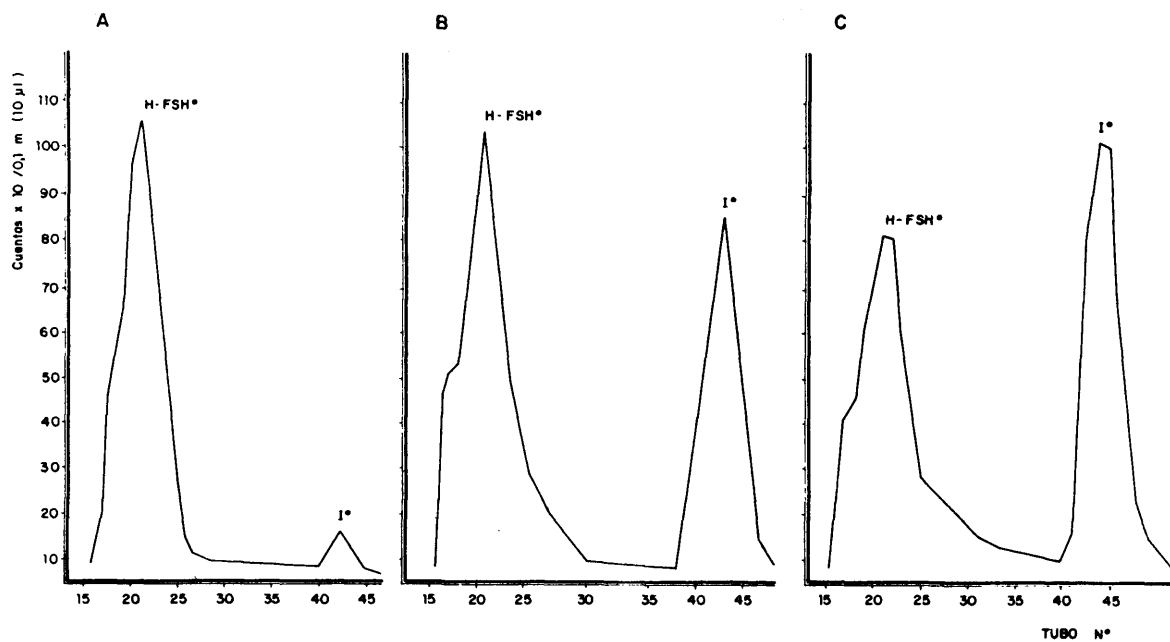


FIG. 17: REPURIFICACION EN SEPHADEX 6-100 DE ¹²⁵I-FSH DESPUES DE SU IODACION Y PURIFICACION EN SEPHADEX 6-75.
 A): AL CABO DE DOS DIAS DESPUES DE SU IODACION. B): AL CABO DE 22 DIAS DESPUES DE SU IODACION.
 C): AL CABO DE 44 DIAS DESPUES DE SU IODACION.

Estudiando las fracciones del primer pico de la hormona marcada, según los criterios de pureza establecidos, se observa que, al igual que en la purificación con Sephadex G-75, el tubo de máxima radioactividad y los más próximos en la parte descendente de la curva son los más idóneos para el R.I.A. Con ellos se hace una mezcla y se diluye en tampón BSA-PBS al 0,1% de modo que 0,1 ml den, aproximadamente, 10.000-12.000 c.p.m. (cuentas por minuto).

I. 2. TITULACION DE ANTI-FSH y ANTI-LH

La unión de ^{125}I -FSH y ^{125}I -LH a sus anticuerpos - específicos aumenta a medida que la concentración de éstos es mayor. Las diluciones de Anti-FSH que dan una unión comprendida entre 30 y 50% varían de 1:60.000 a 1:5.000 (Fig. 18) y las de Anti-LH de 1:90.000 a 1:200.000 (Fig. 19).

Con diluciones de ambos anticuerpos, comprendidas en los intervalos anteriores, 1:90.000 y 1:200.000 para Anti-FSH y 1:10.000, 1:20.000, 1:30.000 y 1:60.000 para Anti-LH, se han realizado diferentes curvas standards. Como puede observarse en las Figuras 21 y 22, la pendiente y sensibilidad (definida como la mínima dosis de hormona standard detectable), de estas curvas son mayores con concentración menor de anticuerpo.

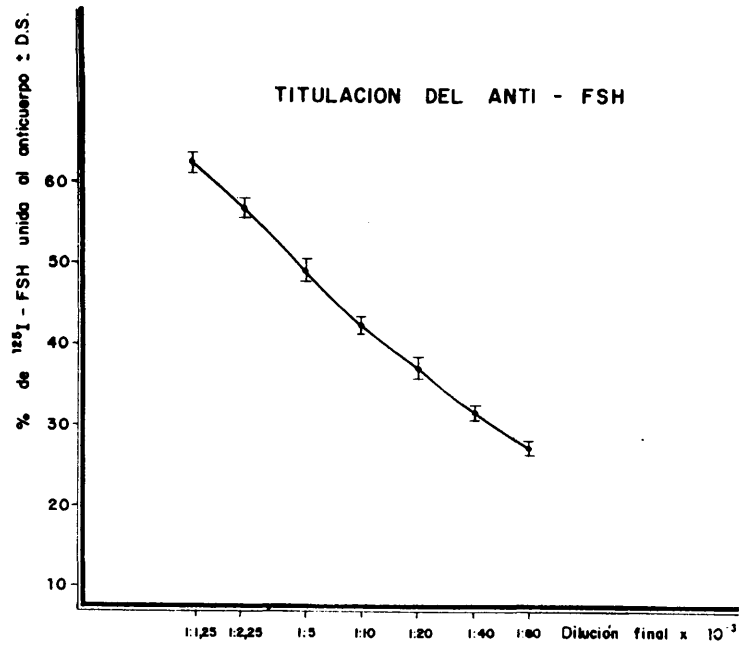


FIG.18:TITULACION DEL ANTISUERO ANTI-FSH.LAS DILUCIONES DE ANTI-FSH COMPRENDIDAS ENTRE 1:60.000 Y 1:5.000,QUE DAN UNA UNION CON ¹²⁵I-FSH DE 30-50% SON LAS MAS ADECUADAS PARA EL ENSAYO.

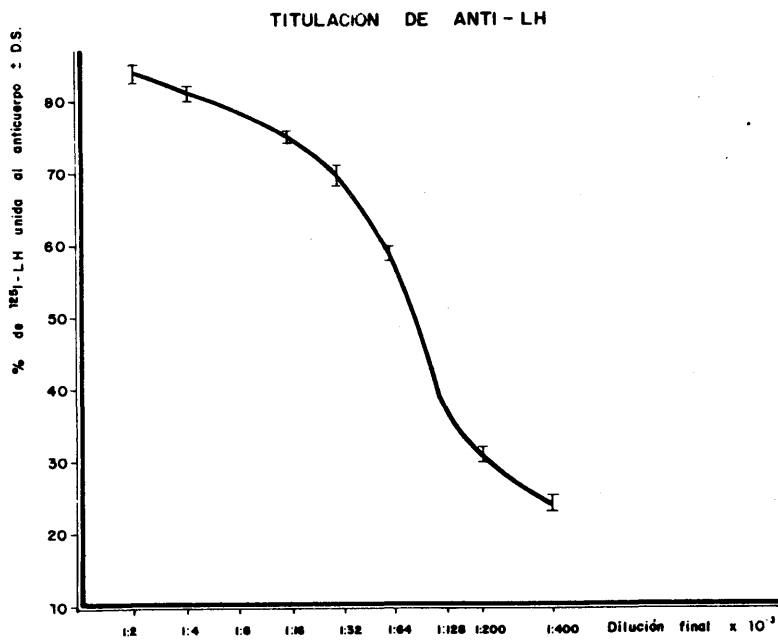


FIG.19:TITULACION DEL ANTISUERO ANTI-LH.LAS DILUCIONES DE ANTI-LH COMPRENDIDAS ENTRE 1:90.000 Y 1:120.000,QUE DAN UNA UNION CON ¹²⁵I-LH DE 30-50%, SON LAS MAS ADECUADAS PARA EL ENSAYO.

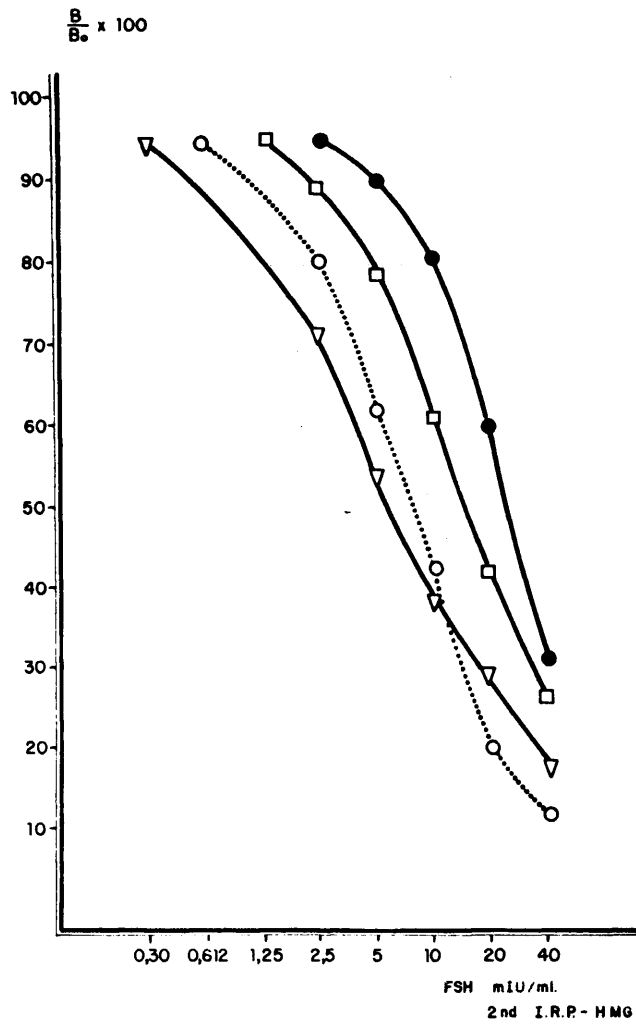


FIG. 20: CURVAS STANDARDS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTI-FSH (●—●) 1:10.000, (□—□) 1:20.000, (○—○) 1:30.000, (△—△) 1:60.000. LA CURVA PUNTEADA (1:30.000) ES LA MAS ADECUADA PARA LA VALORACION DE FSH.

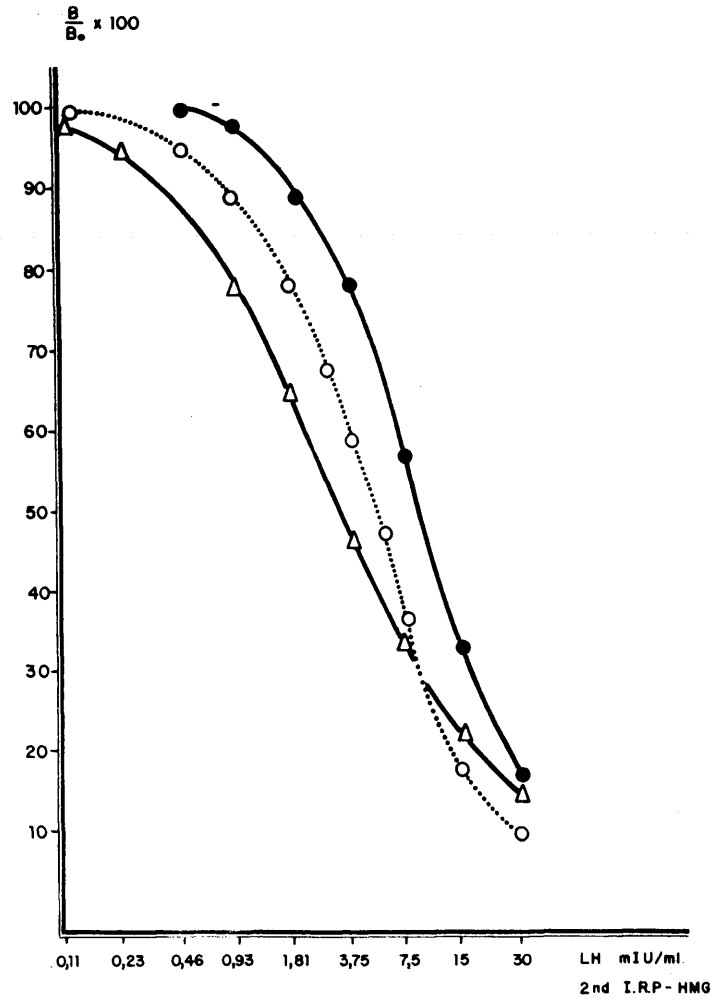


FIG. 21: CURVAS STANDARDS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTI-LH (●—●) 1:90.000, (○—○) 1:120.000, (△—△) 1:220.000. LA CURVA PUNTEADA (1:120.000) ES LA MAS ADECUADA PARA LA VALORACION DE LH.

Las diluciones de Anti-FSH 1:30.000 y de Anti-LH 1: 120.000 proporcionan curvas standards (dibujadas en punteado) con muy buena sensibilidad, pendiente y precisión, y son las que elegimos para los R.I.A. de FSH y LH.

I. 3. TITULACION DE ANTI-RGG (SEGUNDO ANTICUERPO)

En el eje de abcisas de la Figura 22 se representan las diferentes diluciones del Anti-RGG y en el eje de ordenadas el % de ^{125}I -FSH unido al anticuerpo Anti-FSH, a una dilución de 1: 30.000, \pm la D.S. La radioactividad unida al anticuerpo aumenta a medida que aumenta la concentración de Anti-RGG hasta llegar a un punto (1:25) en el que comienza a decrecer; esta concentración, que dá un máximo de unión de la hormona marcada al anticuerpo es la que se elige en el R.I.A. de FSH.

TITULACION DEL 2° ANTICUERPO: Anti-RGG

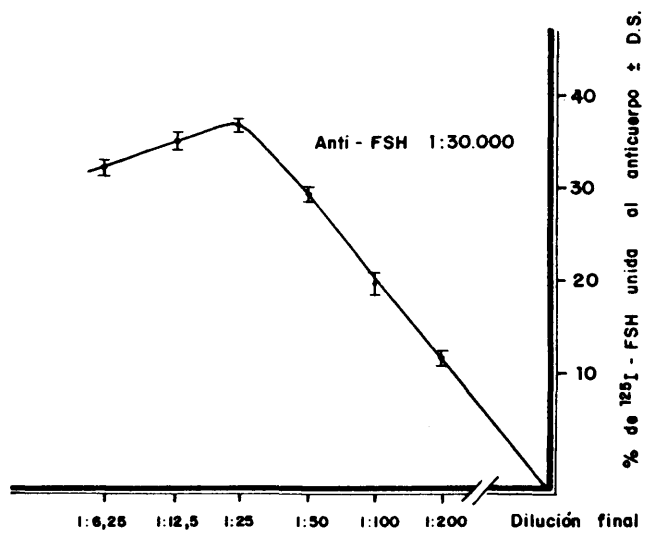


FIG. 22: TITULACION DE ANTI-RGG (2°ANTICUERPO). LA CONCENTRACION 1:25 QUE DA UNA MAXIMA UNION DE ^{125}I -FSH AL ANTICUERPO ANTI-FSH (1: 30.000) ES LA QUE SE USA EN EL R.I.A. DE FSH.

I. 4. CURVAS STANDARDS DE FSH Y LH

La media de 12 curvas standards de FSH y de 14 de LH, la D.S., E.S.M., y el % C.V. (coeficiente de variación) se ilustran en las Tablas 8 y 9. La representación gráfica de estas curvas (Figuras 23 y 24) expresan los valores de $B/B_0 \times 100$ (\pm D.S.) para cada concentración de la hormona standard (en mIU/ml, 2nd IRP-HMG). Los %C.V. obtenidos de las diferentes curvas standard son menores en los puntos de concentraciones de hormona standard más pequeños.

Basandonos en la transformación logit-log, hemos transformado las curvas sigmoideas anteriores en líneas rectas muy bien definidas. La recta representativa de la curva de FSH, como se puede observar en la Figura 25, tiene una pendiente de -2,77 y un coeficiente de regresión de 0,990. Las pendientes de las rectas correspondientes a las 12 curvas de FSH varían entre -3,0 y -2,3.

La recta representativa de LH se ajusta a la ecuación $y = -2,55X + 1,46$ y el coeficiente de regresión es de 0,9991, más próximo a la unidad que el de FSH (Figura 26). Los valores individuales de las pendientes de las 14 curvas standards de LH varían de -3,0 a -2,2. Esto, que de-

TABLA 8

VALORES DE RPB ($B/B_0 \times 100$) CORRESPONDIENTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FSH STANDARD (NIH) OBTENIDOS EN 12 CURVAS STANDARDS

mIU/ml	0*	40	20	10	5	2,5	1,25	0,61
	39,40	11,26	39,12	66,13	71,47	84,95	88,62	91,40
	29,80	10,10	23,21	40,25	64,05	83,75	89,81	92,93
	42,89	12,02	24,67	44,32	64,98	75,40	88,44	93,16
	50,12	14,61	30,15	54,16	70,83	86,93	90,56	94,37
	36,16	15,21	29,00	51,69	66,28	82,41	84,71	90,18
	30,10	5,84	16,69	41,86	63,84	79,17	88,00	93,20
	37,28	9,20	25,32	45,37	68,07	80,69	87,93	88,57
	31,10	15,11	26,73	47,03	62,19	75,83	85,37	89,53
	22,36	21,93	28,87	53,49	60,40	83,13	86,44	89,42
	29,58	9,92	20,77	41,16	62,07	76,18	85,10	91,81
	26,20	5,21	18,60	39,92	61,11	76,06	86,19	88,51
	35,99	7,68	18,03	40,26	52,64	69,42	84,60	88,87
MEDIA	34,25	11,51	25,10	47,14	63,99	79,49	87,15	90,96
D. S.	7,65	4,69	6,32	7,93	5,07	5,05	2,03	2,12
E.S.M.	2,21	1,35	1,83	2,29	1,46	1,46	0,58	0,61
%C.V.	22,34	40,75	25,18	16,82	7,92	6,35	2,33	2,33

* LOS VALORES DE ESTA COLUMNA REPRESENTAN B/T CORRESPONDIENTES A LOS TUBOS CERO (SIN HORMONA STANDARD)

TABLA 9

VALORES DE RPB ($B/B_0 \times 100$) CORRESPONDIENTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LH STANDARD (NIH) OBTENIDOS EN 14 CURVAS STANDARDS.

mIU/ml	0*	30	15	7,5	3,75	1,875	0,937	0,468
	29,90	9,55	12,25	28,61	52,77	72,35	91,61	95,14
	36,30	9,29	17,56	31,50	49,26	65,37	79,89	86,43
	26,41	7,19	9,41	24,26	42,31	63,91	79,48	87,23
	24,20	7,87	10,29	26,53	46,26	69,87	86,89	95,37
	40,30	10,93	18,46	34,14	55,32	69,47	79,56	83,01
	47,79	10,58	19,54	38,04	54,84	75,79	89,97	96,56
	37,58	10,16	19,50	33,76	55,44	70,75	82,88	90,00
	38,00	9,53	18,62	35,30	53,03	68,99	83,52	87,81
	47,81	9,36	18,05	36,85	59,74	78,59	93,19	94,29
	42,50	9,49	19,84	32,44	51,18	68,79	76,07	85,31
	36,20	9,54	15,22	30,00	42,03	62,56	81,94	85,96
	41,75	8,50	16,19	31,32	51,83	65,50	80,49	95,31
	36,80	6,35	12,70	22,19	42,55	59,93	73,65	86,47
	42,79	9,84	21,23	40,10	61,70	76,40	87,56	91,60
MEDIA	37,74	9,16	16,35	31,79	51,30	69,14	83,34	90,04
D.S.	7,08	1,27	3,79	5,16	6,22	5,40	5,80	4,57
E.S.M.	1,89	0,34	1,01	1,38	1,66	1,44	1,55	1,22
%C.V.	18,76	13,86	23,18	16,23	12,12	7,81	6,96	5,08

* LOS VALORES DE ESTA COLUMNA REPRESENTAN B/T CORRESPONDIENTES A LOS TUBOS CERO (SIN HORMONA STANDARD)

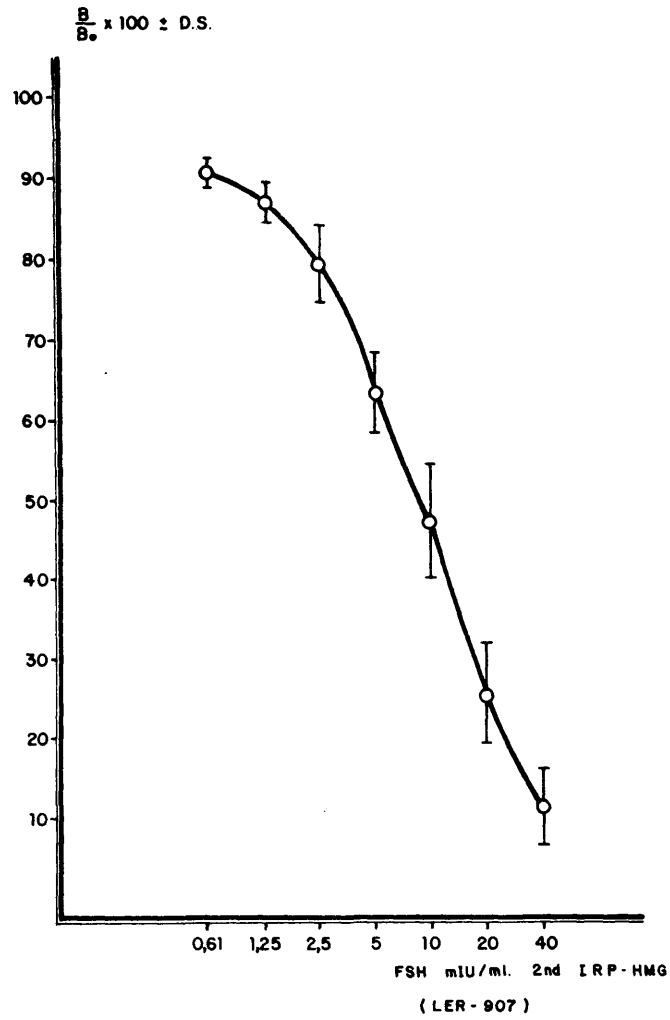


FIG. 2. CURVA STANDARD DE FSH EN ESCALA SEMILOGARITMICA. CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DE 12 DETERMINACIONES \pm LA DESVIACION STANDARD (D.S.). EL ANTICUERPO USADO ES DE UNA CONCENTRACION 1:30.000.

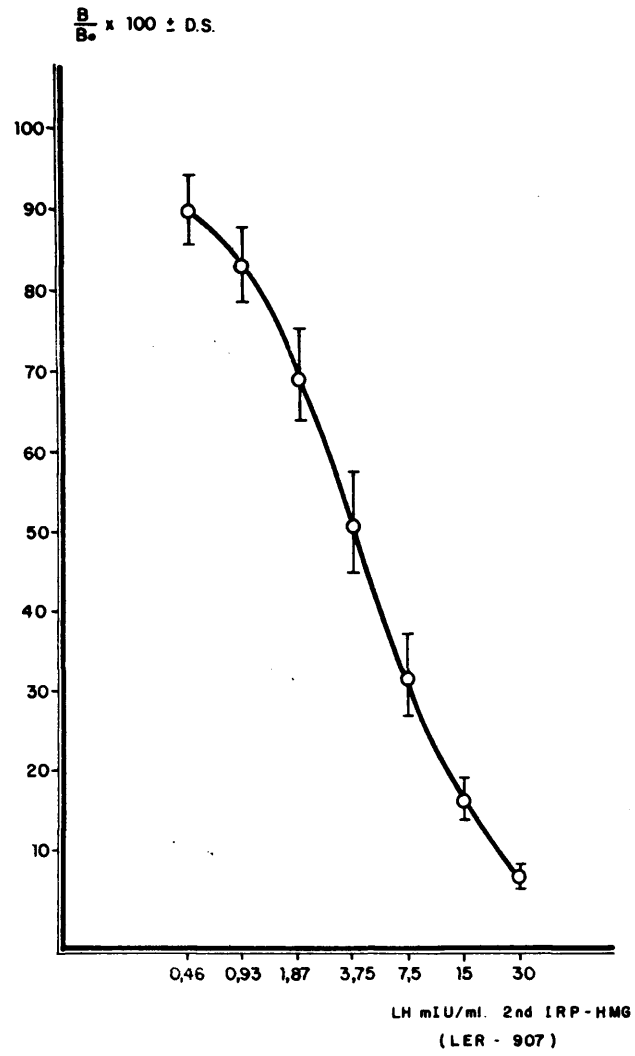


FIG. 24: CURVA STANDARD DE LH EN ESCALA SEMILOGARITMICA. CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DE 14 DETERMINACIONES \pm LA DESVIACION STANDARD (D.S.). EL ANTICUERPO USADO ES DE UNA CONCENTRACION 1:120.000

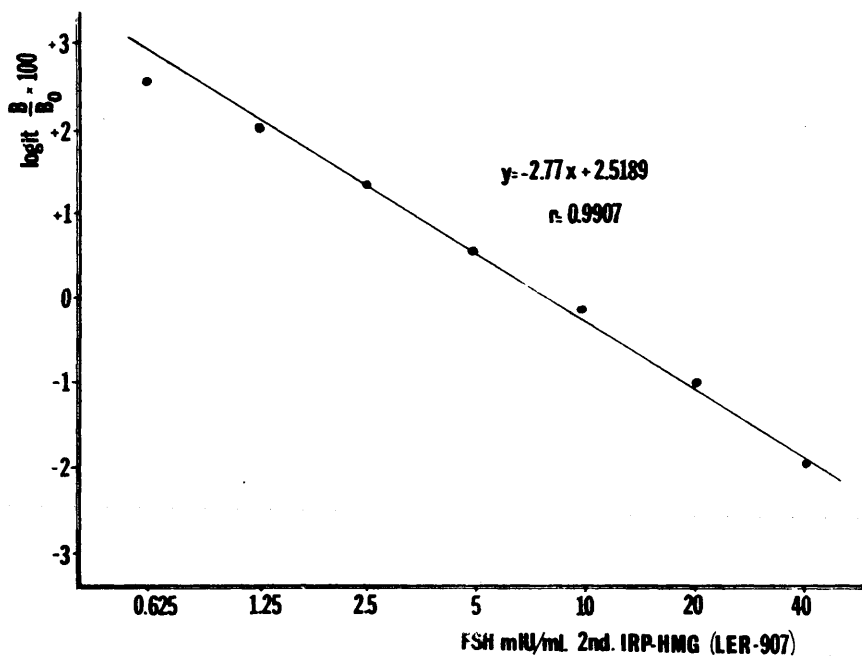


FIG 25: REPRESENTACION EN ESCALA LOGIT-LOG DE LA CURVA STANDARD DE FSH (NIH) DE LA FIG. 23.

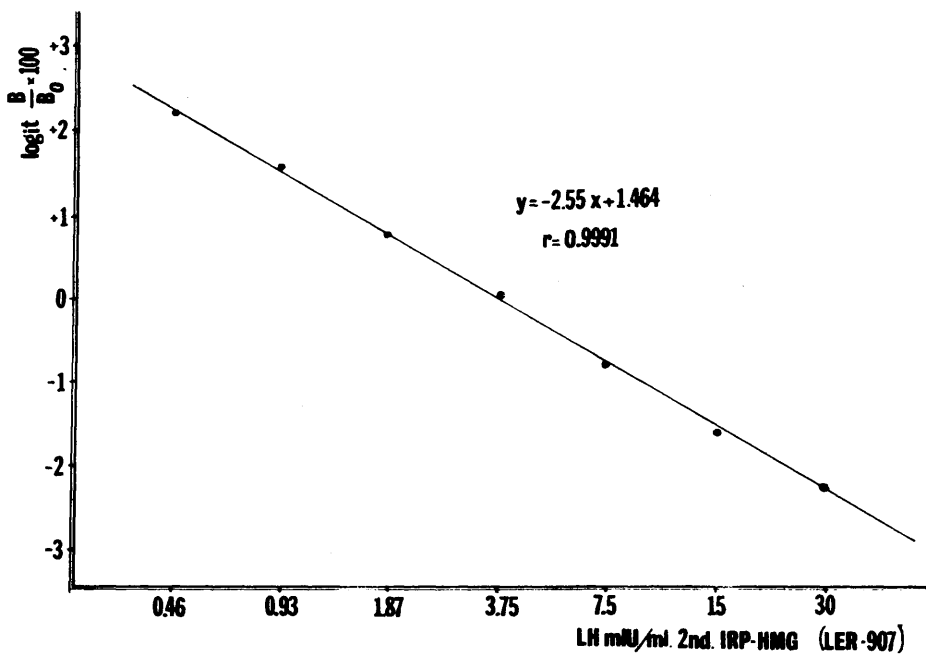


FIG 26: REPRESENTACION EN ESCALA LOGIT-LOG DE LA CURVA STANDARD DE LH (NIH) DE LA FIG. 24.

muestran la linealidad de las curvas, nos permite calcular de una forma automática las concentraciones de FSH y LH en un suero, con una calculadora HP-75.

La sensibilidad de los radioinmunoensayos se calcula tal cómo expresa la Tabla 10, donde se señalan los valores de la relación B/T (radioactividad del precipitado/radioactividad total), de cada uno de los 10 tubos sin hormona standard (tubos cero) y de los 10 que contienen dosis muy pequeñas de FSH y LH, sus medias y los valores estadísticos (D.S., E.S.M.) La sensibilidad del R.I.A. de FSH es 1,25 mIU/ml, ya que es la mínima dosis que proporciona una media de la reacción B/T que difiere significativamente de la media correspondiente a los tubos cero del ensayo; por esta misma razón la sensibilidad del R.I.A. de LH es 0,468 mIU/ml, mayor que la de FSH.

En el cálculo de la recuperabilidad (tal como se indica en Material y Métodos) de FSH, la concentración del suero usado fué de $\bar{M} = 5$ mIU/ml, la de la hormona standard $\bar{M} = 20$ mIU/ml, la de las mezclas de los anteriores $\bar{M} = 26,0$ mIU/ml (de los valores : 26,3 ; 27,4 ; 24,5 ; 25), por tanto la recuperabilidad, o %R $\equiv \frac{\text{concentración de la mezcla}}{\text{concentración del suero} + \text{la del standard}}$

$$= 26,0 / 20 + 5 = 104 \%$$

TABLA 10

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN EL R.I.A. DE FSH Y LH (NIH)

	FSH mIU/ml			LH mIU/ml		
	0	0,6125	1,25	0	0,468	0,937
	44,06	43,25	40,14	36,37	32,33	30,35
	43,47	42,44	40,48	38,93	32,63	31,40
	41,94	41,99	38,70	36,95	33,39	29,71
	42,72	42,27	40,26	36,25	33,10	30,39
% B/T	42,70	41,44	40,14	34,91	34,40	30,35
	41,85	41,54	40,20	39,84	35,00	32,25
	42,81	41,07	40,81	34,53	35,60	30,73
	41,47	41,47	39,78	45,40	31,20	31,87
	42,63	41,34	38,80	34,20	35,20	30,15
	40,81	42,81	40,27	36,53	34,80	28,80
MEDIA	42,44	41,96	39,96	36,39	33,77	30,60
D.S.	0,94	0,71	0,69	1,83	1,45	1,02
E.S.M.	0,30	0,23	0,22	0,58	0,46	0,32
"t" n=18		1,27	6,71**		3,56*	8,74**

* SIGNIFICATIVAMENTE DISTINTO DE CERO P < 0,01

** SIGNIFICATIVAMENTE DISTINTO DE CERO P < 0,001

TABLA 11

REPRODUCIBILIDAD EN EL R.I.A. DE FSH Y LH (NIH) SEGUN EL METODO DE RODBARD (146)

ENSAYO n°	FSH mIU/ml(NIH)				ENSAYO n°	LH mIU/ml(NIH)			
	X ₁	X ₂	\bar{X}	D.S.		X ₁	X ₂	\bar{X}	D.S.
1	8,0	8,0	8,0	0,0	1	5,2	5,6	5,4	0,28
2	7,5	8,5	8,10	0,71	2	5,0	4,5	4,75	0,35
3	10,5	11,0	10,75	0,35	3	5,8	6,0	5,9	0,14
4	9,3	9,0	9,15	0,21	4	7,0	7,4	7,2	0,28
5	11,0	11,5	11,25	0,35	5	6,2	6,8	6,5	0,42
6	11,0	10,2	10,60	0,57	6	6,0	6,4	6,2	0,28
MEDIA	9,55	9,7	9,63	0,37	MEDIA	5,87	6,12	5,99	0,29
D.S.	1,53	1,41	1,44		D.S.	0,72	1,01	0,86	
E.S.M.	0,63	0,58	0,59		E.S.M.	0,30	0,41	0,35	

R. INTRA-ENSAYO

D.S. = $0,37/\sqrt{2} = 0,26$; %C.V. = $\frac{0,26}{9,63} = 2,66$ D.S. = $0,29/\sqrt{2} = 0,205$; %C.V. = $\frac{0,205}{5,99} = 3,44$

R. INTER-ENSAYO:

%C.V. = $\frac{1,44}{9,63} = 14,95$

%C.V. = $\frac{0,86}{5,99} = 14,35$

En el cálculo de la recuperabilidad de LH, la concentración del suero fué de $\bar{M} = 9$ mIU/ml, la del standard $\bar{M} = 15$ mIU/ml, y la de la mezcla $\bar{M} = 22,65$ mIU/ml (de los valores : 23,2 ; 22,5 ; 21,9 ; 23), por lo tanto la $\%R = 22,65 / 9 + 15 = 107 \%$. Ambas recuperabilidades obtenidas, por encima del 100% son muy aceptables.

La reproducibilidad intra e inter-ensayo se ha calculado según los datos de la Tabla 11; los valores-- X_1 y X_2 representados en una fila son las concentra-- ciones de un mismo suero, obtenidos en el mismo ensayo, y los representados en las distintas columnas son las con-- centraciones de estos sueros obtenidas en ensayos diferentes. La reproducibilidad intra-ensayo (obtenida según las fórmulas, dadas en Material y Métodos, de Rodbard) para FSH es de 2,66 % y para LH 3,44%, que es mucho menor que la inter-ensayo : 14,9% para FSH y 14,5% para LH; es necesario señalar que ambas reproducibilidades corresponden a una concentración media de los sueros en los que se han basado estos cálculos, de 9,63 mIU/ml de FSH y 5,99 - mIU/ml de LH.

Del mismo modo indicado, se han calculado las reproducibilidades para las diluciones 1:2 de los sueros anteriores y se ha obtenido para FSH : 1,5% y 11,2% -

de intra- e inter-ensayo, respectivamente, y para LH : 1,3 % y 10,5 %. Esta disminución de variabilidad, al disminuir la concentración, coincide con la observada en los %C.V -- (coeficientes de variación) para pequeñas dosis de hormona standard representados en las Tablas 8 y 9.

Las interacciones de TSH humana, FSH urinaria (Serono) en la unión de ^{125}I -FSH y Anti-FSH (NIH) se representan en la Figura 27, que expresa la relación $B/B_0 \times 100$ para cada concentración de las diferentes hormonas standards. La curva obtenida con FSH urinaria presenta reacción cruzada con la de FSH pituitaria, de tal modo que la inhibición (o % de precipitado radioactivo) que produce 1,2 mIU/ml de FSH pituitario es la misma que produce 8,5 mIU/ml de FSH -urinario. La TSH presenta interferencia en el ensayo, que no se manifiesta a concentraciones menores de 40 mIU/ml; esta reacción cruzada es de tal modo que para obtener una inhibición del complejo ^{125}I -FSH-Anti-FSH igual que la que produce 1,25 mIU/ml de FSH se necesitan 60 μU /ml de TSH. En la valoración de FSH de un sujeto tiroidectomizado (con valores de TSH muy elevados), se encontraron concentraciones en el rango de los normales, resultado, que asociado a lo anterior pone de manifiesto que la interferencia producida por TSH no es preciso tenerla en cuenta a la hora de evaluar los resultados obtenidos en el R.I.A.

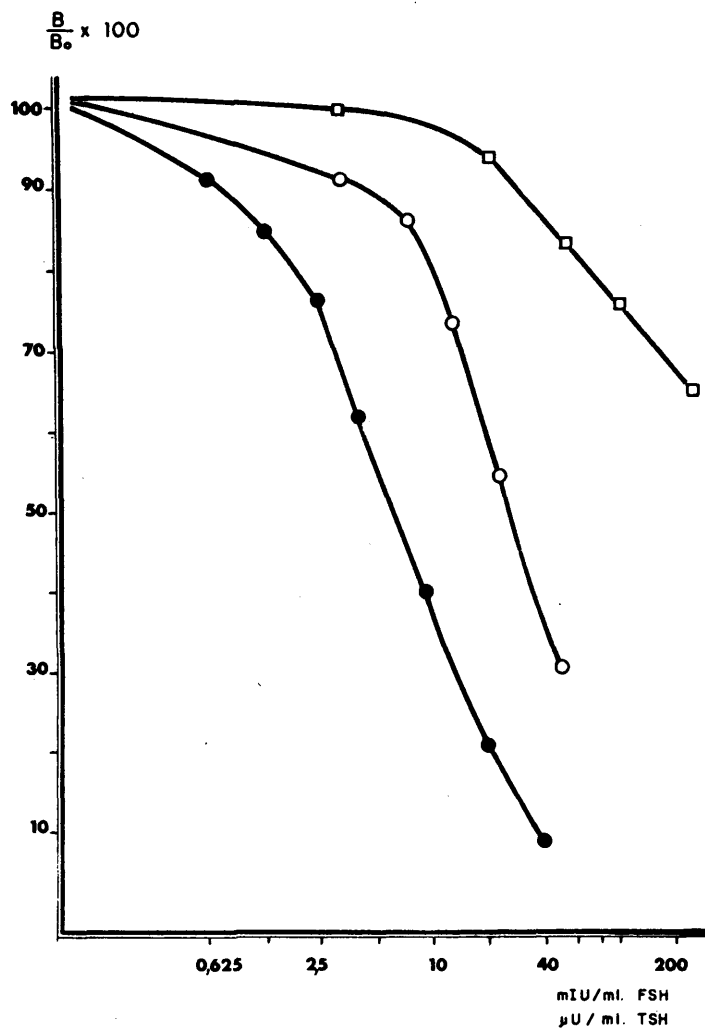


FIG. 27: REACCIONES CRUZADAS DE TSH (□—□ μU/ml), FSH URINARIA (SERONO) (○—○ mIU/ml) EN EL R.I.A. DE FSH PITUITARIA LER-1366 (NIH) (●—● mIU/ml).

La HCG no presenta ninguna interferencia, cosa - que era de esperar, ya que el R.I.A. está basado en la utilización de un Anti-FSH preparado por adsorción con HCG.

Las interferencias de LH urinaria (Serono), de HCG (Sorin, 1mg= 1300 UI biológica, y 6600 UI inmunológica) en la unión de ^{125}I -LH y Anti-LH (NIH), se representan en la - Figura 28; la LH urinaria interfiere en el ensayo, de modo que 20 mIU/ml producen la misma inhibición que 2 mIU/ml de LH pituitario. La HCG reacciona completamente con el Anti-LH de modo que 2 ng/ml desplazan a 1,8 mIU/ml de LH pituitaria; la recta punteada en la figura representa la inhibición obtenida con diferentes diluciones de un suero de una embarazada, que, como puede observarse, es paralela a la -- curva de inhibición de HCG y no a la de LH pituitaria; la - dilución de estos sueros, por lo menos, a 1: 100 para su valoración de LH y el no paralelismo con la curva standard de LH, demuestran claramente la presencia de HCG. En el estu-- dio de la posible interferencia con TSH humana no se ha observado ninguna inhibición con altas concentraciones de ésta.

Las interferencias obtenidas con las hormonas de origen urinario, tanto de FSH como de LH demuestran que el anticuerpo Anti-LH y Anti-FSH obtenidos por inyección de -

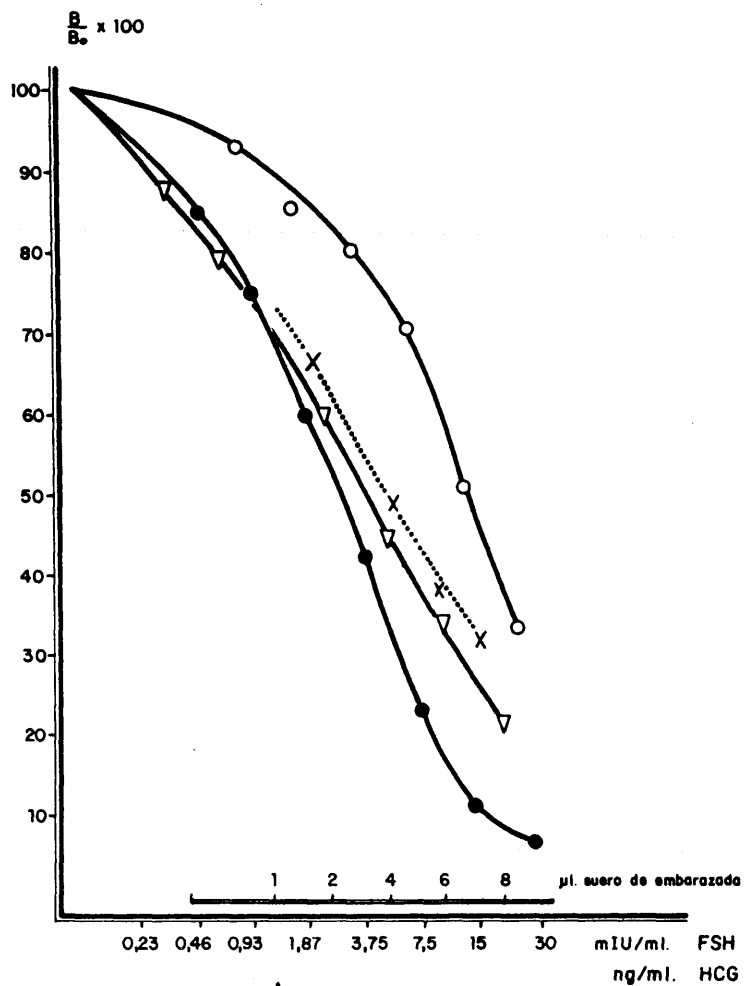


FIG.28: REACCIONES CRUZADAS DE LH URINARIA (SERONO) (O—O mIU/ml) Y HCG (∇—∇ ng/ml), EN EL R.I.A. DE LH PITUITARIA LER-960 (NIH) (●—● mIU/ml). LA RECTA PUNTEADA (X.....X) REPRESENTA LA INHIBICION PRODUCIDA POR DIFERENTES DILUCIONES DE UN SUERO DE EMBARAZADA QUE ES PARALELA A LA CURVA DE HCG.

extractos pituitarios son mucho más específicos para las hormonas presentes en los standards pituitarios que en los de origen urinario.

El paralelismo existente entre las curvas standards y las obtenidas con diferentes diluciones de sueros de mujeres menopaúsicas se ponen de manifiesto en las secciones A de las Figuras 29 y 30, que representan las rectas obtenidas de la transformación logit-log, de FSH y LH, respectivamente. Las secciones B de las Figuras anteriores representan en el eje de abcisas los ul. de suero a valorar y en el eje de ordenadas las concentraciones correspondientes obtenidas en el ensayo; las líneas rectas, que pasan por el origen, demuestran la relación proporcional existente entre ambos. Estos resultados demuestran el comportamiento similar, entre la hormona presente en el suero y la hormona standard, en su reacción inmunológica con el Anticuerpo específico, condición que es necesaria para que un R.I.A. sea válido.

Para conocer hasta qué punto pueden interferir las proteínas presentes en el suero en el R.I.A, se han -- diluido los standards de FSH y LH en suero de buey, de caballo y en suero de sujetos hipofisectomizados. Las curvas

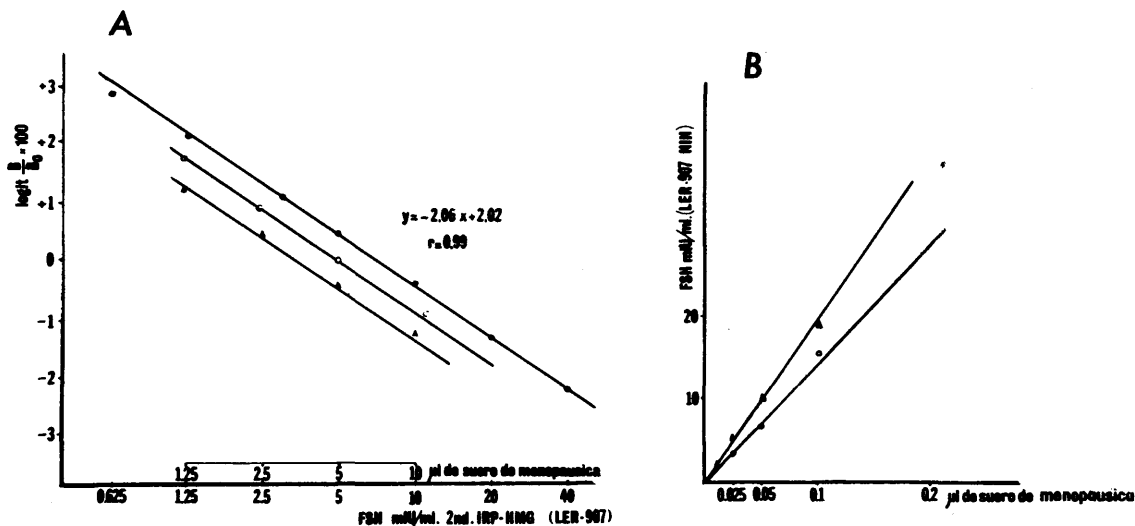


FIG. 29: A) PARALELISMO ENTRE LA CURVA STANDARD DE FSH(NIH) Y LAS DISTINTAS DILUCIONES DE SUEROS DE MUJERES MENOPAUSICAS
 B) RELACION PROPORCIONAL ENTRE EL VOLUMEN DEL SUERO DE MENOPAUSICA USADO EN LA VALORACION Y LOS VALORES DE FSH OBTENIDOS.

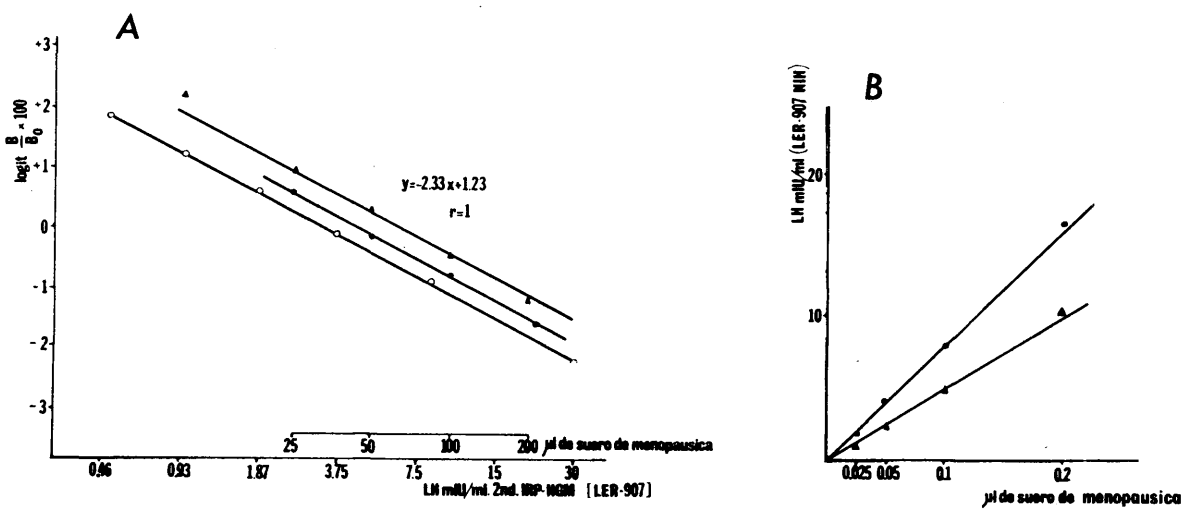


FIG. 30: A) PARALELISMO ENTRE LA CURVA STANDARD DE LH(NIH) Y LAS DISTINTAS DILUCIONES DE SUEROS DE MUJERES MENOPAUSICAS.
 B) RELACION PROPORCIONAL ENTRE EL VOLUMEN DEL SUERO DE MENOPAUSICA USADO EN LA VALORACION Y LOS VALORES DE LH OBTENIDOS.

standards obtenidas en cada dilución del patrón de FSH y la obtenida diluyendo éste en el tampón del ensayo: BSA--PBS al 0,1 % se representan en la Figura 31; como puede observarse, la curva obtenida por dilución con suero de caballo presenta una inhibición menor, que la diluida en el tampón, en la parte más sensible de la curva, que puede interpretarse como una interferencia de FSH de caballo en desplazamiento de FSH humana. La curva obtenida por dilución en suero de buey es prácticamente igual a la obtenida por dilución en el tampón, aunque algunos puntos no se ajustan al trazado de la curva, por lo que no es conveniente elegir este suero como disolvente del standard.

La curva realizada por dilución en suero de un hipofisectomizado es completamente paralela a la diluida en tampón y presenta una inhibición mayor, del 14%, que puede explicarse por el FSH, en muy pequeñas dosis, presente en el suero.

El efecto de estas mismas diluciones del standard en la curvas de LH, se representa en la Fig 32; todas las realizadas en sueros de buey, caballo y suero de hipofisectomizado producen un desplazamiento paralelo al obtenido por dilución del standard en el tampón, pero esta diferencia de desplazamiento, mayor en la del suero del

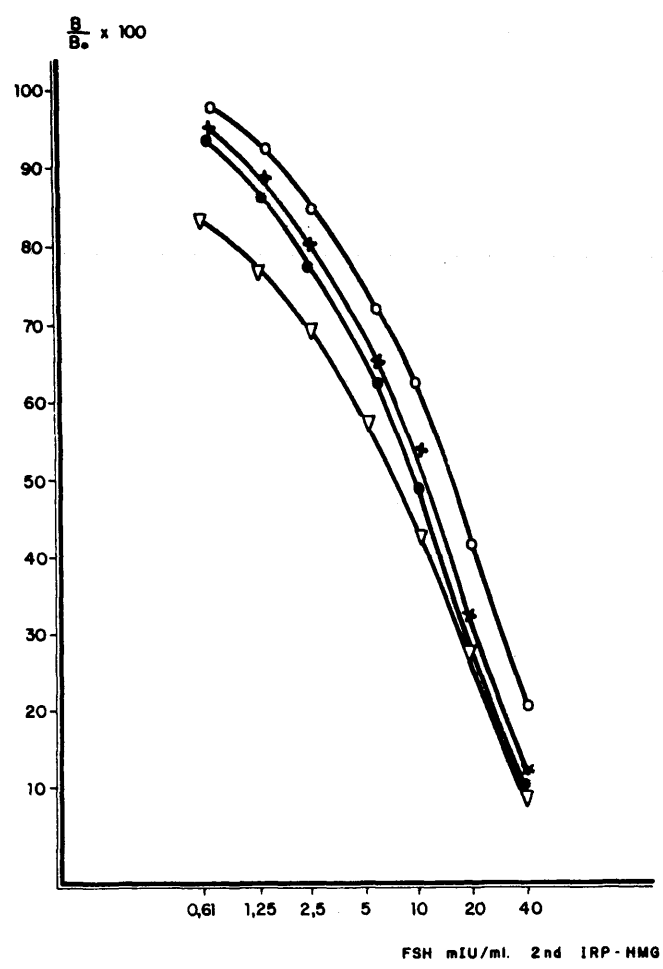


FIG.31:EFECTO DE LAS PROTEINAS SERICAS EN EL DESPLAZAMIENTO DE LA CURVA STANDARD DE FSH.
 O—O: CURVA STANDARD DE FSH DILUIDA EN SUERO DE HIPOGONADAL
 X—X: CURVA STANDARD DE FSH DILUIDA EN SUERO DE BUEY
 ●—●: CURVA STANDARD DE FSH DILUIDA EN TAMPON PBS-BSA 1%
 ▽—▽: CURVA STANDARD DE FSH DILUIDA EN SUERO DE CABALLO

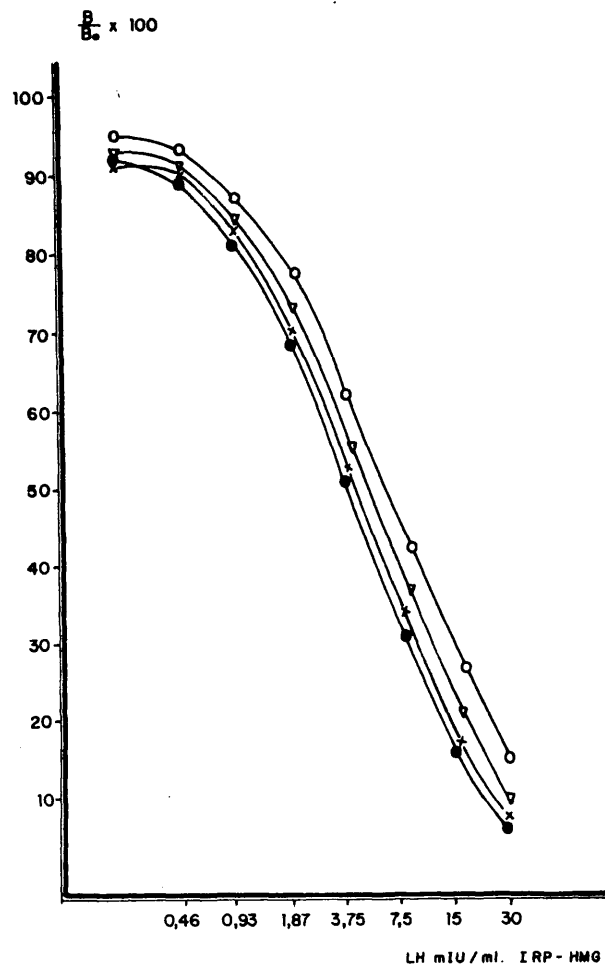


FIG.32:EFECTO DE LAS PROTEINAS SERICAS EN EL DESPLAZAMIENTO DE LA CURVA STANDARD DE LH.

- : CURVA STANDARD DE LH DILUIDA EN SUERO DE HIPOGONADAL
- ×—× : CURVA STANDARD DE LH DILUIDA EN SUERO DE BUEY
- : CURVA STANDARD DE LH DILUIDA EN TAMPON PBS-BSA 1%
- ▽—▽ : CURVA STANDARD DE LH DILUIDA EN SUERO DE CABALLO.

hipofisectomizado no, es significativa.

Estos resultados nos llevan a la conclusión de que , debido a la dificultad de poseer grandes cantidades de sueros libres de FSH y LH, se pueden realizar las diluciones de los standards en el tampón BSA-PBS al 0,1% , con tal de que las concentraciones del segundo anticuerpo -- sean las que proporcionen la máxima precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, que son las condiciones con -- que hemos realizado las curvas anteriores, para una concentración de Anti-FSH 1: 30.000 y de Anti-LH 1: 120.000.

Con el fin de ahorrar tiempo y aumentar la reproducibilidad de los ensayos, se preparan las diferentes diluciones de la hormona standard en un mismo día, se -- guardan congeladas a -20°C , y de este modo el día en que se vaya a realizar un R.I.A. se puede utilizar una de las diferentes alícuotas previamente descongeladas.

Las curvas standard realizadas con estas diluciones almacenadas a -20°C , se presenta en la Figura 33, en relación con una curva standard diluida el mismo día del ensayo. En esta misma Figura se incluye una curva -- standard , en la que la hormona marcada utilizada había estado almacenada durante 40 días a -20°C , después de -- su iodación; el mismo día antes del ensayo se repurificó

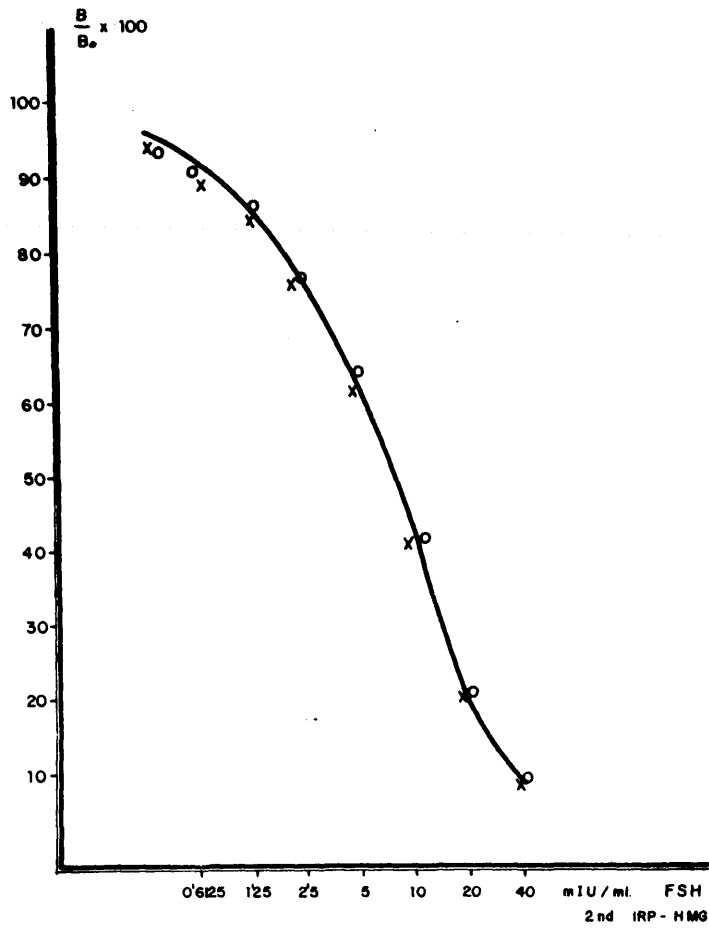


FIG. 33: EFECTO DE LA CONGELACION DE LA HORMONA STANDARD Y DE LA HORMONA MARCADA A -20°C .

—: CURVA STANDARD REALIZADA CON HORMONA STANDARD Y HORMONA MARCADA RECIENTE PREPARADAS.

X: CURVA STANDARD PREPARADA CON HORMONA STANDARD PREVIAMENTE CONGELADA.

O: CURVA STANDARD PREPARADA CON HORMONA MARCADA PREVIAMENTE CONGELADA.

en Sephadex-G100. La observación de la Figura pone de manifiesto el total paralelismo e identidad de las curvas obtenidas con las modificaciones de dilución de standard previo al ensayo y almacenamiento de ésta y de la hormona marcada, lo que nos lleva a un ahorro considerable de material y de tiempo.

II. RADIOINMUNOENSAYO DE FSH Y LH POR EL METODO DE SERONO.

II. 1. CURVAS STANDARD DE FSH Y LH

La media, D.S., E.S.M. y % C.V. (Coeficiente de variación) de 23 curvas de FSH y 20 de LH se representan en las Tablas 12 y 13. La representación gráfica de ambas curvas sigmoideas aparece en las Figuras 34 y 35. Al igual que en el método anterior, el coeficiente de variación en los puntos correspondientes a concentraciones de hormona standard más pequeñas son menores que en los restantes.

Basándonos en la transformación logit-log, se han convertido las curvas anteriores en líneas rectas. La Figura 36 representa la recta correspondiente a la curva de FSH, que se ajusta a la ecuación: $y = 2,712 x + 2,29$, con el coeficiente de regresión de 0,997; las pendientes de las rectas individuales correspondientes a las 23 curvas de FSH varían de -3,0 a -2,4.

Del mismo modo la transformación de la curva de LH en una línea recta, de ecuación: $- 2,51 x + 2,7$ y coeficiente de regresión - 0,998, se puede observar en la Figura 37. Las pendientes de las rectas individuales correspondientes a las 20 curvas de LH varían de - 3,2 a - 2,5. Estos resultados --

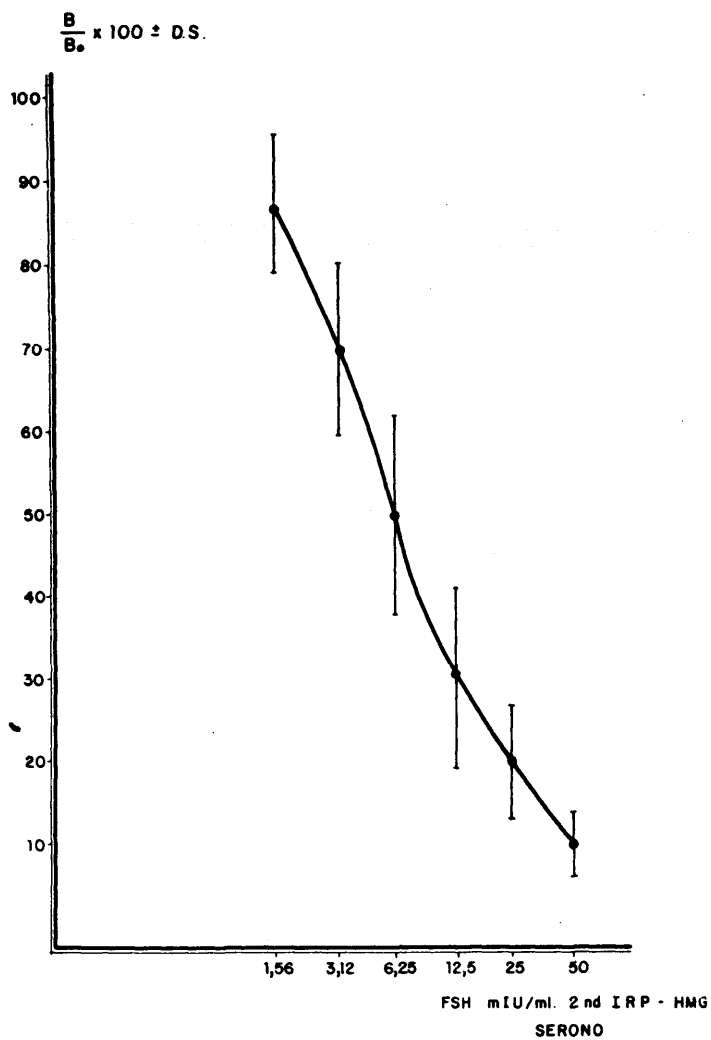


FIG. 34: CURVA STANDARD DE FSH (SERONO) EN ESCALA SEMILOGARITMICA.
CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DE 23 DETERMINACIONES \pm
LA DESVIACION STANDARD (D.S.).

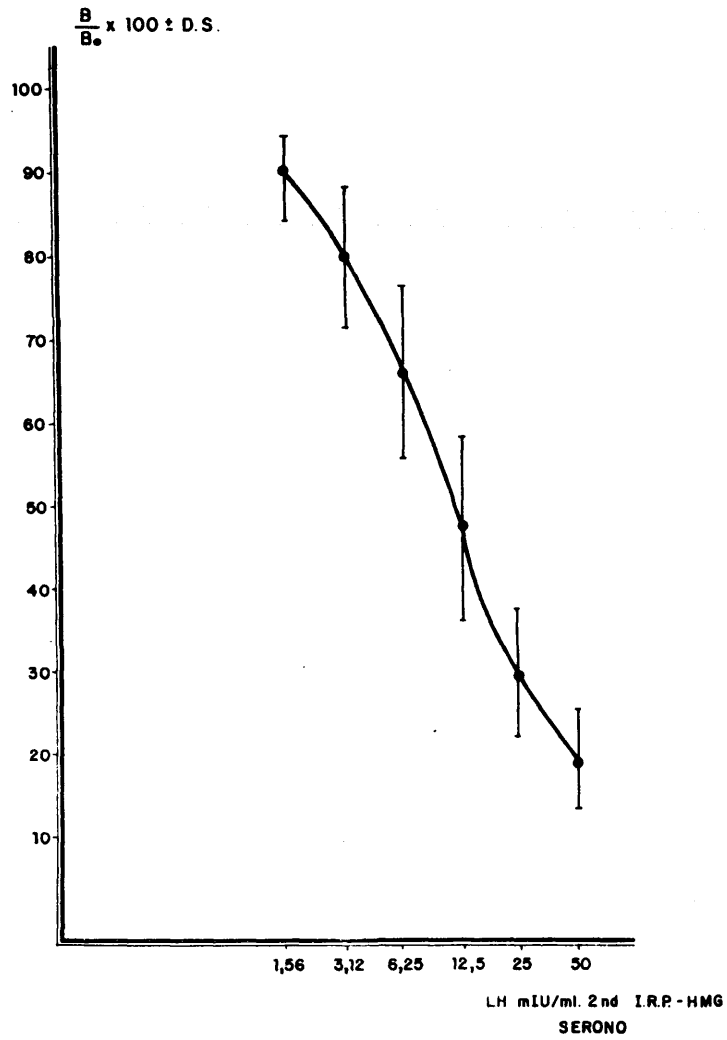


FIG. 35: CURVA STANDARD DE LH (SERONO) EN ESCALA SEMILOGARITMICA.
CADA PUNTO REPRESENTA LA MEDIA DE 20 DETERMINACIONES \pm
LA DESVIACION STANDARD (D.S.).

TABLA 12

VALORES DE RPB ($B/B_0 \times 100$) CORRESPONDIENTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FSH STANDARD OBTENIDOS EN 23 CURVAS STANDARDS (SERONO)

mIU/ml	0*	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
	14,58	11,26	28,26	49,43	62,67	88,74	96,56
	11,63	7,36	31,12	56,44	71,29	77,09	97,45
	14,47	19,39	27,47	39,41	57,18	67,95	83,75
	13,95	5,96	14,16	27,71	50,00	69,43	77,40
	18,43	7,60	22,02	37,46	55,73	74,23	88,99
	35,15	4,07	16,97	30,03	45,81	78,31	86,07
	23,44	7,96	17,65	32,67	55,39	73,88	85,30
	34,52	11,68	24,32	38,77	52,00	84,59	98,05
	47,39	12,88	27,19	42,53	65,68	84,61	99,90
	39,92	15,38	20,25	33,42	58,53	86,12	96,11
	12,40	11,26	25,08	38,14	62,46	83,18	90,09
	22,24	6,50	16,49	24,90	45,72	73,62	99,56
	25,20	5,84	10,12	22,20	35,75	61,19	89,61
	25,51	7,61	12,76	20,54	37,57	59,69	84,23
	16,65	7,60	16,36	24,12	55,15	68,28	88,21
	25,73	8,65	14,61	25,43	42,66	61,50	79,20
	33,40	12,51	15,71	19,49	36,22	70,52	73,97
	25,67	8,48	13,00	21,15	39,23	64,94	91,36
	35,15	7,32	10,92	19,23	33,58	52,96	72,36
	27,82	5,91	10,21	16,99	31,34	52,38	74,82
	29,08	7,89	11,13	19,82	32,79	53,72	81,22
	16,28	8,65	15,78	26,34	44,88	62,38	84,49
	19,53	17,31	29,32	53,28	70,92	74,29	95,04
MEDIA	24,74	9,52	19,36	31,24	49,68	70,60	87,30
D.S.	9,61	3,87	7,32	11,50	12,36	10,87	8,49
E.S.M.	2,00	0,81	1,53	2,40	2,58	2,27	1,77
± C.V.	38,84	40,65	37,81	36,81	24,88	15,40	9,73

* LOS VALORES DE ESTA COLUMNA REPRESENTAN B/T CORRESPONDIENTES A LOS TUBOS CERO (SIN HORMONA STANDARD)

TABLA 13

VALORES DE RPB ($B/B_0 \times 100$) CORRESPONDIENTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LH STANDARD OBTENIDOS EN 20 CURVAS STANDARDS (SERONO)

mIU/ml	0*	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
12,32		19,98	29,15	31,71	41,62	55,49	80,43
16,63		14,08	30,23	55,18	72,15	87,89	97,00
14,39		23,12	33,55	49,13	73,16	89,23	95,11
22,37		15,65	24,94	44,60	59,08	79,41	89,12
20,36		13,51	23,60	44,24	64,70	78,78	90,49
22,10		30,59	43,72	61,09	81,18	90,72	93,74
18,65		13,16	28,04	41,86	69,57	80,92	97,86
19,76		23,88	42,97	75,51	81,75	90,72	96,81
18,59		17,97	29,93	49,10	68,55	80,06	87,31
16,52		20,38	33,85	52,02	77,47	91,05	97,57
18,02		18,48	30,78	52,29	71,44	86,88	94,96
26,71		14,45	25,72	48,90	69,74	84,77	94,67
20,24		16,15	22,75	38,16	61,69	82,80	91,72
24,98		36,30	48,05	62,67	78,33	83,63	90,14
33,49		11,25	18,43	31,53	49,46	69,59	88,01
38,34		14,30	22,88	37,75	58,12	76,53	86,28
43,62		14,20	25,39	48,06	66,83	79,61	89,84
20,43		13,50	33,18	55,23	67,23	76,77	82,54
39,77		14,06	23,95	32,70	55,13	76,09	92,35
45,53		11,99	20,01	32,70	58,95	71,31	81,82
MEDIA	24,64	18,76	29,46	47,22	66,28	80,61	90,88
D.S.	9,97	6,40	8,02	11,57	10,49	8,61	5,29
E.S.M.	2,23	1,43	1,79	2,59	2,34	1,93	1,18
% C.V.	40,46	34,12	27,22	24,50	15,83	10,68	5,82

* LOS VALORES DE ESTA COLUMNA REPRESENTAN B/T CORRESPONDIENTES A LOS TUBOS CERO (SIN HORMONA STANDARD)

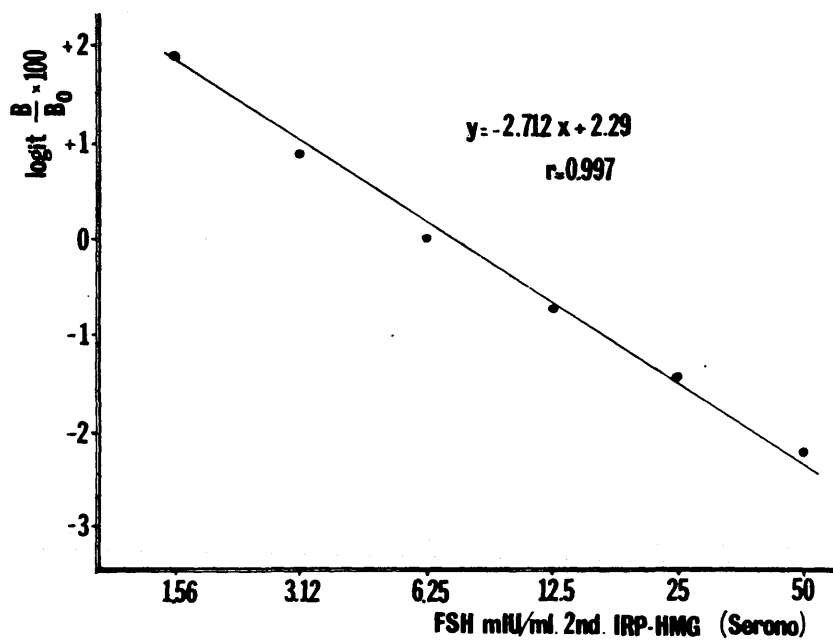


FIG. 36: REPRESENTACION EN ESCALA LOGIT-LOG DE LA CURVA DE FSH (SERONO) DE LA FIG. 34

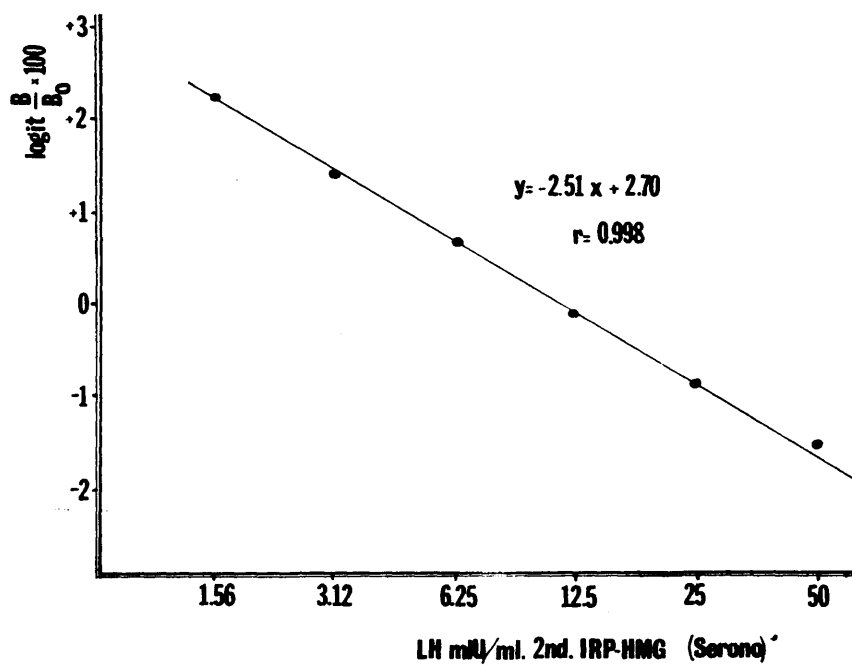


FIG. 37: REPRESENTACION EN ESCALA LOGIT-LOG DE LA CURVA DE LH (SERONO) DE LA FIG. 35.

demuestran la linealidad de las curvas según la transformación elegida, lo que nos permite calcular, al igual que en el método de NIH, automáticamente los resultados.

La sensibilidad de este método se ha calculado según los datos señalados en la Tabla 14. La mínima dosis, tanto de LH como de FSH correspondiente a una relación B/T (radioactividad del precipitado/radioactividad total) significativamente distinta de la relación B/T que se han obtenido en los tubos sin hormona standard (tubos cero), es de 1,25 -- mIU/ml, y es el valor que se toma como sensibilidad de estos radioinmunoensayos.

El calculo de la reproducibilidad, representado en la Tabla 15, se ha calculado de igual modo que en el método anterior.

La reproducibilidad intra-ensayo (3,03% para FSH, y 4,20% para LH) es siempre mucho menor que la inter-ensayo (17,48% para FSH y 16,85% para LH), a su vez ambas son ligeramente superiores a las del método de NIH.

En el cálculo de la recuperabilidad de FSH, la concentración de hormona standard usada fué de $\bar{M} = 12,5$ mIU/ml,

TABLA 14

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN EL R.I.A. DE FSH Y LH(SERONO)

	FSH mIU/ml		LH mIU/ml	
	0	1,5	0	1,5
	25,10	20,26	33,00	29,19
	28,65	22,81	34,72	31,71
	27,82	20,52	36,22	30,96
%B/T	27,67	22,69	35,40	28,20
	29,32	22,95	35,20	29,40
	26,40	23,16	37,40	27,25
	34,20	21,40	34,20	29,80
MEDIA	27,42	21,97	35,16	29,50
D.S.	1,41	1,22	1,41	1,53
E.S.M.	0,53	0,46	0,53	0,58
"t" n=12		7,73**		7,20**

** SIGNIFICATIVAMENTE DISTINTO DE CERO P < 0,001

TABLA 15

REPRODUCIBILIDAD EN EL R.I.A. DE FSH Y LH (SERONO) SEGUN EL METODO DE ROBBARD(146)

ENSAYO n°	FSH mIU/ml(SERONO)				ENSAYO n°	LH mIU/ml(SERONO)			
	x ₁	x ₂	\bar{x}	D.S.		x ₁	x ₂	\bar{x}	D.S.
1	14,0	14,5	14,25	0,35	1	14,8	16,0	15,40	0,85
2	15,5	16,5	16,0	0,71	2	18,0	16,0	17,0	1,41
3	18,0	18,8	18,4	0,57	3	17,5	16,0	16,75	1,06
4	16,0	17,0	16,5	0,71	4	22,0	21,0	21,5	0,71
5	12,5	11,0	11,75	1,06	5	23,5	21,5	22,5	1,41
6	20,0	19,0	19,5	0,71	6	16,5	15,0	15,75	1,06
MEDIA	16,0	16,13	16,07	0,69	MEDIA	18,72	17,58	18,15	1,08
D.S.	2,7	3,01	2,81		D.S.	3,34	2,87	3,06	0,29
E.S.M.	1,1	1,23	1,15		E.S.M.		1,17	1,25	

R. INTRA-ENSAYO :

D.S. = 0,69/ 2 = 0,487. %C.V. = $\frac{0,487}{16,07} = 3,03$ D.S. = 1,08/ 2 = 0,763 ; %C.V. = $\frac{0,763}{18,15} = 4,20$

R. INTER-ENSAYO :

%C.V. = $\frac{2,81}{16,07} = 17,48$

%C.V. = $\frac{3,06}{18,15} = 16,85$

la del suero $\bar{M} = 20$ mIU/ml y la de 1 s mezclas de los anteriores $\bar{M} = 31,5$ mIU/ml (de los valores: 32,5; 30,8; 29,5; 33), por lo tanto la recuperabilidad, o % R es:

$$\frac{\text{concentración de la mezcla}}{\text{concentración del suero + la del standard}} = \frac{31,5}{31,5 + 20} = 96,9\%$$

En el cálculo de la recuperabilidad de LH, la concentración de la hormona standard fué de 12,5 mIU/ml, la del suero 6 mIU/ml, y la de la mezcla $\bar{M} = 18,75$ mIU/ml (de los valores: 19,5; 20; 18; 17,5) por lo tanto, la % R = $\frac{18,75}{12,5+6}$.

Las secciones A de las Figuras 38 y 39 muestran, en escala logit-log, el paralelismo existente entre las curvas standards de FSH y LH y las obtenidas con diferentes diluciones de sueros. Las Secciones B de las Figuras anteriores demuestran la relación proporcional que existe entre los ul de suero a valorar y sus concentraciones correspondientes obtenidas en el ensayo. Estos resultados demuestran que la hormona presente en el suero y la hormona standard tienen una reacción inmunológica similar, condición que es necesaria para la validez del R.I.A.

II. 2. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DEL R.I.A.

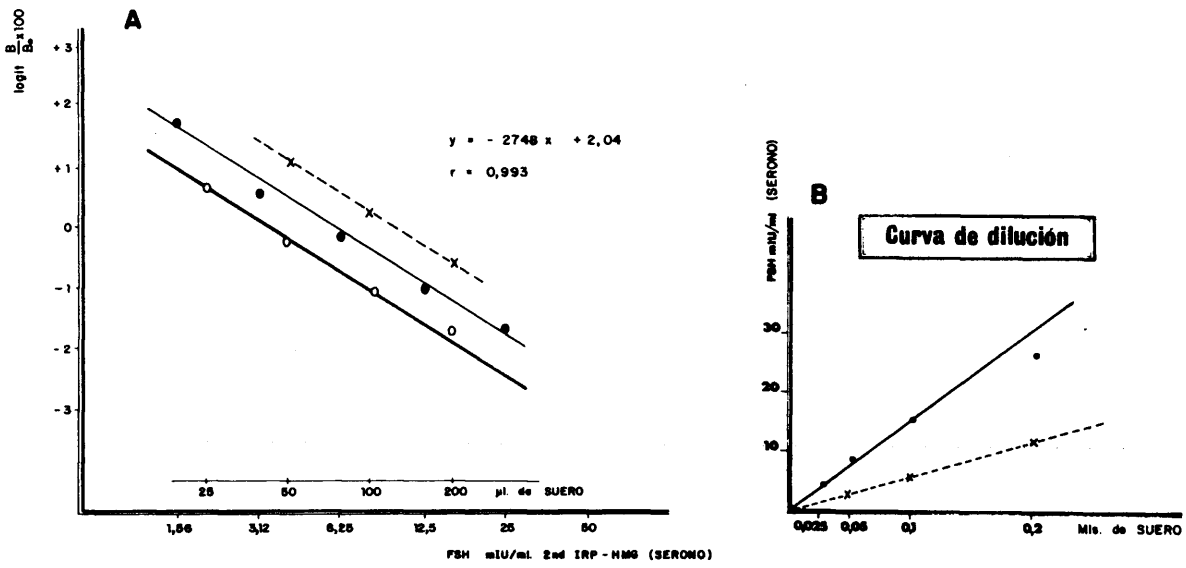


FIG. 38: A) PARALELISMO ENTRE LA CURVA STANDARD DE FSH(SERONO) Y LAS DISTINTAS DILUCIONES DE UN SUERO. B) RELACION PROPORCIONAL ENTRE EL VOLUMEN DEL SUERO USADO EN LA VALORACION Y LOS VALORES DE FSH OBTENIDOS.

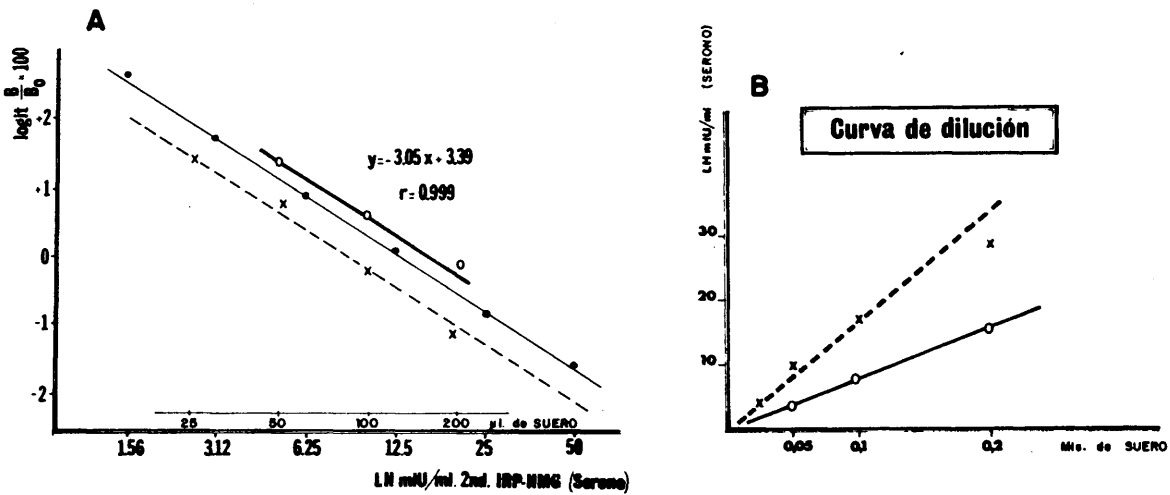


FIG. 39: A) PARALELISMO ENTRE LA CURVA STANDARD DE LH(SERONO) Y LAS DISTINTAS DILUCIONES DE UN SUERO B) RELACION PROPORCIONAL ENTRE EL VOLUMEN DEL SUERO USADO EN LA VALORACION Y LOS VALORES DE LH OBTENIDOS.

Se ha estudiado la cinética de la reacción antígeno-anticuerpo en los diferentes estadios en que se desarrolla el R.I.A. de FSH y LH.

La Figura 40 y 41 (A) demuestra que la unión antígeno-anticuerpo disminuye a medida que aumenta el tiempo transcurrido entre la adición del primer anticuerpo y la hormona marcada; la Figura 40 y 41 (B) demuestra que ésta unión aumenta con el tiempo que transcurre entre la adición de la hormona marcada y el segundo anticuerpo. Por otra parte esta unión se favorece a medida que aumenta el tiempo que pasa entre la adición del segundo anticuerpo y la centrifugación de los tubos (Fig. 40 y 41 (C)).

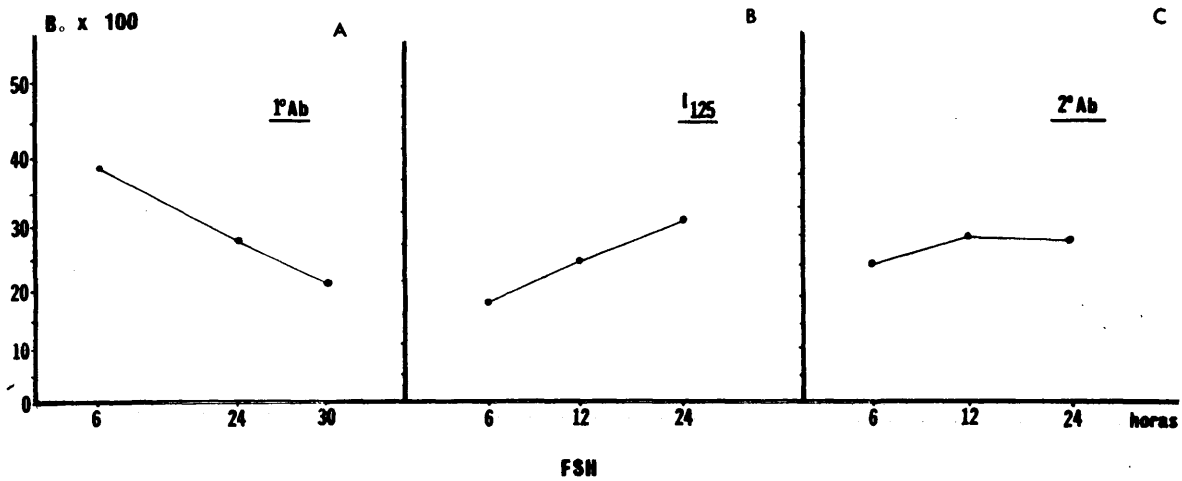


FIG. 40: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA FORMACION Y PRECIPITACION DEL COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO EN EL R.I.A. DE FSH (SERONO)

- A) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DEL 1^o ANTICUERPO Y LA HORMONA MARCADA
 B) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DE LA HORMONA MARCADA Y EL 2^o ANTICUERPO.
 C) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DEL 2^o ANTICUERPO Y LA CENTRIFUGACION.

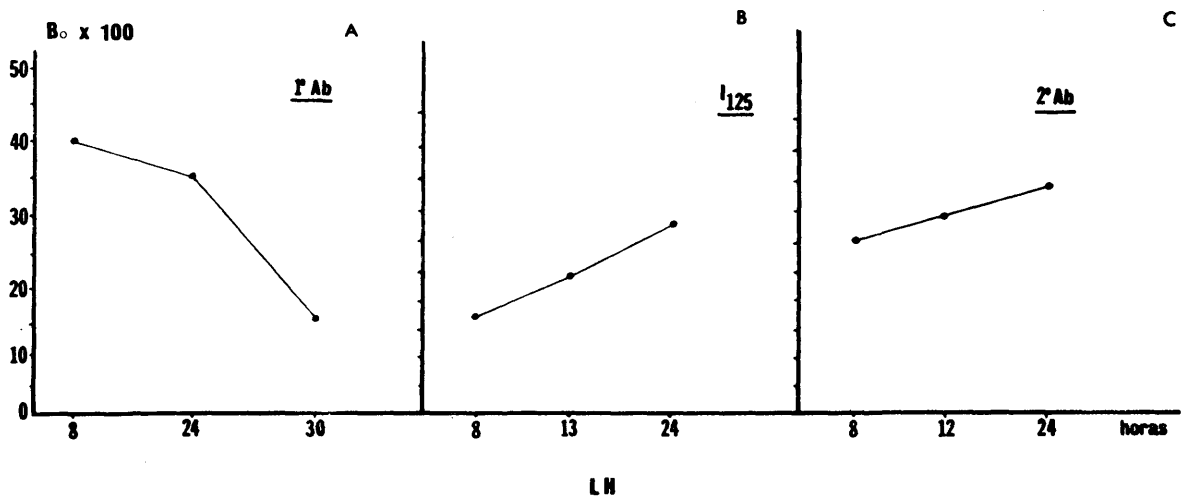


FIG. 41: EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA FORMACION Y PRECIPITACION DEL COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO EN EL R.I.E. DE LH (SERONO)

- A) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DEL 1^o ANTICUERPO Y LA HORMONA MARCADA
 B) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DE LA HORMONA MARCADA Y EL 2^o ANTICUERPO
 C) VARIACION DEL TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA ADICION DEL 2^o ANTICUERPO Y LA CENTRIFUGACION.

III. APLICACION EN LA CLINICA HUMANA

DEL R.I.A. DE FSH Y LH

III. 1. CONCENTRACION DE FSH Y LH EN HOMBRES

A) POR EL METODO DE NIH

Se han determinado los valores de ambas hormonas en:

- 1) Hombres normales de edad comprendida entre 18 y 35 años.
- 2) Pacientes con Hipogonadismos primario y secundario.
- 3) Estériles (con Azoospermia y Oligospermia).

Los valores individuales, media, D. S. y E. S. M. de FSH y LH determinados en un grupo de hombres normales, se pueden observar en las Figuras 42 y 43 y en la Tabla 16.

En estas mismas Figuras se representan gráficamente los valores de LH y FSH en hombres que padecen diferentes tipos de Hipogonadismos y Esterilidad; los pacientes afectados de Hipogonadismos hipotálamo-pituitarios tienen cifras muy bajas de LH y FSH, a menudo indetectables, mientras que los

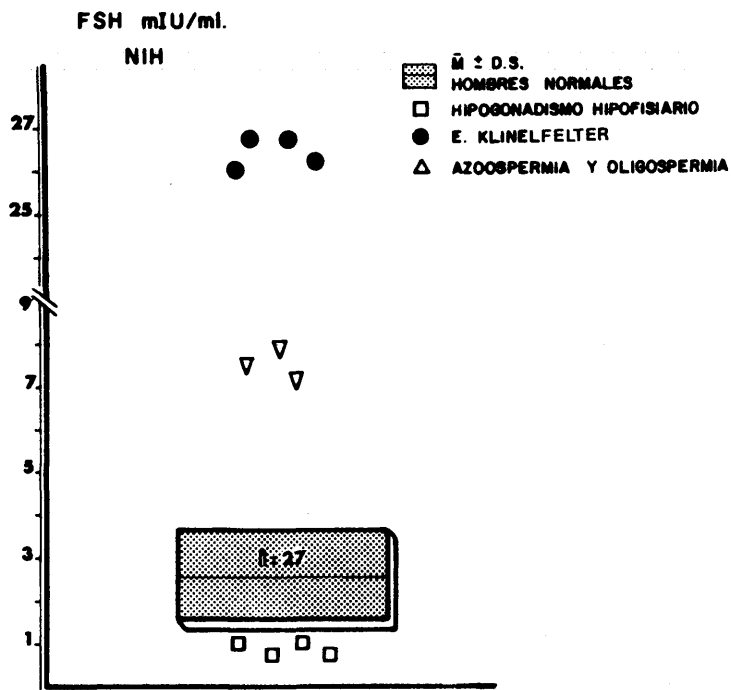


FIG. 42: CONCENTRACIONES (mIU/ml-NIH) DE FSH EN HOMBRES NORMALES Y EN PACIENTES HIPOGONADALES.

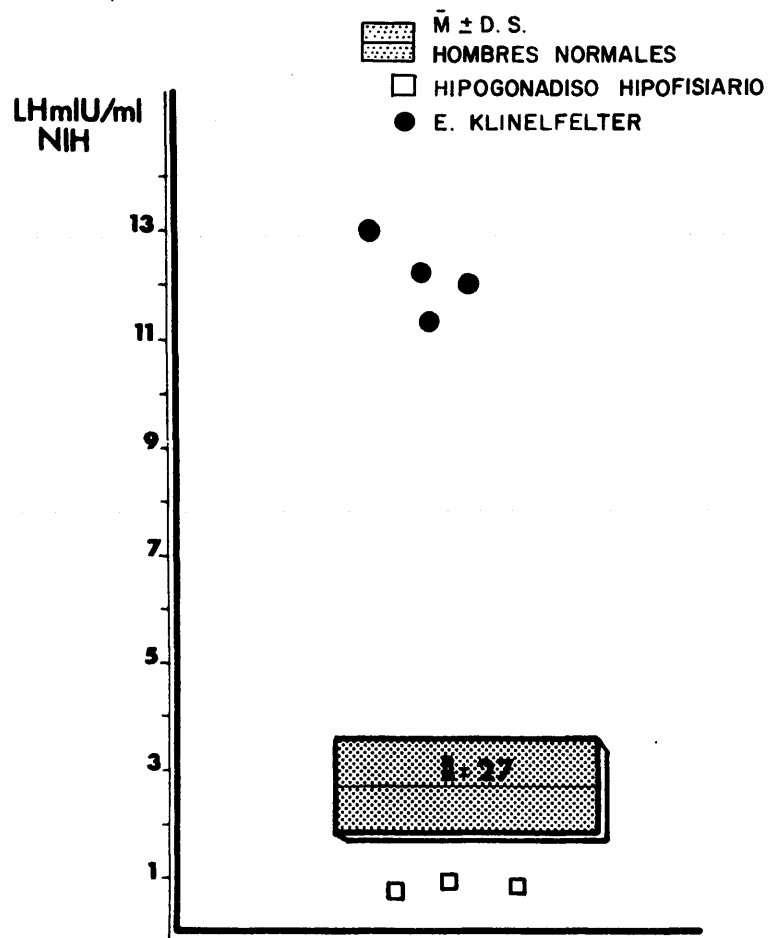


FIG. 43: CONCENTRACIONES (mIU/ml-NIH) DE LH EN HOMBRES NORMALES Y EN PACIENTES HIPOGONADALES.

sujetos con Hipogonadismos primario (Síndrome de Klinefelter, Reifenstein, etc.) tienen cifras muy elevadas de ambas gonadotropinas, especialmente de FSH.

En los pacientes con problemas de Esterilidad (Azoospermia y Oligospermia), los valores de FSH son ligeramente superiores a los normales. Sin embargo los de LH están dentro de los intervalos de normalidad. Estos datos favorecen sin duda la existencia de un mecanismo de control gonadal de la secreción de FSH.

B) POR EL METODO DE SERONO

De la misma manera que en el método anteriormente descrito, se han realizado determinaciones de LH y FSH en un grupo de hombres normales, cuyos valores individuales, medias, D.S y E.S.M. se representan en la TABLA 16-A y en las Figuras 44 y 45. En estas mismas figuras se puede observar que los valores de FSH y LH correspondientes a los Hipogonadismos-hipofisarios son más bajos que los normales, sin embargo los obtenidos en los pacientes que padecen de Hipogonadismos primarios son muy elevados, tanto de FSH como de LH.

En ambos métodos es interesante hacer notar que

TABLA 16-A

VALORES DE FSH Y LH EN HOMBRES NORMALES (NIH)

FSH mIU/ml (NIH)				LH mIU/ml (NIH)			
2,3	2,9	2,1	1,2	1,4	2,5	3,0	3,0
4,5	1,6	1,5	3,8	1,3	3,5	2,1	2,1
2,5	2,9	2,5	2,1	3,2	3,4	2,9	2,0
5,1	2,4	3,8		2,3	1,1	4,3	
3,2	1,3	2,0		3,0	2,0	3,3	
4,6	2,9	2,5		1,0	2,4	4,2	
3,0	1,8	2,2		4,3	2,6	3,0	
3,8	1,2	2,4		2,4	3,6	3,0	
MEDIA : 2,67				MEDIA : 2,7			
D.S. : 1,05				D.S. : 0,9			
E.S.M. : 0,20				E.S.M. : 0,18			
n° : 27				n° : 27			

TABLA 13-b

VALORES DE FSH Y LH EN HOMBRES NORMALES (SERONO)

FSH mIU/ml (SERONO)			LH mIU/ml (SERONO)		
7,5	8,0	16	7,0	15	9,5
6,5	7,0	11,8	5,5	18	
5,5	6,8	8,0	9,5	4,4	
14,5	19,0	13,0	5,7	4,5	
8,7	7,5		6,0	6,1	
MEDIA : 9,99			MEDIA : 8,29		
D.S. : 4,15			D.S. : 4,45		
E.S.M. : 1,11			E.S.M. : 1,34		
n° : 14			n° : 11		

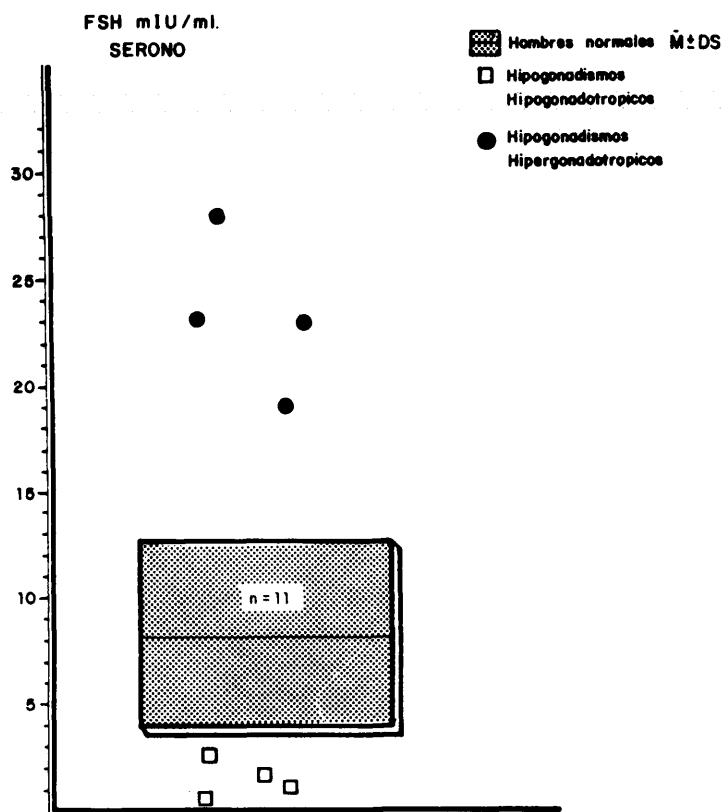


FIG. 44: CONCENTRACIONES (mIU/ml-SERONO) DE FSH EN HOMBRES NORMALES Y EN PACIENTES HIPOGONADALES.

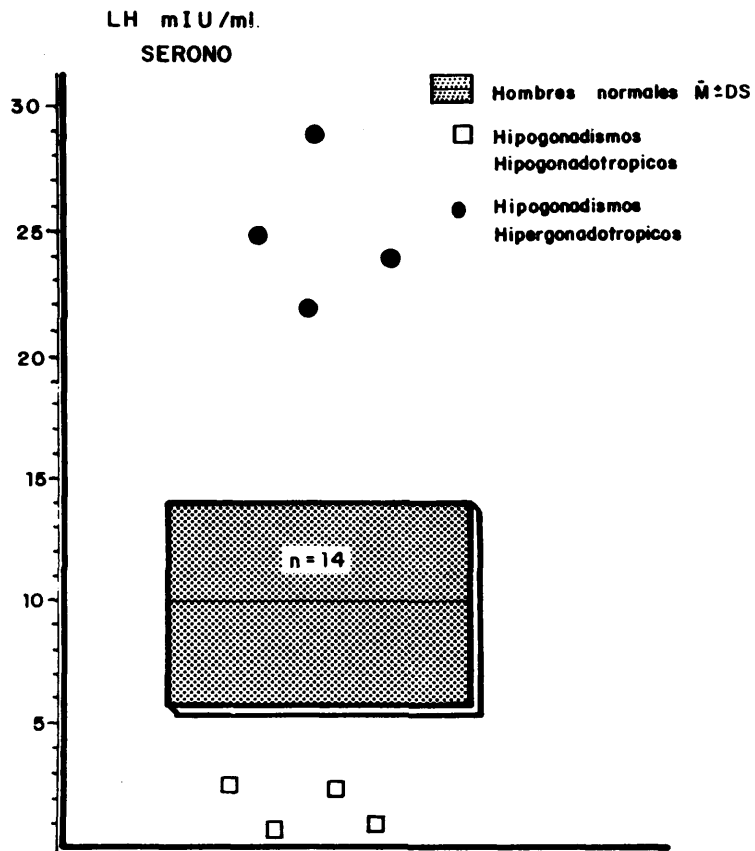


FIG. 45: CONCENTRACIONES (mIU/ml-SERONO) DE LH EN HOMBRES NORMALES Y EN PACIENTES HIPOGONADALES.

la relación de LH/ FSH , en hombres normales y en Hipogonadismos- Hipofisarios, es muy próxima a la unidad, situación que se altera en los Hipogonadismos de origen gonadal.

III.2. CONCENTRACION DE FSH Y LH EN MUJERES

A) POR EL METODO DE NLH

Se han determinado los valores de ambas hormonas en :

- 1) Ciclos menstruales normales
- 2) Fase folicular y Fase luteínica en Mujeres normales
- 3) Amenorreas de diferentes causas.

Las cifras normales de LH y FSH, en los diferentes días de un ciclo normal menstrual ,está representado en la Figura 46. Cada punto de la Figura expresa la Media y E.S.M. de las determinaciones de LH y FSH en un grupo de mujeres; se ha tomado como referencia el día de máxima concentración de LH y FSH, día 0.

En la primera parte de la Fase folicular (días primeros del ciclo) se nota una concentración alta de FSH, que va descendiendo hasta los días próximos al día 0, en el que los niveles máximos de FSH (7 mIU/ml) y LH (30 mIU/ml) coinciden (día de la ovulación). A partir de esta fecha, los valores descienden a unos niveles que, con pe--

queñas fluctuaciones, se mantienen durante los días posteriores (fase luteínica), para comenzar de nuevo a subir en el inicio del próximo ciclo.

Los valores de LH en los días anteriores a la ovulación presentan variaciones, al igual que FSH, lo que demuestra su secreción pulsátil; después del máximo pico, en el día 0, sus valores van descendiendo en paralelo con los de FSH.

Los valores individuales, de 34 determinaciones, en la fase folicular y luteínica, así como las \bar{M} , D.S. y E.S.M. , aparecen en la Tabla 17-A. La representación gráfica de estas medias (\pm D.S.) de FSH y LH, en mujeres normales, y los valores individuales en mujeres con diferentes tipos de Amenorreas están representadas en las Figuras 47 y 48, respectivamente. Los valores de FSH y LH durante la fase folicular son ligeramente superiores a los de la fase luteínica, pero no hay diferencia significativa. Las mujeres con Amenorrea de origen hipotálamo-hipofisario tienen concentraciones muy bajas de FSH y LH, sin embargo las mujeres con Amenorreas gonadales (menopausi--cas) presentan cifras muy altas de FSH (38, 36 mIU/ml) y de LH (12, 11 mIU/ml), siendo éstas menos elevadas que las de FSH, y la relación de LH/FSH es menor que la unidad.

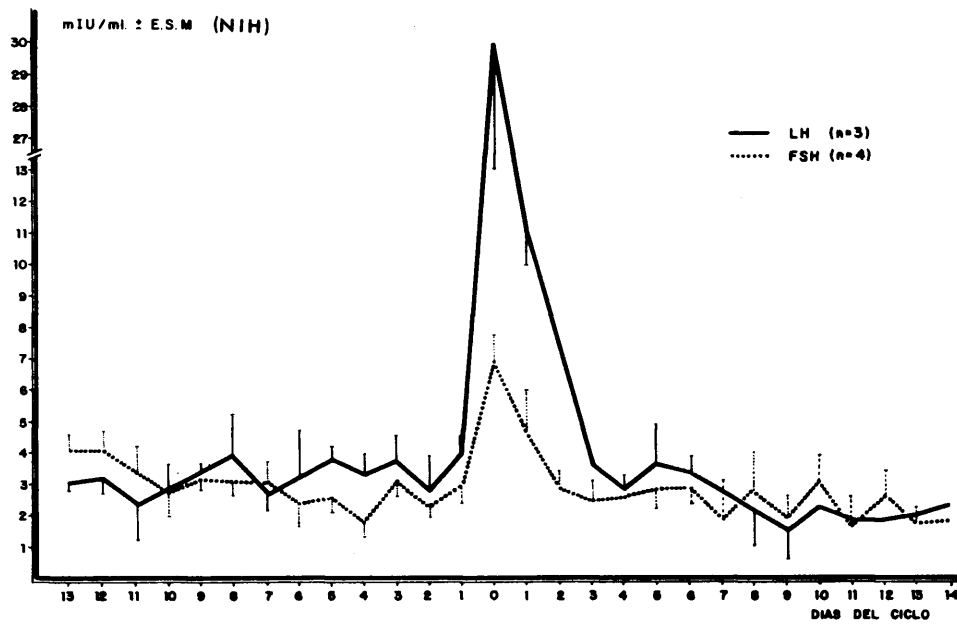


FIG. 46 : CONCENTRACIONES (mIU/ml \pm E.S.M.-NIH) DE LH EN 3 MUJERES Y DE FSH EN 4 MUJERES EN DIFERENTES DIAS DE CICLOS MENSTRUALES NORMALES. EL DIA CERO CORRESPONDIENTE AL PICO MAXIMO DE FSH Y LH SE TOMA COMO REFERENCIA.

TABLA 17-A

VALORES DE FSH Y LH EN MUJERES NORMALES (NIH)

FASE FOLICULAR						FASE LUTEINICA							
LH(mIU/ml)			FSH (mIU/ml)			LH(mIU/ml)			FSH (mIU/ml)				
2,9	3,6	4,0	3,1	3,7	2,4	3,5	3,1	3,9	3,4	2,3	2,6	1,5	
1,5	2,8	3,2	0,4	4,5	4,0	5,8	5,5	3,9	1,8	4,7	4,4	3,2	
4,1	2,4	1,3	2,6	1,6	2,4	4,1	1,6	2,1	4,6	2,9	4,5	2,2	
1,8	3,4	3,2	2,5	2,6	1,5	2,3	2,5	2,1	2,3	1,8	1,5	2,3	
2,5	3,1	6,4	2,0	1,2	1,7	2,4	0,7	5,0	1,9	0,7	0,6	2,6	
2,4	3,1	3,2	1,4	2,6	3,5	6,5	3,0	3,0	0,6	1,2	1,8		
1,8	4,6	1,7	3,2	2,1	1,7	1,5	1,7	2,4	0,6	0,6	1,3		
3,3	5,0	2,0	3,0	3,1	2,9	2,0	2,5	2,0	1,3	3,0	2,9		
2,5	4,9	3,1	2,7	4,0	3,0	3,0	1,3	1,6	2,5	3,6	2,7		
5,9	3,2	2,9	5,0	4,5	4,8	1,9	1,3	1,0	3,5	2,0	9,0		
5,0	4,0	1,5	4,2	3,8	3,2	1,5	0,8	1,0	4,6	3,6	3,4		
3,2			4,3	3,4	4,2	1,4			3,1	3,4	3,1		
			2,8	2,3	2,4				3,4	2,6	2,6		
MEDIA : 3,23			MEDIA : 2,98			MEDIA : 2,59			MEDIA : 2,56				
D.S. : 0,51			D.S. : 0,61			D.S. : 0,80			D.S. : 0,77				
E.S.M. : 0,14			E.S.M. : 0,17			E.S.M. : 0,22			E.S.M. : 0,21				
n° : 34			n° : 39			n° : 34			n° : 44				

TABLA 17-B.

VALORES DE FSH Y LH EN MUJERES NORMALES (SERONO)

FASE FOLICULAR						FASE LUTEINICA							
LH(mIU/ml)			FSH(mIU/ml)			LH(mIU/ml)			FSH(mIU/ml)				
9,0	10,0		5,1	3,0	6,2	18,8	16,3	15,5	4,9	5,4	3,5	3,2	
8,7	8,7		7,7	6,4	6,4	13,5	13,2	9,9	3,8	3,8	2,0	2,8	
12,5	17,3		4,9	6,5	3,8	15,4	12,7	12,7	5,0	5,3	3,4	3,0	
9,7	8,0		3,7	2,2	2,9	12,8	10,0	11,1	3,7	3,4	2,0	2,8	
12,0	9,5		5,2	3,1	6,1	13,5	9,9	5,5	2,5	2,8	1,7	2,7	
14,5	11,5		7,5	6,3	0,3	18,3	15,4	15,0	5,0	4,1	4,0	2,8	
8,1	13,5		4,8	5,4	3,8	12,5	13,0		2,5	1,9	2,6	4,2	
8,0	9,0		3,4	2,0	2,7	14,3	12,0		5,0	4,2	4,0	1,6	
7,8	9,0		5,3	3,2	6,0	12,6	12,9		4,9	5,0	3,6	5,1	
9,0	15,6		7,4	6,5	6,5	10,2	11,0		3,0	3,8	3,7		
13,0	14,0		5,0	6,3	3,6	14,0	10,5		1,9	2,7	2,4		
10,0	11,0		3,5	2,4	3,0	5,6	9,5		2,7	2,5	4,3		
MEDIA : 10,8			MEDIA : 4,86			MEDIA : 12,52			MEDIA : 3,40				
D.S. : 2,67			D.S. : 1,69			D.S. : 3,05			D.S. : 1,0				
E.S.M. : 0,55			E.S.M. : 0,28			E.S.M. : 0,57			E.S.M. : 0,14				
n° : 24			n° : 36			n° : 30			n° : 45				

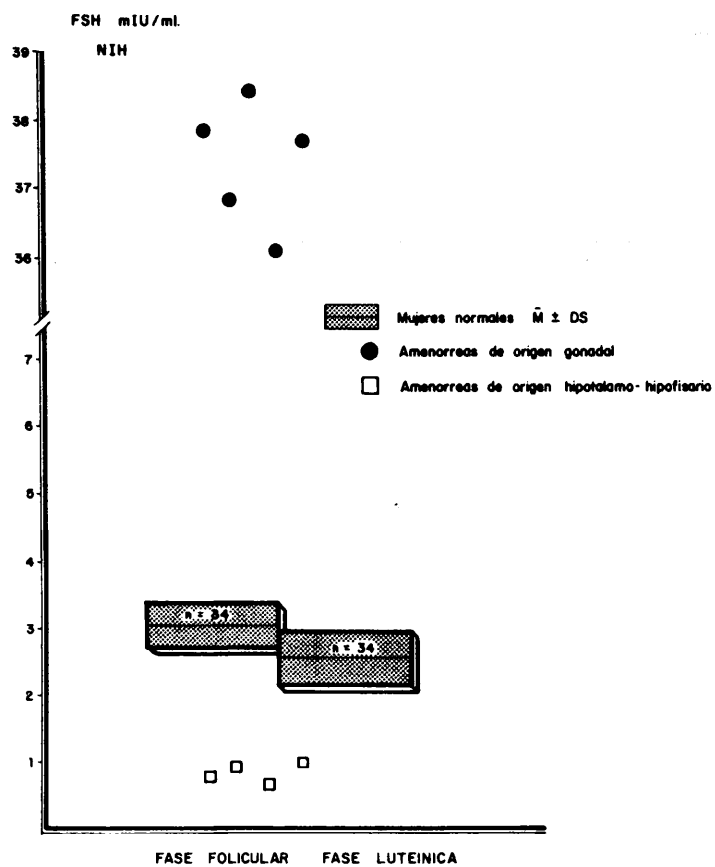


FIG. 47: CONCENTRACIONES (mIU/ml-NIH) DE FSH EN MUJERES AMENORREICAS Y EN LAS FASES FOLICULAR Y LUTEINICA CORRESPONDIENTES A CICLOS MENSTRUALES NORMALES.

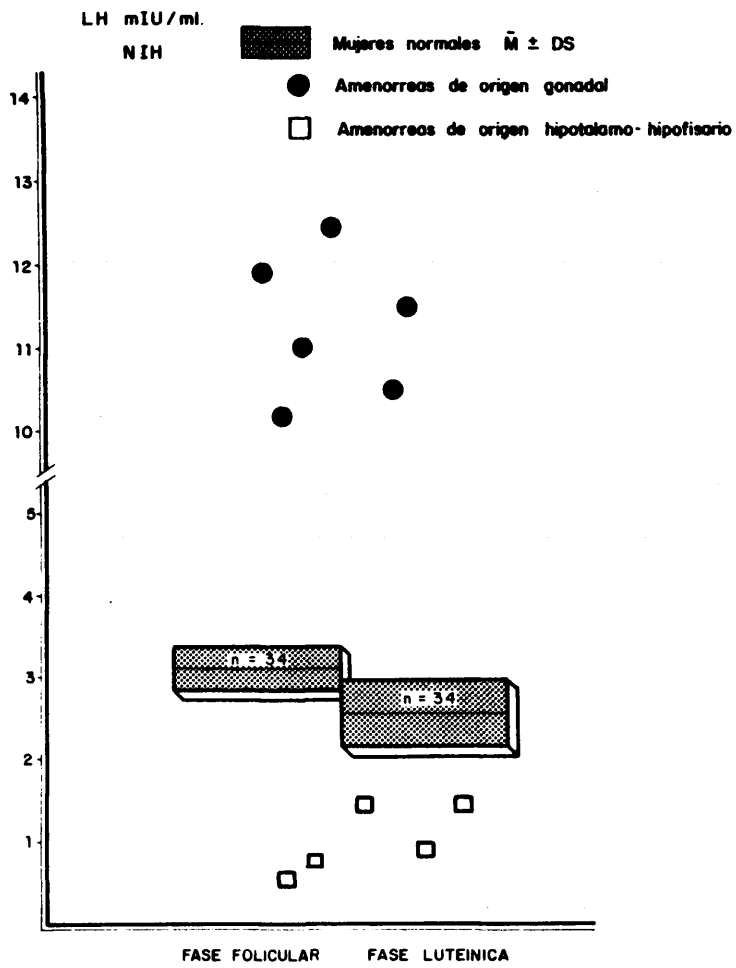


FIG. 47: CONCENTRACIONES (mIU/ml-NIH) DE LH EN MUJERES AMENORREICAS Y EN LAS FASES FOLICULAR Y LUTEINICA CORRESPONDIENTES A CICLOS MENSTRUALES NORMALES.

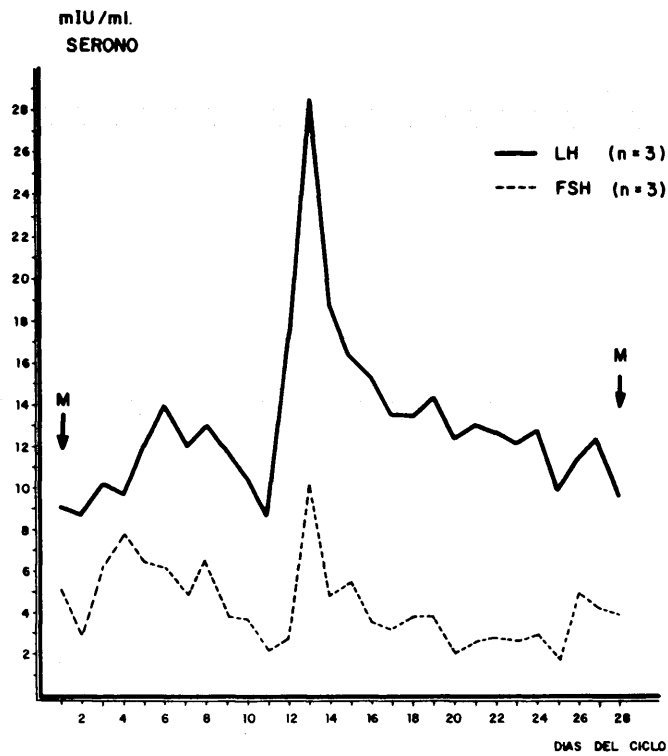


FIG. 49: CONCENTRACIONES (mIU/ml-SERONO) DE LH Y FSH DE 3 MUJERES EN DIFERENTES DIAS DE CICLOS MESTRUALES NORMALES. SE TOMA COMO DIA 1 EL PRIMER DIA DE LA MESTRUACION.

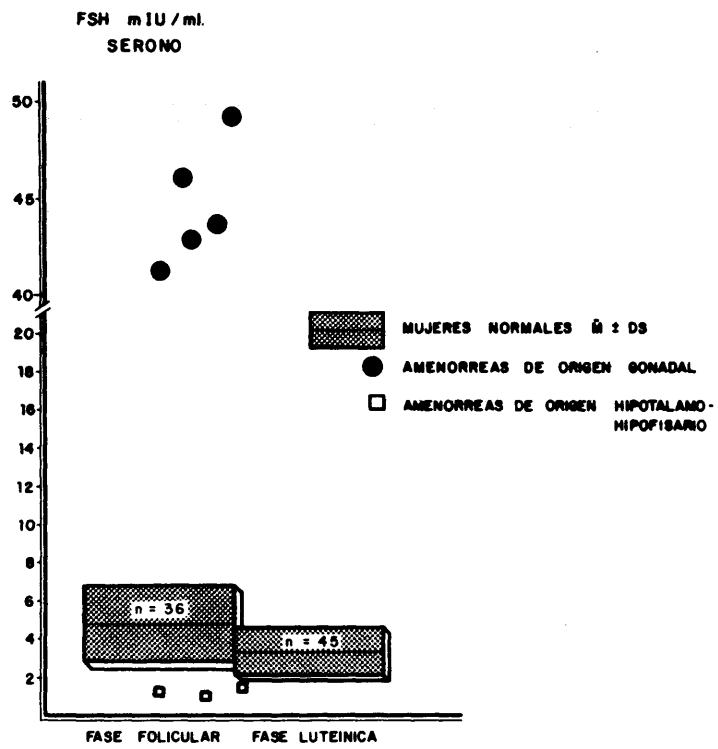


FIG. 50: CONCENTRACIONES (mIU/ml)-SERONO) DE FSH EN MUJERES AMENORREICAS Y EN LAS FASES FOLICULAR Y LUTEINICA CORRESPONDIENTES A CICLOS MENSTRUALES NORMALES.

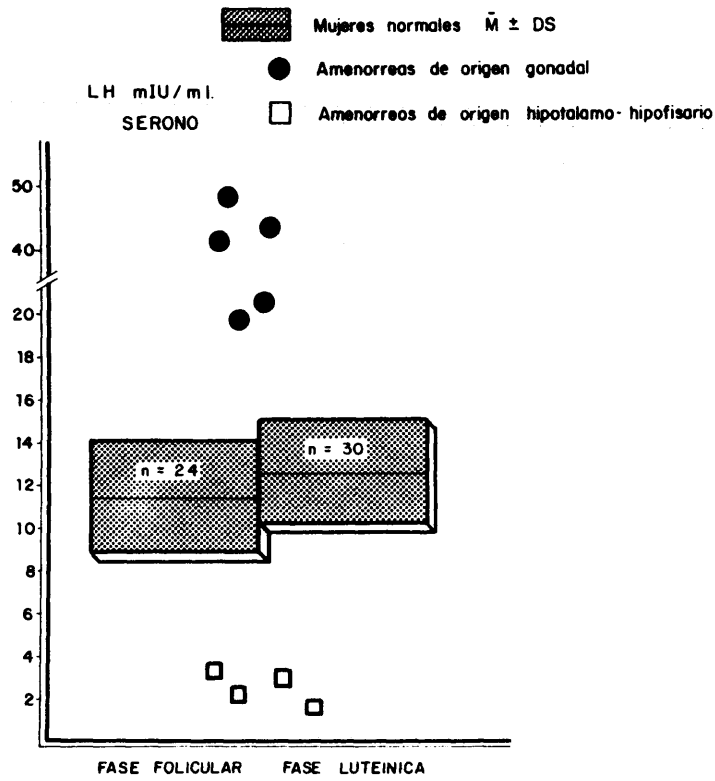


FIG.51: CONCENTRACIONES (mIU/ml-SERONO) DE LH EN MUJERES AMENORREICAS Y EN LAS FASES FOLICULAR Y LUTEINICA CORRESPONDIENTES A CICLOS MENSTRUALES NORMALES.

B) POR EL METODO DE SERONO

Se han determinado, igual que en al método anterior, LH y FSH en :

- 1) Ciclos menstruales normales
- 2) Fase folicular y Fase luteínica en Mujeres normales
- 3) Amenorreas de diferentes causas.

Tomando como día 1 el 1º día de comienzo de la menstruación, se realizaron determinaciones de FSH y LH durante todos los días del ciclo hasta el comienzo de la -- menstruación siguiente en tres mujeres (Fig.49). En los -- tres casos las máximas concentraciones de FSH y LH coinciden en el día 13. Elegimos esta forma de representación para hacer notar la coincidencia de los picos de FSH y LH en el mismo día, que no podía ser observada en la forma -- de representación del Método anterior, en el que habíamos elegido este día como referencia.

La \bar{M} , D.S, y E.S.M, y los valores individuales en la Fase folicular y luteínica se presentan en la Tabla 17 -B. Graficamente, estos resultados pueden ser observa-- dos en las Figuras 50 y 51, junto con los valores indivi-- duales de mujeres con diferentes Amenorreas.

Los valores de FSH y LH en Amenorreas de ori--

gen hipotalámico-hipofisario son muy bajos y en las de origen gonadal (disgenesias gonadales) son mucho más altos que los normales, siendo generalmente los de FSH (50, 48 mIU/ml) más elevados que los de LH (25, 19 mIU/ml).

III. 3 . DINAMICA DE LA SECRECION DE FSH Y LH
EN MUJERES CON CICLOS ANOVULATORIOS

Se determinaron las cifras de FSH y LH en dos mujeres que presentaban baches amenorreicos con ciclos anovulatorios, confirmados con estudios de temperatura basal y valoraciones de pregnandiol, durante periodos de 5 a 8 meses, y que se pueden observar en las Figuras 52 y 53.

La característica común de ambos ciclos es que el pico ovulatorio de FSH y LH se presenta muy tarde (días 29 y 31) y que la fase luteínica es muy corta, posiblemente debido a que el cuerpo lúteo que se forma, es insuficiente hormonalmente.

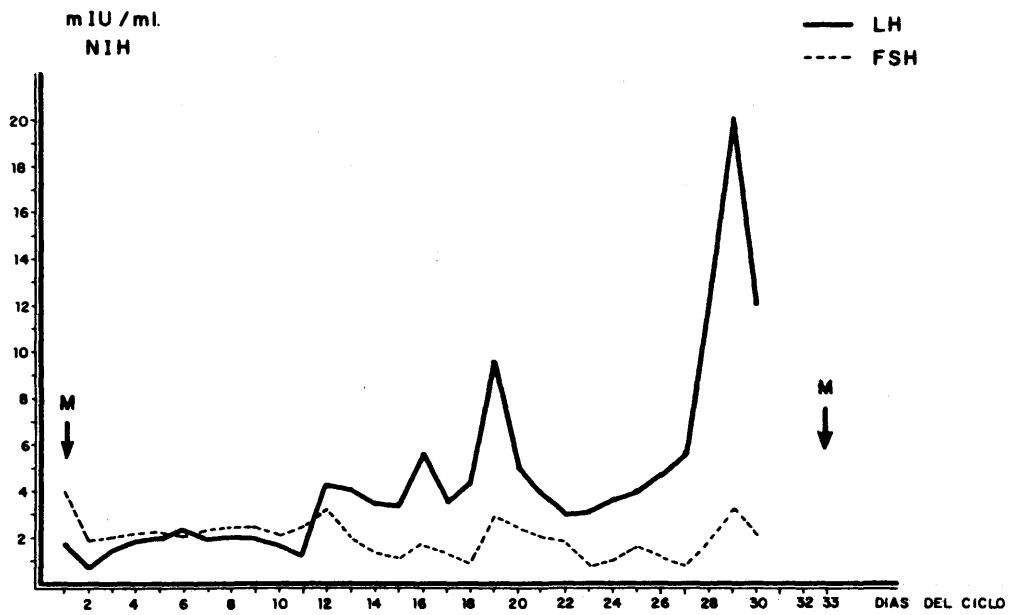


FIG. 52: CONCENTRACIONES (mIU/ml-NIH) DE LH Y FSH EN UNA MUJER CON CICLOS ANOVULATORIOS. SE TOMA COMO DIA 1 EL PRIMER DIA DE LA MENSTRUACION.

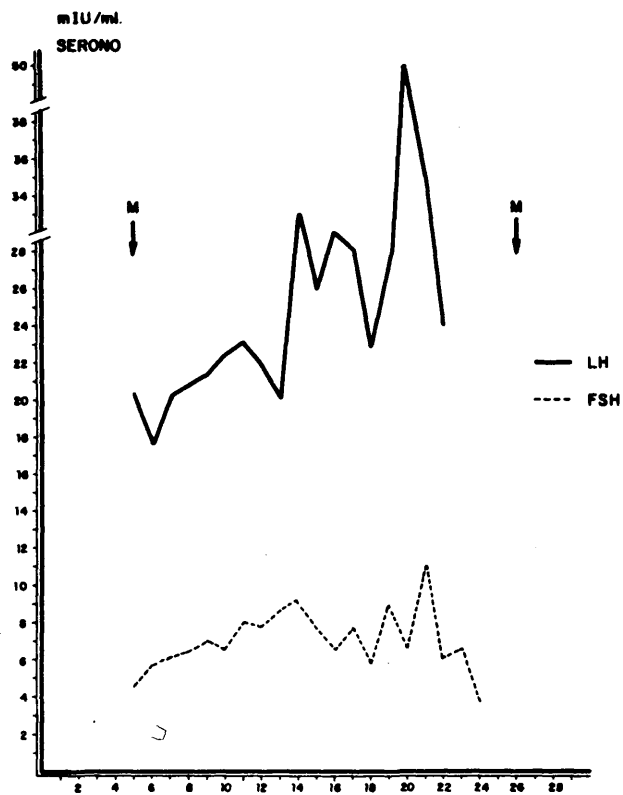


FIG. 53: CONCENTRACIONES (mIU/ml-SERONO) DE LH Y FSH EN UNA MUJER CON CICLOS ANOVULATORIOS. SE TOMA COMO DIA 1 EL PRIMER DIA DE LA MENSTRUACION.

III. 4. COMPARACION CUANTITATIVA DE LAS CONCENTRACIONES
DE FSH Y LH OBTENIDAS POR AMBOS METODOS EN SU-
JETOS NORMALES

A) FSH

En la Figura 54 se expresan comparativamente los valores de FSH en mujeres, en las diferentes fases del ciclo menstrual, así como en los hombres. Como se puede ver, los valores medios obtenidos por el método de NIH, son siempre inferiores a los obtenidos por el método de Serono, y su dispersión, en términos generales, es también menor. Sin embargo existe siempre una buena correlación entre los datos conseguidos por ambos métodos.

B) LH

De igual forma, en la Figura 55, se expresan gráficamente y de una manera comparativa los resultados por ambos métodos. La diferencia apreciada entre las medias, más elevadas en el de Serono que en el NIH, es más acusada que la observada para LH. La dispersión de los datos del método de NIH es menor que el de Serono, aunque existe buena correlación entre los resultados.

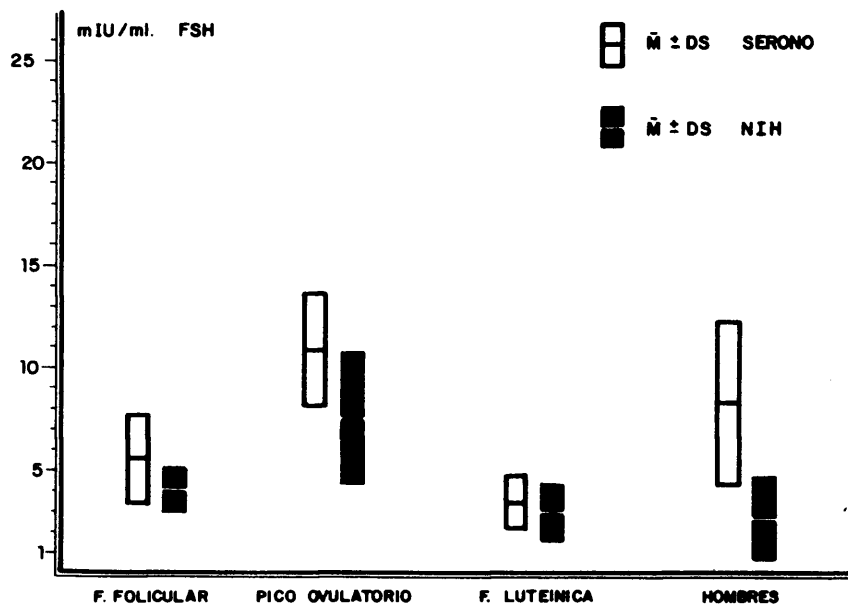


FIG. 54: COMPARACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FSH OBTENIDAS POR EL R.I.A. UTILIZANDO EXTRACTOS PITUITARIOS(NIH) Y EL R.I.A. UTILIZANDO EXTRACTOS URINARIOS (SERONO) EN SUEROS DE MUJERES Y HOMBRES NORMALES.

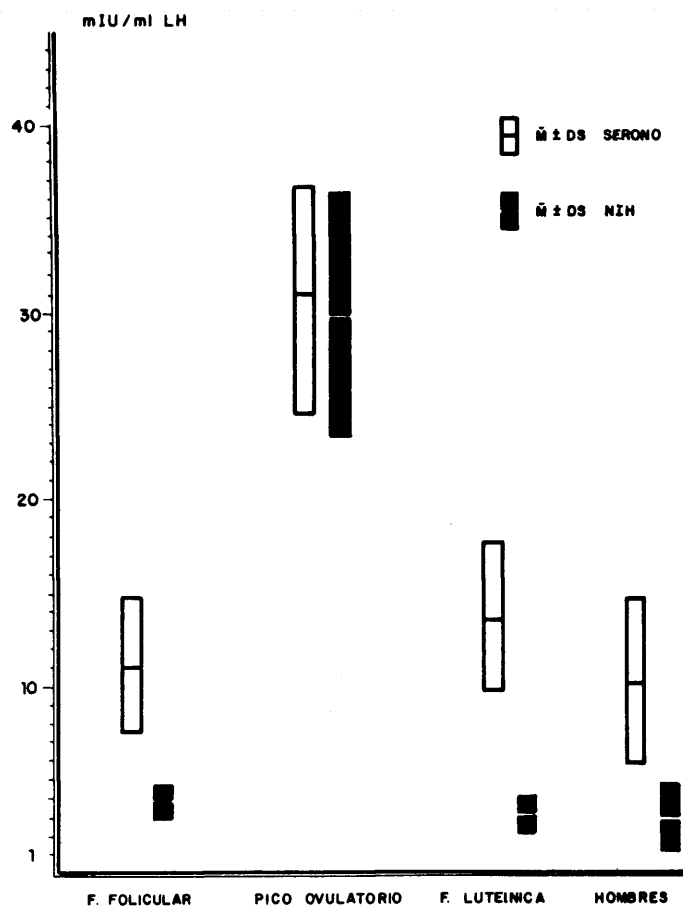


FIG. 55: COMPARACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LH OBTENIDAS POR EL R.I.A. UTILIZANDO EXTRACTOS PITUITARIOS(NIH) Y EN EL R.I.A. UTILIZANDO EXTRACTOS URINARIOS (SERONO) EN SUEROS DE MUJERES Y HOMBRES NORMALES.

IV. RESPUESTA DE LH Y FSH AL TEST DE LH-RH SINTETICO

IV.1. EN HOMBRES NORMALES

A) POR EL METODO DE NIH

La respuesta de LH a la inyección i.v. de LH-RH consiste en una elevación, estadísticamente significativa, en su concentración que comienza a manifestarse a los 15 minutos y que dura, aproximadamente, hasta los 45. (Fig. 56. y Tabla 18). Los niveles de FSH experimentan también una subida por encima de los basales, pero mucho menor, más retrasada (entre los 90 y 120 minutos), y sin significancia estadística.

B) POR EL METODO DE SERONO

De la misma manera que en el método anterior, la Figura 57 y la Tabla 19 representan las respuestas de FSH y LH en 9 hombres normales. La respuesta de LH es máxima a los 30 -45 minutos y la de FSH a los 60-90, siendo ésta menor que la de LH y sin significancia estadística.

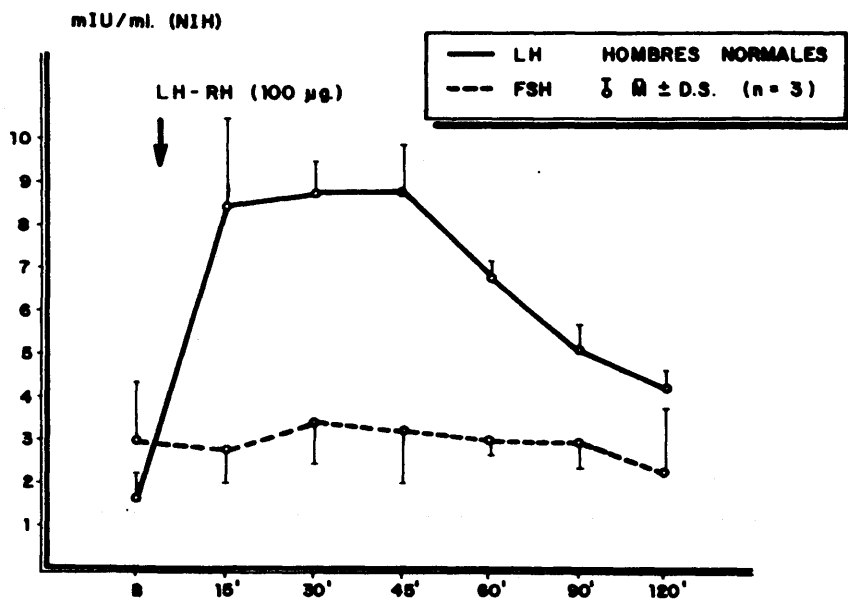


FIG.56: VALORES BASALES Y A LOS 15,30,45,60 90 Y 120 MINUTOS DE FSH Y DE LH (mIU/ml \pm D.S.-NIH) DESPUES DE LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 μ g DE LH-RH EN 3 HOMBRES NORMALES.

TABLA 18

VALORES DE LH Y FSH EN HOMBRES NORMALES DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 100 μ g DE LH-RH

n°	MINUTOS						
	Basal	15	30	45	60	90	120
LH mIU/ml (NIH)							
1	2,0	6,5	8,8	8,5	6,7	5,6	4,6
2	1,8	10,5	9,5	10,0	7,1	5,5	4,2
3	0,85	8,4	8,0	7,9	6,6	4,6	4,0
MEDIA	1,55	8,47**	8,77**	8,8**	6,8**	5,23*	4,27 *
D.S.	0,61	2,0	0,75	1,08	0,26	0,55	0,31
E.S.M.	0,35	1,16	0,43	0,62	0,15	0,32	0,18
% Δ		446	465	467	338	237	175
FSH mIU/ml (NIH)							
1	4,5	3,2	3,6	3,8	3,0	3,6	5,4
2	2,9	3,4	4,2	4,0	3,6	3,2	3,6
3	1,6	2,0	2,3	2,0	2,6	2,4	2,6
MEDIA	3	2,87	3,37	3,27	3,07	3,07	3,87
D.S.	1,45	0,76	0,97	1,10	0,50	0,65	1,42
E.S.M.	0,84	0,44	0,56	0,64	0,29	0,35	0,82
% Δ		-4	12	9	2	2	29

** DIFERENCIA SIGNIFICATIVA P < 0,001

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA P < 0.01 DE LOS VALORES BASALES

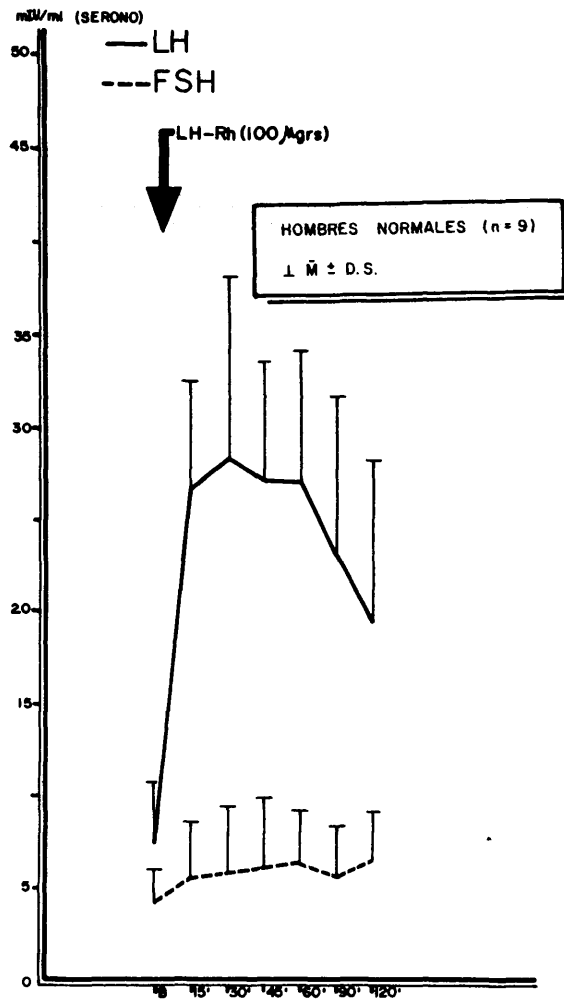


FIG. 57 : VALORES BASALES Y A LOS 15, 30, 45, 60, 90 Y 120 MINUTOS DE FSH Y LH (mIU/ml \pm D.S. - SERONO) DESPUES DE LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 μ g DE LH-RH EN 9 HOMBRES NORMALES.

TABLA 19

VALORES DE LH Y FSH EN HOMBRES NORMALES DESPUES
DE LA ADMINISTRACION DE 100 µg DE LH-RH

MINUTOS							
n°	BASAL	15	30	45	60	90	120
LH mIU/ml (SERONO)							
1	7	29	30	27	22,5	22	16,5
2	4	22	26	27,5	35	17	15,5
3	6,5	40	45	36	34	37	34
4	13	23	24	29	26	23	21
5	7,5	20	18,5	18	18	14	11
6	16	22	23	20	24	21	19
7	13	30,8	28,2	25	22,4	19,6	15,5
8	12	28,2	28,5	24,4	19	19	17,2
MEDIA	9,88	26,88**	27,9**	25,86**	25,11**	21,58**	18,71*
D.S.	4,16	6,59	7,82	5,55	6,33	6,86	6,83
E.S.M.	1,47	2,33	2,77	1,96	2,24	2,43	2,41
% Δ		172	182	161	154	118	89
FSH mIU/ml (SERONO)							
1	3,5	6,3	6,2	6,2	6,5	5,7	7,5
2	2,9	3,0	3,4	3,1	4,2	2,9	3,2
3	5,5	10,0	12,0	12,5	11,0	8,5	10,0
4	2,2	2,3	2,6	2,8	2,9	2,8	3,5
5	6,9	6,5	5,0	6,0	6,5	8,5	7,5
6	1,8	2,0	1,5	1,0	2,1	2,8	1,8
7	4,2	6,0	5,8	7,2	7,8	6,0	5,5
8	3,4	5,5	6,0	6,7	7,2	5,5	4,6
MEDIA	3,8	5,2	5,31	5,69	5,53	5,33	5,45
D.S.	1,7	2,68	3,2	3,5	2,8	2,37	2,73
E.S.M.	0,6	0,95	1,13	1,25	1,02	0,84	0,93
% Δ		36	39	49	45	40	43
** DIFERENCIA SIGNIFICATIVA P < 0,001							
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA P < 0,01 DE LOS VALORES BASALES							

IV. 2. EN HOMBRES CON DIVERSAS PATOLOGIAS ENDOCRINAS

El test de LH-RH se ha realizado en dos sujetos que sufrían hipogonadismo secundario con los diagnósticos de Obesidad hipotalámica, en un caso, y Síndrome de Kallman, en el otro; en ambos casos, como se ve en la Figura 58, se aprecia una respuesta disminuida al test, tanto de FSH como de LH.

Es interesante señalar, sin embargo, que siempre hay algún grado de reserva gonadotrópica, lo que favorece que la pituitaria está intacta en ambas situaciones.

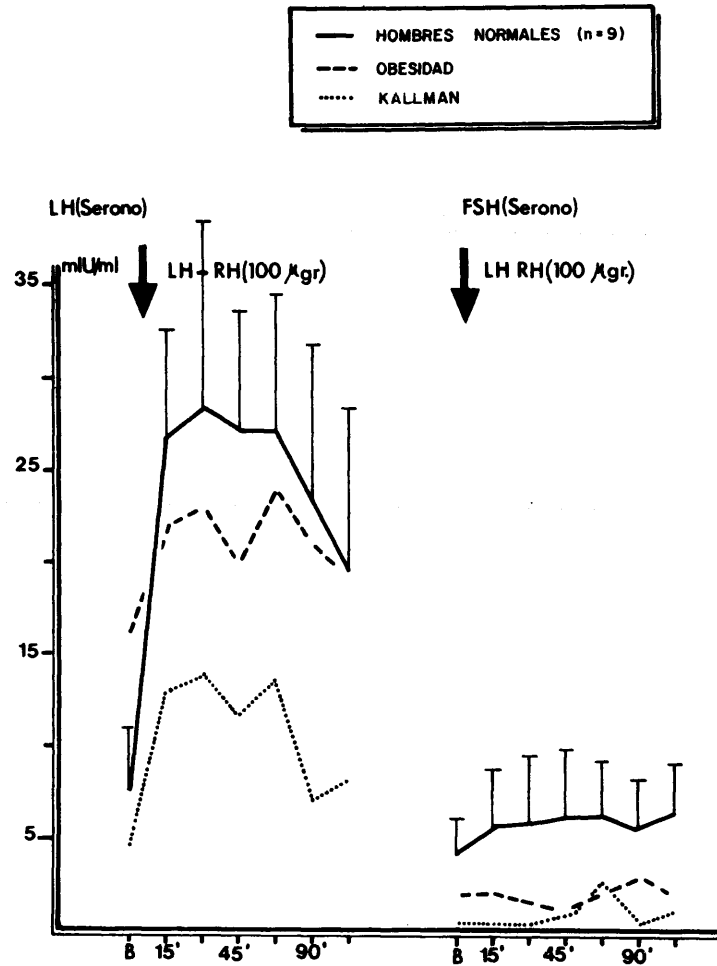


FIG. 58: RESPUESTA DE FSH Y LH (mIU/ml-SERONO) A LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 µg DE LH-RH EN UN OBESO Y UN SINDROME DE KALLMAN EN COMPARACION CON LA RESPUESTA EN HOMBRES NORMALES.

IV. 3. EN MUJERES NORMALES

A) POR EL METODO DE NIH

La respuesta de LH y FSH al test de LH-RH en un grupo de mujeres normales se representa en la Figura 59 y en la Tabla 20. Al igual que en los hombres, la respuesta de LH es máxima a los 30-45 minutos y es estadísticamente significativa. La respuesta de FSH es menor y más retrasada, siendo máxima entre los 90 y 120 minutos. Es interesante comentar que la respuesta de FSH es más acusada en las mujeres que en los hombres, pues en ellas se aprecia que la diferencia entre los valores basales y los obtenidos después de la inyección i.v. de LH-RH es estadísticamente significativa, cosa que no sucedía en los hombres.

B) POR EL METODO DE SERONO

En la Figura 60 y en la Tabla 21 se ilustran la respuesta de LH, que es máxima a los 30 minutos y estadísticamente significativa, y la de FSH, que es máxima entre los 90 y 120 minutos, menor y más retrasada que la de LH, aunque de nuevo más acusada que en los hombres.

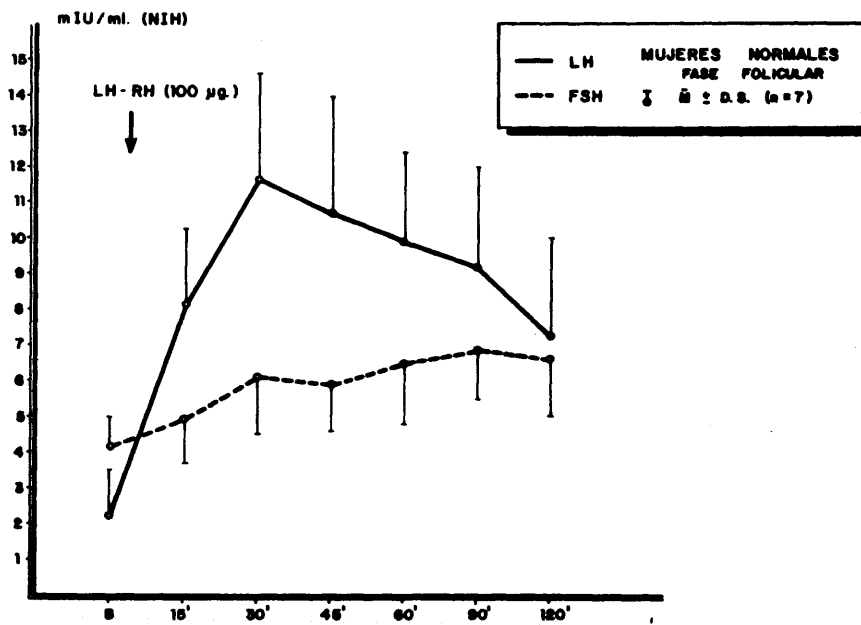


FIG. 59: VALORES BASALES Y A LOS 15,30,45,60,90 Y 120 MINUTOS DE FSH Y DE LH (mIU/ml \pm D.S.-NIH) DESPUES DE LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 μ g DE LH-RH EN 7 MUJERES NORMALES DURANTE LA FASE FOLICULAR

TABLA 20

VALORES DE LH Y FSH EN MUJERES NORMALES (FASE FOLICULAR) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 100 μ g DE LH-RH.

n°	MINUTOS						
	BASAL	15	30	45	60	90	120
LH mIU/ml (NIH)							
1	1,82	10,0	11,0	11,0	9,2	-	5,6
2	1,5	4,8	5,6	5,7	5,1	4,7	4,5
3	0,95	10,0	18,0	15,0	11,8	11,2	-
4	2,2	8,4	11,5	11	10,2	11,8	11,8
5	4,8	10,0	14,0	-	12,0	9,5	6,5
6	1,78	8,0	10,6	10,8	9,7	7,1	6,5
7	2,7	6,2	11,3	11,7	12,0	11,4	9,0
MEDIA	2,24	8,2**	11,71**	10,87**	10,0**	9,28**	7,32**
D.S.	1,25	2,06	3,74	2,98	2,45	2,84	2,65
E.S.M.	0,47	0,78	1,41	1,22	0,93	1,16	1,08
% Δ		226	422	385	346	314	226
FSH mIU/ml (NIH)							
1	5,0	6,9	8,0	7,1	8,1	-	6,6
2	3,1	3,2	3,7	3,7	3,9	4,5	4,6
3	3,1	3,2	4,4	5	5,8	6,3	6,3
4	4,5	5,0	6,0	6,4	6,2	7,0	6,4
5	4,2	5,5	6,8	6,7	5,7	6,5	5,3
6	3,7	5,7	7,2	8,3	8,5	7,9	8,0
7	4,7	5,2	7,0	6,8	8,0	9,2	9,3
MEDIA	4,04	4,96	6,16	6,03	6,6*	6,9*	6,64*
D.S.	0,76	1,35	1,57	1,42	1,67	1,59	1,58
E.S.M.	0,29	0,51	0,59	0,54	0,63	0,65	0,6
% Δ		22	52	49	63	70	64

** DIFERENCIA SIGNIFICATIVA $P < 0,001$

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA $P < 0,01$ DE LOS VALORES BASALES

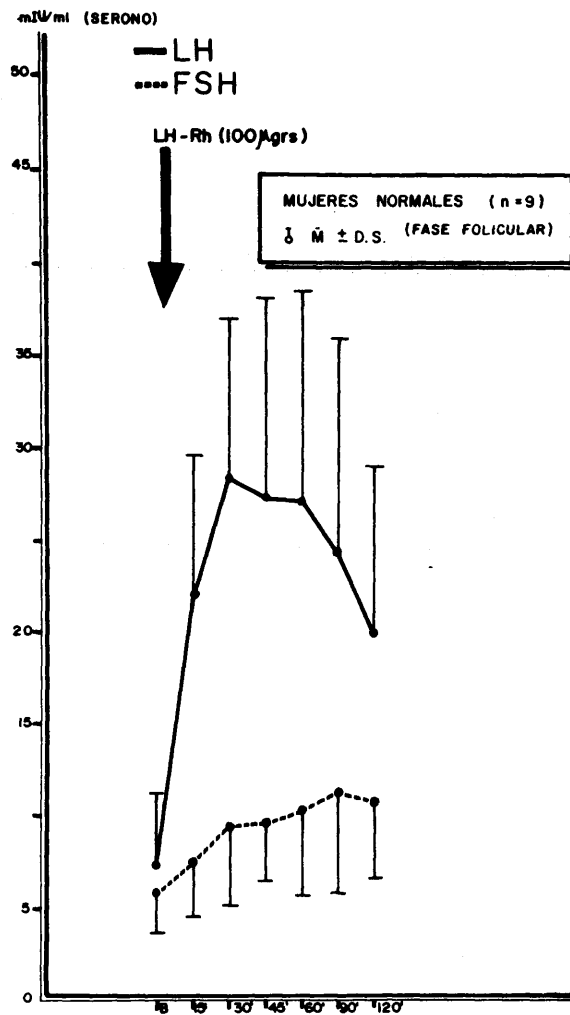


FIG. 60: VALORES BASALES Y A LOS 15,30,45,60,90 Y 120 MINUTOS DE FSH Y LH (mIU/ml \pm D.S.-SERONO) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 100 μ g DE LH-RH EN 9 MUJERES NORMALES DURANTE LA FASE FOLICULAR.

TABLA 21

VALORES DE LH Y FSH EN MUJERES NORMALES (FASE FOLICULAR) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 100 µg DE LH-RH

MINUTOS							
n°	BASAL	15	30	45	60	90	120
LH mIU/ml (SERONO)							
1	6	17	18,6	21	19	17	11
2	14	27	29	25	27	27	25
3	9	24	36	31	25	24	22
4	4	19	24	10,5	11	9,2	7
5	6,2	10,5	16	17	16	18,5	12,5
6	8	30,5	36	37,5	32	38	31
7	5,3	14	23	27	32	16	18
8	3,1	25	38	44	46	39	28
9	16	34	34	32	36	36	30
MEDIA	7,96	22,33**	28,29**	27,22**	27,11**	24,97**	20,5 *
D.S.	4,41	7,77	8,2	10,32	10,82	10,77	8,82
E.S.M.	1,47	2,59	2,73	3,44	3,61	3,59	2,94
Σ Δ		180	262	241	240	213	157
FSH mIU/ml (SERONO)							
1	6,2	10,7	19	14,5	19,1	21,7	19,3
2	7,5	11,0	14	13,5	12	13	14
3	4,5	5,7	6,7	6,8	5,7	5,9	5,7
4	4,0	3,5	5,5	5,8	6,0	6,5	7,0
5	6,5	10,0	9,5	11,0	10,0	16,0	17,0
6	5,2	6,2	8,0	8,2	10,5	10,2	7,5
7	3,0	4,2	5,0	6,4	5,5	5,3	5,4
8	9,5	9,0	10,5	11,5	13,5	12,0	10,5
9	8,1	11,0	11,5	11,5	11,0	11,0	10,2
MEDIA	6,06	7,92	9,97***	9,91***	10,37***	11,29****	10,73***
D.S.	2,09	3,00	4,47	3,20	4,39	5,28	5,02
E.S.M.	0,70	0,98	1,49	1,07	1,46	1,76	1,67
Σ Δ		30	64	63	71	86	77

**** P<0,02
 *** P<0,05
 ** P<0,001
 * P<0,01 DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LOS VALORES BASALES

IV. 4. EN MUJERES CON DIVERSAS PATOLOGIAS ENDOCRINAS

La respuesta al test de LH-RH en un grupo de mujeres con Síndrome de Sheehan se puede observar en la Figura 61. En los tres casos estudiados los valores basales de LH y FSH son menores que los normales, y existe siempre respuesta al test aunque en un grado inferior al que presentan los sujetos normales.

Hemos estudiado también un grupo de mujeres que padecían de Síndrome de Cushing por hiperplasia suprarrenal y con amenorrea de varios años de duración. Como se puede apreciar en la Figura 62, la respuesta al test de LH-RH, sobretodo en dos de ellas, es muy pobre en relación con la de los normales, que se manifiesta más claramente en la de LH.

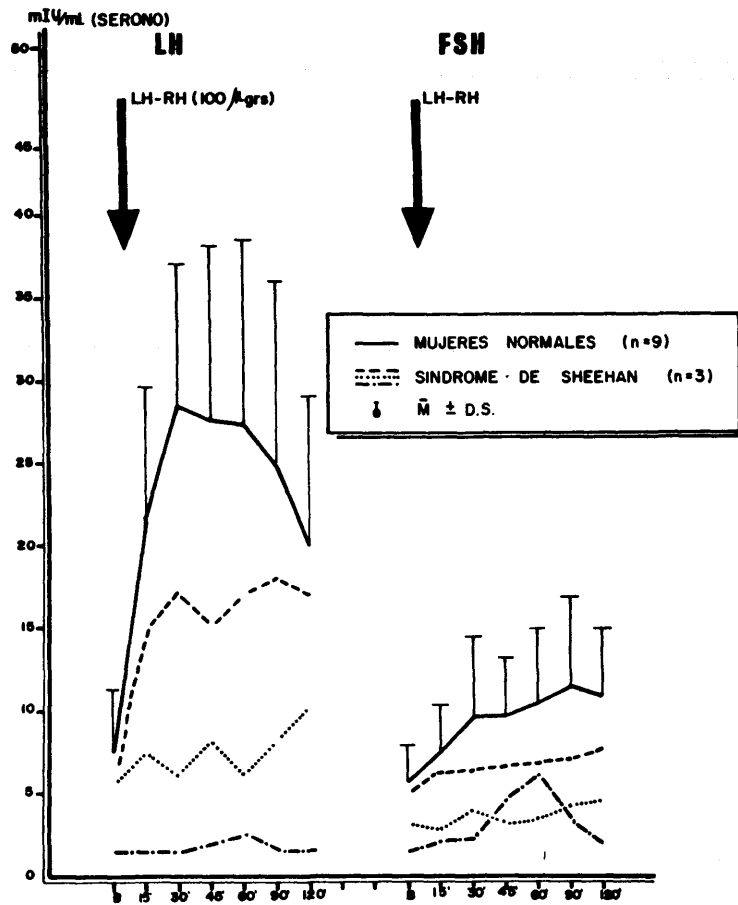


FIG. 61: RESPUESTA DE FSH Y LH (mIU/ml-SERONO) A LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 µg DE LH-RH EN 3 SINDROMES DE SHEEHAN COMPARADA CON LA RESPUESTA EN MUJERES NORMALES.

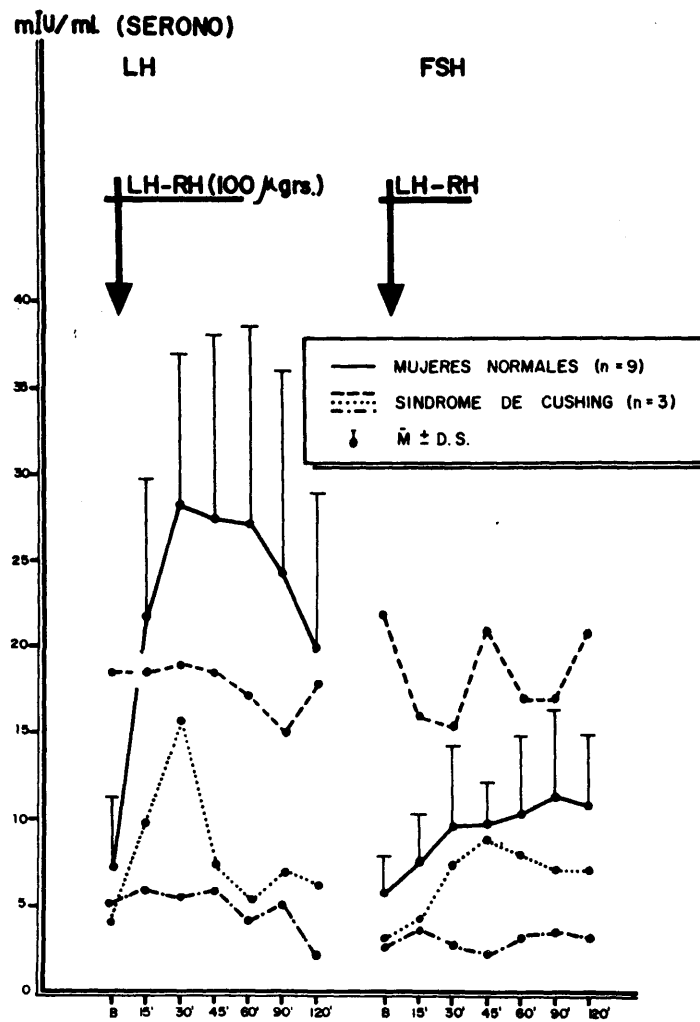


FIG. 62: RESPUESTA DE FSH Y LH (mIU/ml -SERONO) A LA ADMINISTRACION I.V. DE 100 µg DE LH-RH EN 3 SINDROMES DE CUSHING COMPARADA CON LA RESPUESTA EN MUJERES NORMALES.

IV. 5. EFEECTO DE LA TESTOSTERONA I.V. EN LA RESPUESTA DE FSH Y LH AL TEST DE LH-RH EN HOMBRES NORMALES.

Testosterona cristalina disuelta en 0,5 ml de alcohol etílico, en dosis farmacológicas (12 mg) fué administrada en infusión i.v. durante cuatro horas con el fin de comprobar su efecto inhibitorio sobre la secrección de FSH y LH y sobre la respuesta a la inyección de LH-RH.

Como se puede observar en la Figura 63 y en la Tabla 22, la administración de testosterona i.v., durante dos horas, disminuye notablemente los niveles basales de LH sin que se varían los de FSH. Por el contrario, la testosterona es incapaz de modificar la respuesta de ambas gonadotropinas al estímulo de LH-RH de una manera negativa, e incluso se puede decir que la favorece, aún cuando la diferencia respecto al grupo control no es significativa.

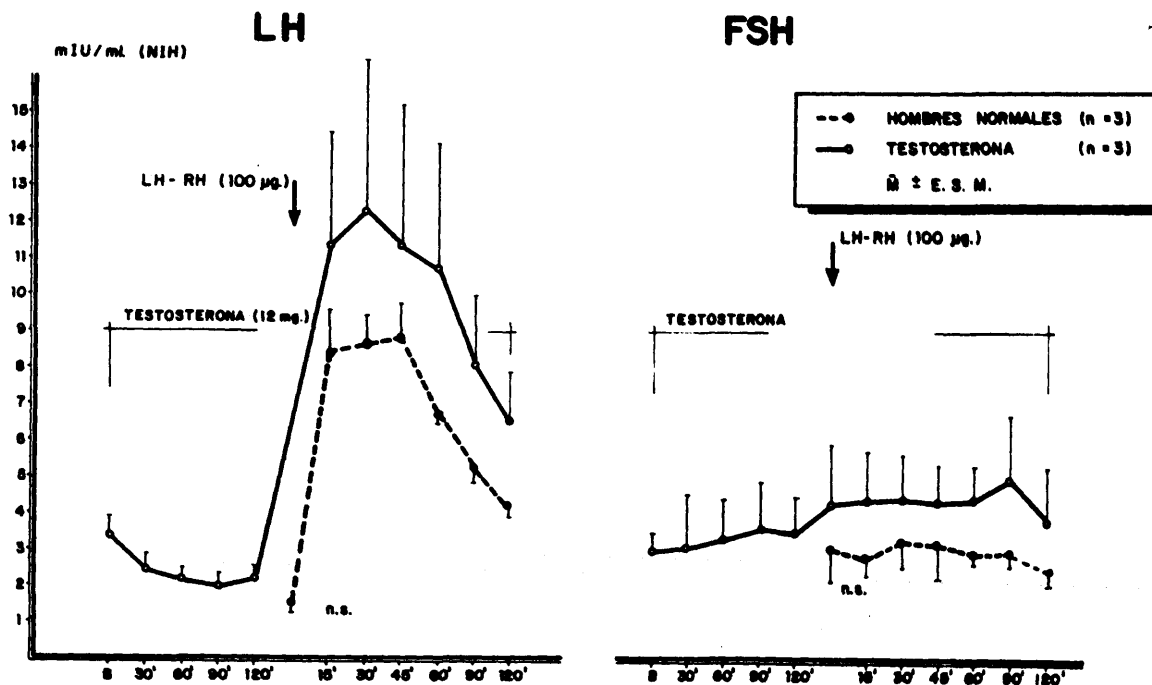


FIG. 57: EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE 12 mg DE TESTOSTERONA EN LA RESPUESTA DE FSH Y LH(NIH) A LA INYECCION INTRAVENOSA DE 100 µg DE LH-RH EN 3 HOMBRES NORMALES. LAS DIFERENCIAS DE RESPUESTAS EN AMBOS CASOS NO SON SIGNIFICATIVAS ESTADISTICAMENTE.

TABLA 22

VALORES DE LH Y FSH EN HOMBRES NORMALES DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 100 µg DE LH-RH 12 mg DE TESTOSTERONA

n°	MINUTOS										
	BASAL	30	60	90	120	15	30	45	60	90	120
LH mIU/ml (NIH)											
1	4,3	3	2,8	2,7	2,3	11,2	12,0	11,0	10,0	7,5	6,5
2	3,0	2,1	2,0	1,4	1,7	6,4	6,0	5,4	5,5	5,5	4,2
3	3,0	2,1	2,0	1,6	2,8	17,0	20,0	18	17	11,5	9,0
MEDIA	3,43	2,4	2,27	1,9	2,27	11,53	12,33	11,47	10,83	8,17	6,57
D.S.	0,75	0,52	0,46	0,70	0,55	5,31	7,09	6,71	5,80	3,06	2,4
E.S.M.	0,43	0,30	0,27	0,4	0,32	3,06	4,10	3,88	3,35	1,76	1,39
FSH mIU/ml (NIH)											
1	3	1,7	2,7	2,3	2,5	2,6	2,4	3,2	3,4	2,5	2,7
2	3,8	4,5	5,0	6,0	5,5	6,5	6,2	6,1	6,0	8,0	-
3	2,3	-	1,9	2,7	2,8	3,8	4,5	4,0	4,0	4,5	5,0
MEDIA	3,03	3,1	3,2	3,67	3,6	4,3	4,37	4,43	4,47	5,0	3,85
D.S.	0,75	1,98	1,61	2,03	1,65	2,0	1,9	1,5	1,36	2,78	1,63
E.S.M.	0,43	1,4	0,93	1,17	0,95	1,15	1,1	0,86	0,79	1,61	1,15

IV. 6. EFECTO DE LOS ESTROGENOS (EQUINOS) EN LA RESPUES-
TA DE FSH Y LH AL TEST DE LH-RH EN MUJERES NORMA--
LES (FASE FOLICULAR)

Estrógenos equinos conjugados en dosis farmacológicas para seres humanos (20 mg) fueron administrados i.v. durante cuatro horas con el fin de estudiar su efecto inhibitor en la secreción de FSH y LH, y también en la respuesta con LH-RH.

Como puede apreciarse, en las Figuras 64 y 65 y en la Tabla 23, en condiciones basales y después de dos horas de la infusión de estrógenos, los valores de FSH y LH están marcadamente disminuídos, sobretodo los de FSH. -- Tras la inyección de LH-RH, los estrógenos son capaces de inhibir practicamente la respuesta de FSH y LH al citado estímulo, de tal modo que la diferencia respecto al grupo control es estadísticamente significativa, aunque menos acusada en los valores de FSH.

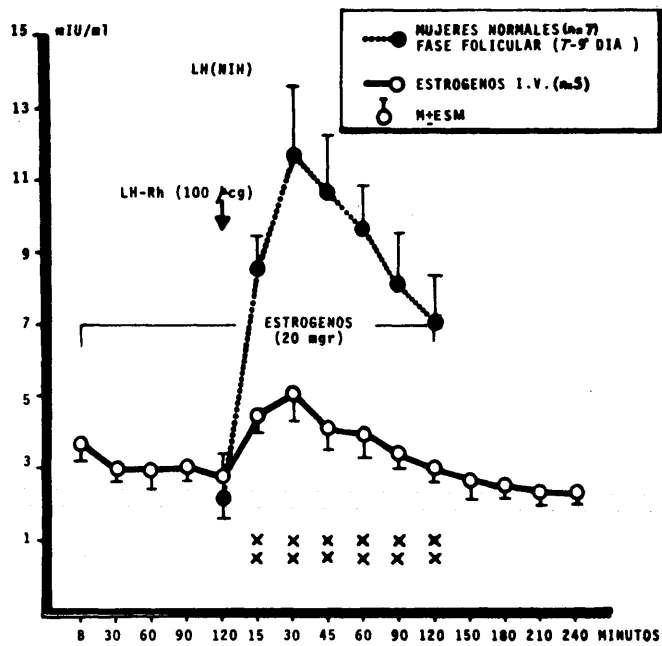


FIG. 64: EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE 20 mg DE ESTROGENOS EN LA RESPUESTA DE LH (NIH) A LA INYECCION INTRAVENOSA DE 100 µg DE LH-RH EN 5 MUJERES NORMALES DURANTE LA FASE FOLICULAR. LA DIFERENCIA DE RESPUESTA PRODUCIDA NO ES SIGNIFICATIVA ESTADISTICAMENTE.

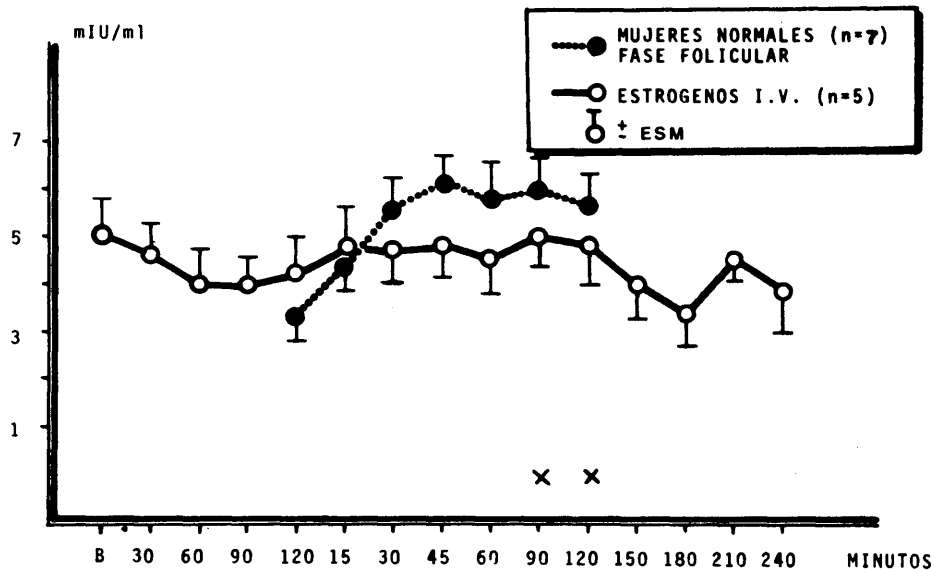


FIG. 65: EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE 20 mg DE ESTROGENOS EN LA RESPUESTA DE FSH (NIH) A LA INYECCION INTRAVENOSA DE 100 µg DE LH-RH EN 5 MUJERES NORMALES DURANTE LA FASE FOLICULAR. LA DIFERENCIA DE RESPUESTA PRODUCIDA NO ES SIGNIFICATIVA ESTADISTICAMENTE.

TABLA 23
VALORES DE LH Y FSH EN MUJERES NORMALES DESPUES DE LA ADMINISTRACION
DE 100µg DE LH-RH + 20 m g. DE ESTROGENOS (CORESTRON) EQUINOS

LH mIU/ml (NIH)															
MINUTOS															
n°	Basal	30	60	90	120	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240
1	3,5	2,6	2,1	3,8	2,6	4,6	7,0	6,0	5,5	4,2	4,0	3,4	3,1	3,2	2,2
2	4,7	3,4	4,3	3,4	4,0	4,5	6,0	3,9	4,7	3,5	3,2	3,2	2,3	2,0	2,7
3	2,6	2,4	2,1	2,1	1,5	3,2	2,7	2,4	1,8	2,4	2,2	1,4	2,0	1,6	2,0
4	3,0	3,2	2,1	2,7	2,8	5,2	5,0	4,3	5,0	4,0	3,0	-	-	-	-
5	4,5	3,8	4,0	2,8	3,0	4,5	4,4	3,8	2,7	2,6	2,2	-	-	-	-
MEDIA	3,66	2,88	2,92	2,96	2,78	4,40*	5,02*	4,08*	3,95**	3,34**	2,92*	2,67	2,47	2,23	2,30
D.S.	0,92	0,41	1,13	0,66	0,90	0,73	1,63	1,29	1,58	0,81	0,76	1,10	0,57	0,87	0,36
E.S.M.	0,41	0,19	0,50	0,29	0,40	0,33	0,73	0,58	0,71	0,36	0,34	0,64	0,33	0,50	0,21

FSH mIU/ml (NIH)															
MINUTOS															
n°	Basal	30	60	90	120	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240
1	4,2	3,6	2,6	2,9	2,6	2,9	5,1	4,2	3,8	4,2	3,9	3,0	3,9	4,2	2,6
2	5,0	3,7	3,1	3,1	2,3	3,9	2,7	3,6	4,7	4,2	4,2	4,7	4,6	3,8	-
3	4,5	4,0	4,0	3,7	4,7	5,0	4,5	4,3	4,0	3,8	3,5	4,7	2,3	4,4	3,8
4	4,5	5,0	3,8	4,1	3,8	6,0	5,5	4,5	3,8	5,0	5,0	-	-	-	-
5	7,0	6,0	5,7	5,2	6,0	5,5	6,0	6,3	6,5	6,0	6,5	-	-	-	-
MEDIA	5,04	4,46	3,84	3,80	3,88	4,66	4,36	4,58	4,56	4,64**	4,62***	4,13	3,60	4,13	3,20
D.S.	1,13	1,02	1,18	0,92	1,53	1,25	1,44	1,02	1,15	0,88	1,19	0,98	0,89	0,31	0,85
E.S.M.	0,51	0,46	0,53	0,41	0,68	0,56	0,65	0,46	0,51	0,39	0,53	0,57	0,51	0,18	0,60

* P < 0,01

** P < 0,001

*** P < 0,02

**** P < 0,05

DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LOS VALORES CORRESPONDIENTES A LA ADMINISTRACION DE
100 µg DE LH-RH (TABLA 20).

IV. 7. CONCENTRACION DE FSH Y LH EN NIÑOS.

Se han determinado las cifras basales de gonadotropinas en un grupo de niños normales de edades comprendidas entre 7 y 13 años. Como puede observarse en las Figuras 66 y 67 las cifras van aumentando paralelamente con la edad, tanto la LH como la FSH; a los 10-13 años las cifras de FSH ya han alcanzado las de la edad adulta, mientras que las de LH, superiores a las de FSH, a los 10-13 años todavía no han alcanzado los límites de normalidad de los hombres adultos.

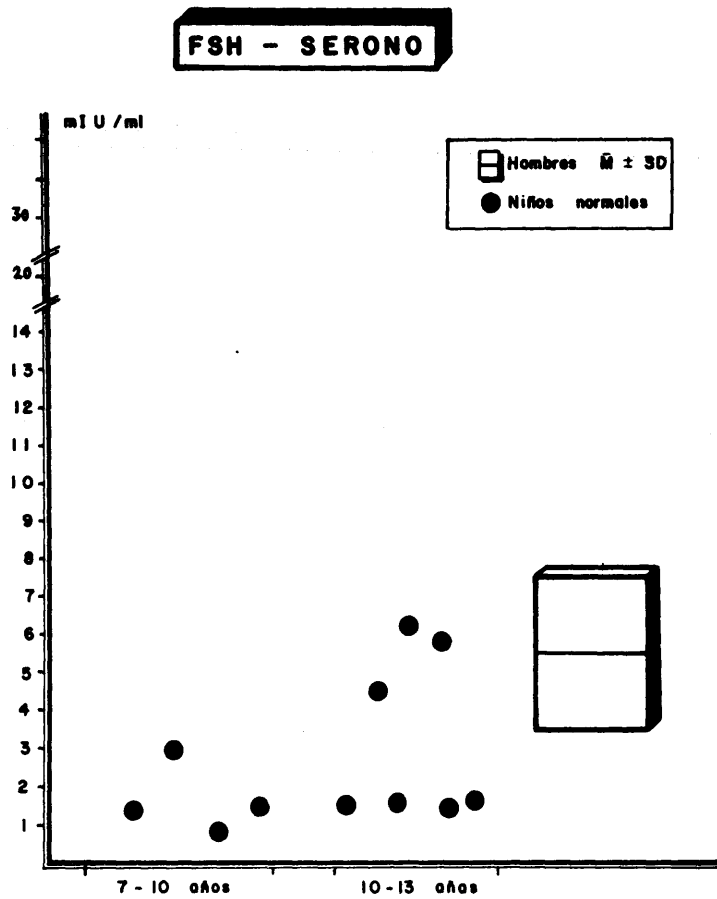


FIG. 66: VALORES DE FSH (mIU/ml-SERONO) EN NIÑOS NORMALES COMPARADOS CON LOS VALORES EN HOMBRES ADULTOS.

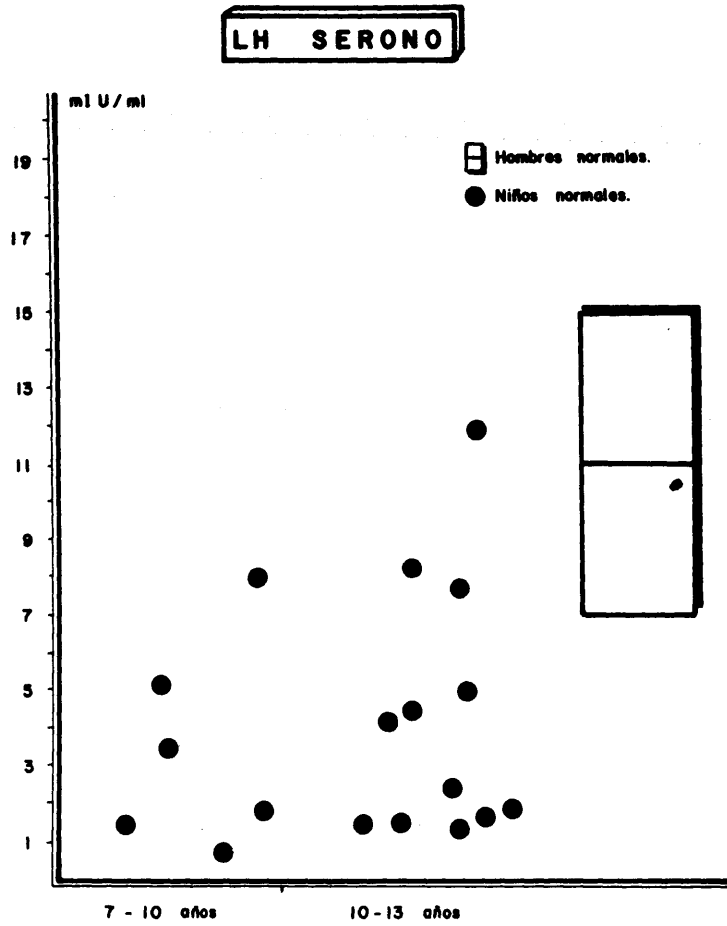


FIG. 67: VALORES DE LH (mIU/ml-SERONO) EN NIÑOS NORMALES COMPARADOS CON LOS VALORES EN HOMBRES ADULTOS.

IV. 8. RESPUESTA DE LH Y FSH AL TEST DE LH-RH SINTE-
TICO EN NIÑOS PREPUBERALES Y PUBERALES.

En los tests de LH-RH realizados en un grupo de niños prepuberales y en otro grupo de niños puberales, se han inyectado i.v. 200 ug de LH-RH, disueltos en 300 c.c. de suero salino, durante cuatro horas; se han determinado los valores basales de FSH, LH y Testosterona a la 1, 2, 3 y 4 horas durante la infusión y 30 minutos después de terminado el experimento. Los resultados se expresan en la Figura 68 y en las Tablas 24 y 25.

En los niños prepuberales la respuesta tanto de FSH como de LH es muy pobre, no siendo estadísticamente significativa. Es interesante comentar el hecho de que la respuesta de FSH es más acentuada que la de LH, al revés de lo que sucedía en los adultos.

En la pubertad, la respuesta al LH-RH es prácticamente igual a la obtenida en los adultos. El incremento de la testosterona, como es lógico, sigue paralelo al de LH tanto en los puberales como en los prepuberales, aunque en esto últimos es menor.

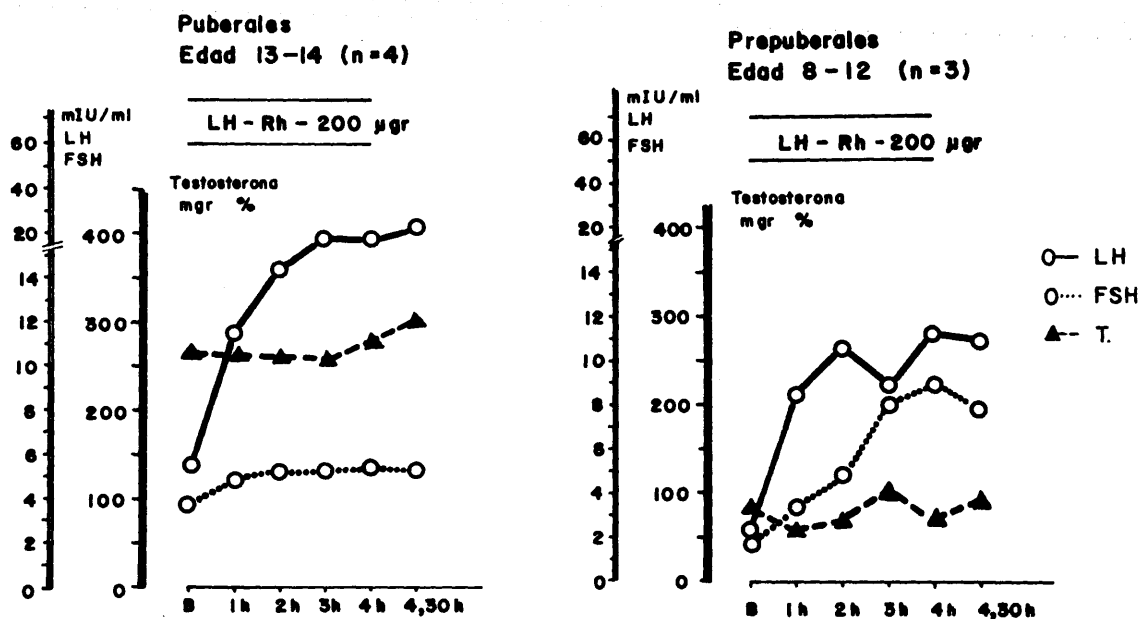


FIG. 68: VALORES BASALES Y A LAS 1,2,3,4,Y 4,30 HORAS DE LH Y FSH (SERONO) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 200 µg DE LH-RH EN NIÑOS PREPUBERALES Y PUBERALES.

TABLA 24

VALORES DE LH Y FSH EN NIÑOS PUBERALES(13-14 AÑOS) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 200 µg DE LH-RH

n°	BASAL	1	2	3	4	4,30
LH mIU/ ml (SERONO)						
1	8,2	5,2	9,5	19,5	14,0	25
2	1,8	9,0	12,5	9,5	12,0	23
3	4,2	12,8	16,0	14,5	16,2	15
4	8,7	20	18,2	20,1	22,5	22
MEDIA	5,73	11,75	14,05****	15,90****	16,18*	21,25*
E.S.M.	1,65	3,16	1,92	2,48	2,28	2,17
FSH mIU/ml (SERONO)						
1	6,2	5,9	7,5	5,2	6,4	5,5
2	1,5	2,4	1,8	2,9	3,5	4,0
3	2,1	4,4	3,7	5,5	3,8	5,4
4	5,7	7,2	8,0	7,2	8,2	6,5
MEDIA	3,88	4,98	5,25	5,2	5,47	5,35
E.S.M.	1,21	1,03	1,5	0,88	1,12	0,51

**** P < 0,02
* P < 0,01 DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE LOS VALORES BASALES.

TABLA 25

VALORES DE LH Y FSH EN NIÑOS PREPUBERALES(8-12AÑOS) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE 200 µg DE LH-RH

HORAS						
n°	BASAL	1	2	3	4	4,30
LH mIU/ml (SERONO)						
1	1,9	3,2	2,5	3,5	3,8	3,4
2	1,5	6,0	11,0	6,2	8,0	9,5
3	3,5	16,0	18,0	17,0	22,0	20
MEDIA	2,3	8,4	10,5	8,9	11,27	10,97
E.S.M.	0,61	3,89	4,48	4,12	5,5	4,85
FSH mIU/ml (SERONO)						
1	1,5	3,6	4,7	7,0	7,5	6,8
2	1,5	2,0	1,8	4,0	8,6	6,8
3	3,0	4,6	8,0	13,0	11,1	10,0
MEDIA	2,0	3,4	4,83	8	9,07	7,87
E.S.M.	0,5	0,76	1,79	2,65	1,07	1,07

V. TEST DEL CLOMIPHENO

V.1. EN HOMBRES ADULTOS Y EN NIÑOS PREPUBERALES

La respuesta al test de Clomipheno realizado en un grupo de hombres adultos, consiste en un incremento de los niveles de LH y FSH, más acusado en los de LH llegando a doblar prácticamente las cifras basales (Fig. 69).

En el mismo test realizado en niños prepuberales no se obtiene respuesta positiva, e incluso puede decirse que existe un descenso en las cifras de LH y FSH (Fig. 69).

V. 2. EN PATOLOGIAS ENDOCRINAS MASCULINAS Y FEMENINAS

Como se puede observar en la Figura 70, en el Síndrome de Kallman no hay respuesta de las gonadotrofinas al estímulo con Clomipheno durante cinco días, sin embargo como ya hemos señalado, el LH-RH es capaz de inducir algún grado de respuesta, lo que favorece que esta enfermedad sea de origen hipotalámico.

En las disgenesias gonadales masculinas (Síndrome de Klinefelter), las cifras basales de FSH y LH son muy elevadas y no responden al test del Clomipheno (Fig. 71).

TEST DEL CLOMIFENO : 100 mg / 5 dias



FIG. 69: VALORES BASALES DE FSH Y LH(mIU/ml) Y MAXIMA RESPUESTA A LA ADMINISTRACION ORAL DE 100 mg DE CLOMIFENO EN 3 HOMBRES ADULTOS Y 4 NIROS PREPUBERALES.

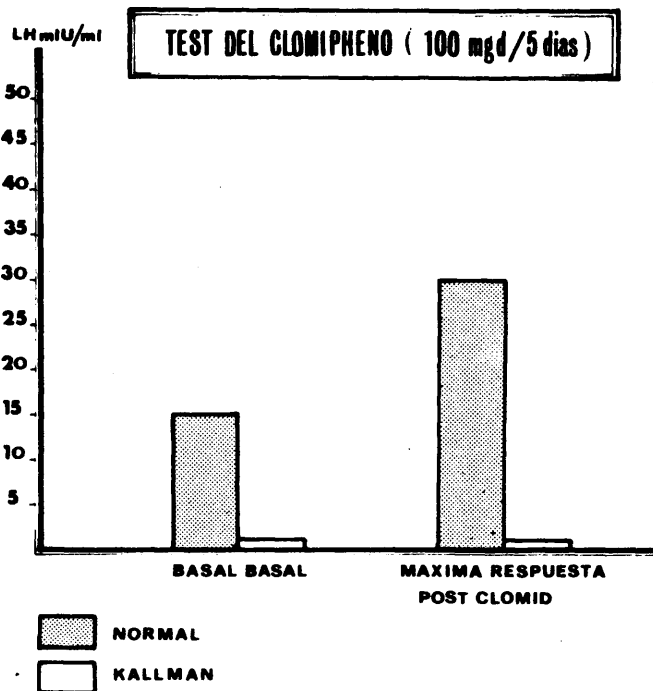


FIG.70: VALORES BASALES DE LH(mIU/ml-SERONO) Y MAXIMA RESPUESTA A LA ADMINISTRACION ORAL DE 100 mg DE CLOMIFENO EN HOMBRES NORMALES Y EN EL SIN DROME DE KALLMAN.

TEST DEL CLOMIPHENE (100 mg/ 5d.) EN LA DISGENESIA GONADAL
(n=2)

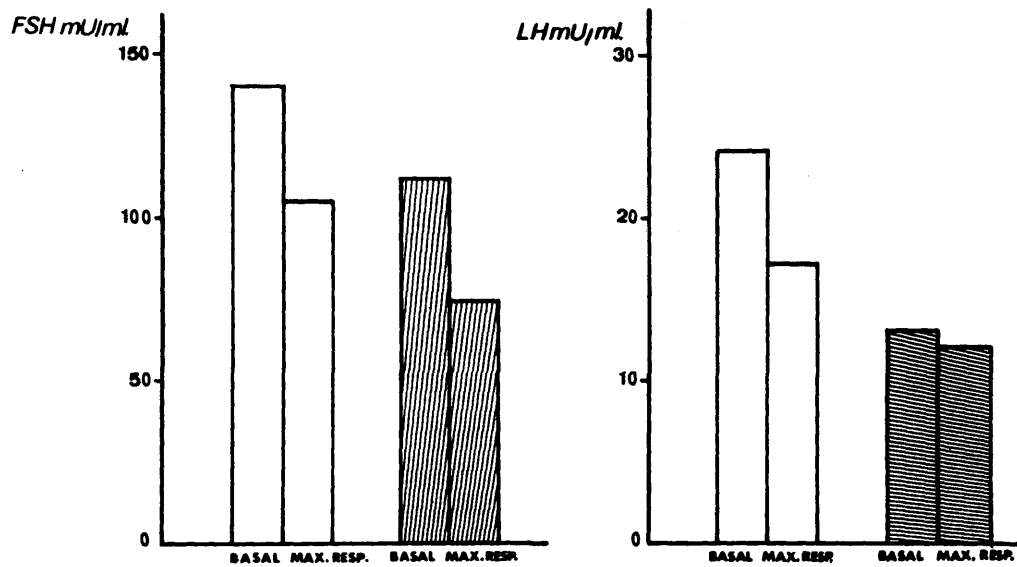


FIG. 71: VALORES BASEALES DE FSH Y LH(mIU/ml-SERONO) Y MAXIMA RESPUESTA A LA ADMINISTRACION ORAL DE 100 mg DE CLOMIPHENO EN 2 HOMBRES CON DISGENESIA GONADAL.

En un grupo de mujeres con disgenesia gonadal (Sindrome de Turner), como se puede observar en las Figuras 72 A y B y 73 A y B , no hay respuesta al Clomiphe_no, mientras que el LH-RH es capaz de provocar respuesta tanto de FSH como de LH, lo que demuestra que el estado funcional de la pituitaria es normal.

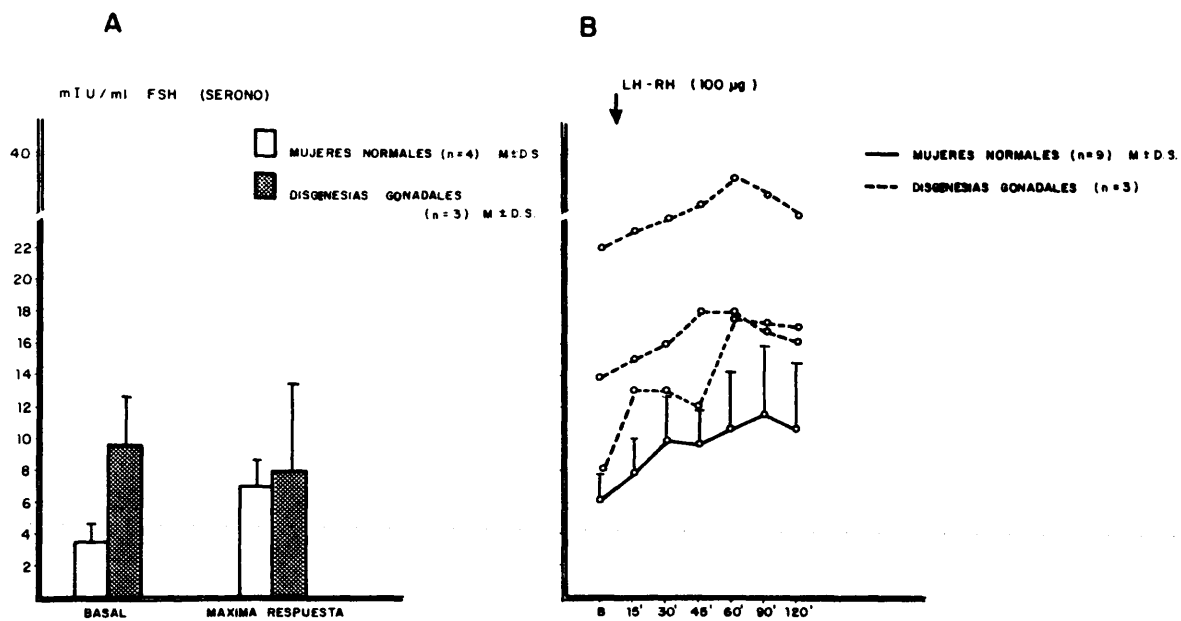


FIG. 72: (A) RESPUESTA DE FSH AL TEST DEL CLOMIPHENO EN 3 CASOS DE MUJERES CON DISGENESIA GONADAL
 (B) RESPUESTA DE FSH AL TEST DE LH-RH EN 3 CASOS DE MUJERES CON DISGENESIA GONADAL
 AMBOS TESTS SE COMPARAN CON LAS RESPUESTAS OBTENIDAS EN MUJERES NORMALES.

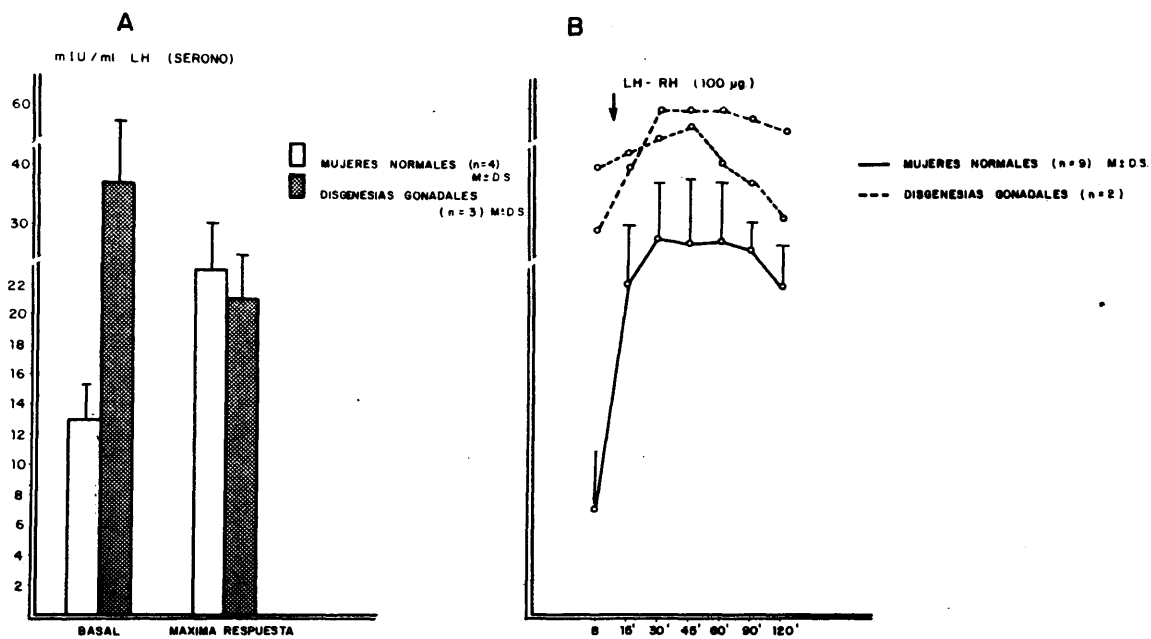


FIG. 73: (A) RESPUESTA DE LH AL TEST DE CLOMIPHENO EN 3 CASOS DE MUJERES CON DISGENESIA GONADAL
 (B) RESPUESTA DE LH AL TEST DE LH-RH EN 2 CASOS DE MUJERES CON DISGENESIA GONADAL
 AMBOS TESTS SE COMPARAN CON LAS RESPUESTAS OBTENIDAS EN MUJERES NORMALES.

Q U E S T I O N

En primer lugar, vamos a discutir las condiciones experimentales bajo las que hemos realizado las iodaciones de FSH y LH para su utilización en el R.I.A., empleando material hormonal donado por N.I.H. (National Institute of Health).

Para la iodación de FSH y LH se pueden usar los isótopos radioactivos ^{125}I y ^{131}I . Nosotros hemos elegido el ^{125}I -- por su mayor abundancia isotópica, por la baja energía de sus radiaciones γ (27 Kev) y Roetgen (35 Kev), produciendo así menos irradiación del ambiente (324), y, sobre todo, por su larga vida media (60 días) en comparación con la de ^{131}I (8 días), -- permitiendonos utilizar la hormona marcada varios días después de su iodación.

Las determinaciones radioinmunológicas de FSH y LH requieren hormona marcada de alta actividad específica, para lo cual hemos utilizado el método original de Greenwood y col. --- (91), con alguna modificación que hemos introducido.

La cantidad de Cloramina-T y el tiempo de Oxidación -- que se emplea en el procedimiento (tiempo comprendido entre la adición de la Cloramina-T y del metabisulfito) es variable para cada laboratorio. Según Yallow (325), no es conveniente que la

oxidación supere los 10 segundos; sin embargo, en nuestras condiciones experimentales en que hemos standarizado las iodaciones de FSH y LH, precisamos dos minutos para obtener una actividad específica adecuada, tiempo que coincide con el empleado -- por Ross y Midgley (325) y Donini (322), entre otros.

La actividad específica que hemos conseguido, comprendida entre 100 y 200 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$, coincide con la obtenida por Jeffcoate (326) y Aono y col (327). No se deben obtener actividades específicas más altas, ya que la diferencia entre el comportamiento inmunológico de la hormona original y el de la marcada aumentaría, disminuyendo por lo tanto su capacidad de unión al anticuerpo, tal como demostraron Greenwodd y col. (91) para GH y -- Kohler (328) para LH. Otra ventaja que ofrece el obtener actividades no excesivamente altas, aunque suficientes para que la -- sensibilidad del ensayo sea buena, es la disminución del efecto "decay catastrophe" descrito por Yallow y Berson (98), que consiste en alteraciones en las moléculas de la hormona debido a -- desintegraciones en el átomo de iodo radioactivo cuando la relación es de 2 ó más átomos por molécula.

Otro aspecto interesante que es preciso vigilar para que la iodación sea correcta es el pH. Freedlender (86) demostró que a un pH mayor de 8 pueden iodarse más grupos que la tiroxina. Para Hunter y Greenwood (90) el pH más idóneo es de 7,5

que es el que hemos utilizado en nuestras iodaciones satisfactoriamente.

El procedimiento utilizado para la separación de la hormona marcada del resto de los compuestos obtenidos en la -- iodación, varía según los diversos autores. Saxena y col. (82) y Schlaff y col. (329) utilizan Sephadex G-100 para la purificación de ^{125}I -FSH, mientras que Odell y col. (26) y Lemarchand Béraud y Gómez (330) usan Sephadex G-75 para ^{125}I -LH. También es frecuente la utilización de columnas de celulosa ((Jeffcoate (326)). Nosotros hemos preferido utilizar Sephadex G-75 para la purificación de FSH y LH inmediatamente después de su iodación, y Sephadex G-100 para su repurificación antes de añadir la hormona marcada al ensayo. De esta forma, los resultados obtenidos han sido muy buenos, como hemos podido comprobar al -- aplicar los criterios de pureza a las fracciones de hormona -- marcada más pura, elegidas por no contener más del 5% de hormona deteriorada ni de Iodo libre.

La electroforesis en papel Whatman nº 1, basada en el trabajo de Landon (331), y la precipitación con TCA (tricloroacético), son dos métodos muy rápidos para establecer la pureza de la fracción de hormona estudiada. Sin embargo, estos métodos parecen insuficientes para valorar la capacidad inmunológica de

las hormonas estudiadas y deben ser acompañados por un estudio de inmunoprecipitación, con altas concentraciones de anticuerpos específicos, tal como indica Hunter (332). Con los tres métodos citados, las fracciones hormonales de mayor pureza fueron las correspondientes al pico de purificación y repurificación de máxima radioactividad, y las adyacentes en la parte descendente de la gráfica. Estas fracciones coinciden con las utilizadas por Saxena y col (82), Greenwood y col. (91) y Sobrinho (33), entre otros autores.

Siguiendo las indicaciones de Greenwood y col. (91), hemos añadido a las columnas de Sephadex soluciones con albúmina bovina o con algún suero, para evitar en todo lo posible la adsorción de las hormonas a las paredes. Por la misma razón, la hormona marcada se recoge en tampón fosfato con albúmina bovina. En nuestra opinión, no es necesario añadir mercaptoetanol para reducir su deterioro durante su almacenamiento, como en el caso de otras hormonas, tales como ACTH, como indicó Yallow y Berson (121).

Con el fin de ahorrar tiempo y material, hemos utilizado las fracciones hormonales marcadas, (conservadas a -20°C) aproximadamente hasta un tiempo máximo aproximado de 7 semanas después de su iodación, sin obtener pérdidas considerables en

la precisión y sensibilidad de las diferentes curvas standard. En concordancia con los resultados de Yallow (325), al aumentar el tiempo de almacenamiento aumenta el iodo libre y los fragmentos producidos por el deterioro de la hormona. Estos no van a interferir en el ensayo por ser eliminados en la repurificación.

En el desarrollo del radioinmunoensayo de FSH, uno de los mayores problemas que se ha presentado ha sido la obtención de anticuerpos específicos anti-FSH. Saxena y col (82) y Odell y col. (23) obtuvieron anticuerpos de títulos muy altos, pero que presentaban reacción cruzada completa con LH, TSH y HCG. El anticuerpo anti-FSH usado en estos radioinmunoensayos, donado por NIH, no presenta interferencias con HCG, ya que en su preparación ha sido absorbido previamente con esta hormona. Sin embargo, nosotros hemos observado interferencias con TSH humana, lo que también ha sido demostrado por otros autores que trabajan con el mismo material ((García y col. (334)).

El TSH humano, en las condiciones de nuestro RIA (concentración de anti FSH 1:30.000), desplaza al ^{125}I -FSH de su unión con anti-FSH únicamente cuando se encuentra en dosis de 10 a 8 veces mayor que la presente en sujetos normales, por lo que prácticamente no es preciso tenerlo en consideración. -

Los valores normales de FSH encontrados en un suero de un sujeto tiroidectomizado (con concentraciones de TSH muy elevadas) - corroboran la poca afinidad de nuestro anti-FSH por TSH humano y nos hacen pensar que la afinidad encontrada con la muestra de TSH pueda ser debido a que ésta última presente contaminación - con residuos de FSH.

Desde que en 1.961 Wide y col (335) pusieron en marcha su radioinmunoensayo, con el que eran capaces de detectar LH en plasma, usando como anticuerpo específico anti-HCG, muchos autores, como Djian y col (336) y Reuter y col. (337), han seguido usando este anticuerpo por la facilidad de obtener HCG en estado puro. Nuestros ensayos de LH con anticuerpos anti-LH presentan reacción cruzada completa con HCG. La curva obtenida por dilución de plasma de embarazada es paralela a la conseguida con HCG como hormona standard, y en menor grado cuando la hormona - empleada es LH.

Estas reacciones cruzadas entre las diversas hormonas glicoproteicas se han explicado por la analogía de las cadenas de su estructura. Sin embargo, en el caso de LH y HCG, Jacobs y col. (338) han demostrado que la razón no es ésta, sino una analogía estructural de las moléculas completas.

Las hormonas urinarias FSH y LH preparadas por Dinini y Donini (106) desplazan la unión de FSH y LH (procedentes de extractos pituitarios y marcadas con ^{125}I) con sus anticuerpos específicos anti-FSH y anti-LH de una manera muy similar (las curvas standard son paralelas), pero en menor grado que lo hacen las hormonas standard de origen pituitario. Esto puede explicarse por la heterogeneidad existente entre hormonas de origen distinto, como ya expusieron Berson y Yallow (133), y que se manifiesta por la afinidad diferente por un mismo anticuerpo.

Veamos ahora el problema de la separación de la hormona unida al anticuerpo de la hormona marcada libre, que ha sido resuelto de muy diversas maneras, según los diferentes autores. Saxena y col (279) han utilizado la cromatoelectroforesis como técnica de separación en la valoración de FSH y LH en plasma; Catt y col (81, 108) emplearon polímeros en fase sólida para la fijación del anticuerpo en la valoración de LH, y Donini y col. (106) emplearon un método que se basa en el uso de anticuerpos polimerizados. Otros autores, como Neill y col. (339) y Sobrinho (333) absorben la hormona libre en el RIA de LH con charcol o talco.

Todos estos métodos ofrecen ventajas e inconvenientes respecto al método del segundo anticuerpo que nosotros y gran número de autores han empleado (Odell y col. (23), Midgley y col. (143), Dolais y col. (83), Franchimont y col. (66), etc.).

A pesar de las limitaciones que ofrece este último método, como son la incapacidad de detectar el grado de deterioro que producen las muestras cada una por separado y las interacciones debidas, ya por factores termolábiles presentes en el suero ((Sobrinho (333)) o por la presencia de complemento ((Midgley -- (143)), nosotros lo hemos utilizado por considerarlo el más cómodo y sencillo de realizar, así como por su empleo universal y posibilidad de comparación con otros autores.

Para la aplicación de este método de doble anticuerpo a la determinación urinaria de FSH y LH en suero, hay que tener en cuenta los siguientes puntos:

- 1º La concentración del primer anticuerpo,
- 2º La concentración del segundo anticuerpo,
- 3º El efecto de la presencia de suero en la precipitación del complejo, y
- 4º El tiempo de incubación.

Tal como indicaron Hunter y Landon (117), se debe elegir aquella concentración del primer anticuerpo que proporcione curvas standard de máxima sensibilidad y precisión. En nuestros ensayos la concentración más adecuada corresponde a 1:30.000 para FSH y un título mayor de 1:120.000 para LH.

Debido a la baja concentración utilizada de estos an-

ticuerpos, hemos añadido suero de conejo normal (NRS) en una dilución de 1:400 con el fin de aumentar la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo sin tener que aumentar la concentración del segundo anticuerpo. Algunos autores, como Faiman y Ryan (79) y Reuter y col. (337), añaden NRS asociado al segundo anticuerpo. Nosotros, al igual que Midgley y col. (143) preferimos hacerlo disuelto junto con el primero en un tampón fosfato que contiene EDTA, para así minimizar los efectos del complemento.

La concentración a que se emplea el segundo anticuerpo es muy importante, ya que, como observaron en un principio Morgan y Lazarow (340) y posteriormente Wellborn y Freiser (341), si está en defecto, la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo es incompleta y el suero de las muestras puede favorecerla y, por tanto, conducirnos a falsos resultados. Sin embargo, si están en exceso, se pueden formar complejos solubles, como comprobaron Brufeldt y Jorgensen (342), que del mismo modo que en el caso anterior, nos llevarían a erróneas interpretaciones.

En su titulación, y en las condiciones experimentales en que realizamos nuestros ensayos, hemos obtenido curvas análogas a las obtenidas por Hunter y Ganguli (117) y Reuter y col. (337) y hemos elegido la concentración que nos ha dado mayor precipitación del complejo.

Un aspecto metodológico importante que hay que considerar, es el efecto de las proteínas séricas en el RIA.

Para esto, se deben comparar las curvas standard obtenidas con la hormona disuelta en el tampon propio del ensayo y - las realizadas con la misma hormona disuelta en suero libre de gonadotrofinas (Yallow y col. (101), Wellborn y Fraser (341) y Buckle (343)).

En el RIA de FSH observamos un ligero aumento de la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo en presencia de suero de sujetos hipogonadales, aunque la diferencia no es significativa. Mediante la dilución en sueros de otras especies, como buey y caballo, se obtuvieron efectos adversos como son el "no paralelismo" de las curvas obtenidas, lo que concuerda con las observaciones de Hunter (344) y Ørskov (345) y no con la de Franchimont (66), que a veces utiliza suero de buey con resultados positivos.

Según lo que hemos visto nosotros, podemos decir que el uso de sueros humanos o de otras especies en la dilución de la hormona standard no es necesario en los radioinmunoensayos en los periodos largos de incubación, como es el nuestro. Cuando por lo contrario son muy cortos (condiciones de no-equilibrio), la utilización de estos sueros es imprescindible para obtener buenos resulta

dos, como han observado Vekemans y Robyn (346) en un RIA - de LH.

El tiempo de incubación de 3 - 4 días de duración se emplea con el fin de alcanzar el equilibrio completo de la reacción antígeno-anticuerpo, logrando así una máxima -- sensibilidad y precisión. Algunos autores, como Gitsch y - Spona (347) y Vekemans y Robyn (346) sacrifican la especificidad y sensibilidad del ensayo por una mayor rapidez en la obtención de los resultados.

La hormona marcada se añade al segundo día para - así aumentar la sensibilidad ((Rodbard y col. (348)). El - tiempo de incubación desde que se añade el segundo anticuerpo hasta la centrifugación puede ser de horas, pero la reacción completa necesita de 2 a 3 días ((Midgley (143)). -- Nosotros preferimos dejar un tiempo de 36-48 horas.

Debido a la duración del RIA (67 días), no se -- no se puede mantener las hormonas en solución a temperatura ambiente ya que, como indicaron Rodbard y col. (348) -- e Isojima y col. (349), la unión a su anticuerpo desciende rápidamente; por ello ~~ma~~ mantenemos los tubos del ensayo en la nevera a 4º C durante todo el tiempo de incubación.

Investigadores como Morgan y Lazarow(340), Zaharko - y Berk(350) encontraron que el $\bar{p}H$ óptimo para la reacción antígeno-anticuerpo estaba comprendido entre 7.0 y 8.0. Nosotros - decidimos elegir un PH de 7.4 a 7.6, con un tampón 0.01 M PBS. En un trabajo reciente, Nagata y col.(351) explican las diferentes concentraciones de hormona que a veces se encuentran en -- una misma muestra debido al cambio de $\bar{p}H$ que sufren durante su congelación ($-20^{\circ} C$); por ello, sugieren la idea de controlar - estas variaciones mediante el uso de un tampón más potente, como 0.1 M PBS. Aún cuando el resultado es más aplicable al método de separación de fase sólida que al de doble anticuerpo, lo creemos de interés para futuros experimentos.

Las curvas standard que hemos obtenido para LH tienen una sensibilidad de 0.6 mIU/ml, ligeramente superior a las de Sobrinho(333) y Boyar y col. (352), entre otros. La correspondiente a las curvas standard de FSH es de 1.25 mIU/ml, coincidiendo con la de los anteriores autores. Ambas son muy aceptables pues nos permiten apreciar concentraciones muy bajas de FSH y LH.

La transformación logit-log de las curvas sigmoideas nos dan líneas que se ajustan perfectamente a la ecuación de - rectas con un coeficiente de regresión de 0.99 y pendientes -- próximas a -2.3. Según Rodbard (146) este último valor sería -

el ideal. Esta linealización nos permite automatizar los resultados con límites de confianza del 95%.

El paralelismo que hemos observado entre las curvas standard y las obtenidas por diluciones de sueros de mujeres -menopáusicas, demuestra un comportamiento inmunológico idéntico en la muestra que se valora y la hormona standard, requisito imprescindible para considerar válido un RIA (Midley (143) y Berson y Yallow (27)).

Las reproducibilidades intra-ensayo (no superiores -al 5%) son muy inferiores a las de inter-ensayo (entre 12 y --14%). Ello puede ser debido a las variaciones incontroladas --que pueden existir entre ensayos realizados en días diferentes o por un cambio del pH de las muestras (Nagata y col. (350)), y que concuerdan con las experiencias de otros autores, como -Vekemans y Robyn (345) y Rodbard (146). Las variabilidades calculadas con diferentes sueros coinciden con las concentraciones correspondientes de los standard.

Debido a la heterogeneidad de las hormonas glico-proteicas (Berson y Yallow (130)), ha sido difícil encontrar un --standard adecuado para los sistemas de RIA en la valoración de gonadotropinas.

La hormona fría (standard) puede ser de origen pituitario, como la utilizada en el método ya discutido (LER-907), o de origen urinario (HMG: gonadotropina humana procedente de mujer menopáusica) que se utiliza en los "Kits comerciales" de los laboratorios Serono. En ambos casos, estas hormonas tienen una actividad biológica, medida por los tests de Parlow y Greep (150) que se comparan con la actividad de diversos standards de referencia del N.I.H. (National Instituto of Health).

Nosotros hemos usado como referencia para ambos métodos el 2nd IRP-HMG, por ser el más utilizado por los diferentes autores en el momento actual. Este patrón de referencia internacional consiste en un extracto urinario procedente de orina de mujer menopáusica, cuyos valores en FSH (40 UI) y LH (40 UI) -- han sido fijados en la Conferencia Internacional sobre los standards (Ginebra 1964).

No obstante, como indicaron Djian y col.(336), la mayor objeción que puede hacerse a la elección de este standard de referencia, es el comparar la actividad inmunológica de un extracto pituitario o plasmático con el de un extracto urinario, cuya estructura y degradación es mal conocida. Por esta razón, muchos autores expresan sus resultados en unidades de peso ($\mu\text{g}-\text{ml}$).

Paralelamente al método anterior, hemos evaluado FSH y LH mediante el empleo de "kits comerciales", estudiando previamente las características que ofrecen sus curvas - standard en relación con las ya descritas.

Como bien indicaron Albert y col. (354) y Banghan y Borth (355), los standard hormonales utilizados han de ser lo más similar posible a los presentes en el medio en el -- que se van a valorar; es decir, para evaluar FSH y LH en -- orina es necesario FSH y LH standards procedentes de extractos urinarios. Franchimont (356) opina que, en el caso de valorar ambas hormonas en plasma, las preparaciones proce-- dentes de pituitaria son muy satisfactorias; aunque Brunferdt y col. (342) sugieren que sería más conveniente la utilización de unos standards plasmáticos o séricos.

Los "kits comerciales" procedentes de Serono presentan el inconveniente de que los standards utilizados para - la valoración de FSH y LH en suero provienen de extractos - urinarios por lo que deberían ser básicamente utilizados para la medición de gonadotrofinas en orina.

Sin embargo, el paralelismo que ofrecen las diluciones del standard y las obtenidas con suero de alta dosis de FSH y LH prueba la validez del ensayo.

La sensibilidad de estos ensayos para FSH y LH es de 1,5m IU/ml, menor que en el método anterior, pero capaz de diferenciar valores bajos en las deficiencias gonadales. Las recuperabilidades intra-ensayo (nunca mayor del 5%) y las del inter-ensayo (14,16%), aunque ligeramente mayores que las del método de N.I.H., son muy aceptables.

En la transformación logit-log, las curvas standard se ajustan a ecuaciones de rectas, cuyas pendientes son muy próximas a -2,3 y su coeficiente de regresión de 0,99. Al igual que en el método anterior, esto nos permite la automatización de los resultados de las concentraciones de FSH y LH.

Otro punto muy interesante a tener en cuenta al realizar ensayos con los "Kits comerciales" es su contenido de hormona marcada. Debido a que la cantidad incluida en el envío es justo la indispensable, no se puede repurificar la hormona para eliminar los fragmentos hormonales de

teriorados y en el Iodo libre (325) que, sin duda, reducen la especificidad del ensayo. Por este motivo, es conveniente realizar el RIA el mismo día del envío. Si la unión inespecífica, o sea, el porcentaje de radioactividad debida a los tubos "ceros", es mayor del 5%, es posible que los resultados no sean correctos, por existir un alto grado de deterioro de la hormona.

Los periodos de incubación en que se realizan estos ensayos, son más cortos que lo que exigen las condiciones de equilibrio, manifestándose en un aumento de la unión entre -- hormona marcada y anticuerpo al aumentar el tiempo transcurrido entre la adición del primer anticuerpo y el segundo, y entre éste y la centrifugación de los tubos, tal como demuestran las experiencias de Midgley (143) y Vekeman y Robyn (345).

La disminución de la unión antígeno-anticuerpo, al aumentar el tiempo comprendido entre la adición del primer anticuerpo diluido en buffer y la hormona marcada, la interpretamos como una pérdida de capacidad inmunológica del anticuerpo en su reacción con el antígeno, quizá debido a la degradación del anticuerpo a la temperatura ambiente.

La temperatura ambiente en que se realizan estos ensayos no origina deterioro de la hormona, ya que el tiempo de incubación es corto (Isojima y col. (349).

En conclusión con nuestros resultados, podemos decir que las características analíticas del método de N.I.H. son mucho más precisas que las del método de Serono, aún cuando éste último, teniendo en cuenta sus limitaciones, puede ser de gran utilidad, fundamentalmente en los diagnósticos clínicos.

El método puesto en marcha por nosotros con el material donado por N.I.H. tiene, además, la ventaja de ser mucho más económico, permitiendo valorar simultáneamente 600 ó más - tubos con costos mínimos.

La aplicación clínica del R.I.A. de gonadotrofinas - exige, en primer lugar, establecer, con la metodología propia - de cada autor, los patrones de normalidad de LH y FSH en una - población.

La Tabla nº 26 presenta los niveles de FSH y LH en un grupo de sujetos normales, hombres y mujeres, valorados por los métodos de NIH y Serono, comparados con los resultados - de otros investigadores.

Como se puede apreciar, existen grandes discrepancias entre los diferentes valores obtenidos. Se ha pensado que estas

TABLA 26

VALORES DE FSH Y LH EN SUJETOS NORMALES OBTENIDOS POR DIVERSOS AUTORES

MUJERES

HOMBRES NORMALES		FASE FOLICULAR		FASE LUTEINICA		
FSH	LH	FSH	LH	FSH	LH	
9,5 ± 1,3	9,9 ± 1,1	17,6 ± 4,9	11,2 ± 2,4	9,6 ± 1,8	16,9 ± 3,0*	Lemarchand-Béraud and Gómez (330)
14(2-32)	17(4-42)	19 (7-27)	15(6-27)	21 (17-32)	16(7-21)	Saxena y col (279)
	4,3 ± 0,9		5,8 ± 2,4		4,5 ± 1,8	Garcia y col (334, 356)
2,6 ± 1,0	2,7 ± 0,9	2,9 ± 0,6	3,2 ± 0,5	2,5 ± 0,7	2,5 ± 0,8**	Fernández Durango (NIH)
9,9 ± 4,1	8,2 ± 4,4	4,8 ± 1,6	10,8 ± 2,6	3,4 ± 1,0	12,5 ± 3,0	Fernández Durango (Serono)
5(3-13)	4(4-7)					Faiman and Ryan (79)

* E.S.M.

** D.S.

variaciones son debidas al empleo de diferentes standards de referencia. Esto ha llevado a intentar establecer un único patrón universal, problema que aún queda por resolver.

Por otra parte, esta variabilidad de resultados no se debe únicamente a la razón antes mencionada, sino, como se comprobó en los estudios comparativos realizados por Taymor y Miyata (352), a los diferentes anticuerpos, diluciones y metodologías empleadas.

Por todas estas causas, cada laboratorio tiene que referirse a sus propios patrones de normalidad e interpretar con cuidado los datos de otros grupos de trabajo al hacer comparaciones.

Indudablemente, la secreción pulsátil de las gonadotrofinas y su ritmo nictameral puede ser también importante a la hora de interpretar los resultados, como han visto Midgley y Jaffe (252) y Vande Wiede y Ferrin (254).

No obstante, la relación LH / FSH que hemos obtenido es siempre muy próxima a la unidad, dato que coincide con los demás investigadores.

Estos patrones de normalidad nos permiten separar adecuadamente aquellos pacientes que padecen de hipogonadismo primario por lesión gonadal y los afectos de hipogonadismo secundario por enfermedad hipotálamo-hipofisaria.

En efecto, en los hombres que padecen de una disgenesia gonadal (Klinefelter, Reinfestein, etc.) las cifras de LH y FSH se encuentran muy elevadas en suero, sobre todo FSH, alterándose el cociente LH/FSH, datos que coinciden -- prácticamente en todos los investigadores (Franchimont --- (261) y Paulsen y col. (308)). De igual forma, en las disgenesias gonadales de la mujer (Síndrome de Turner) y en la menopausia hay un gran aumento de LH y, sobre todo, de FSH, con alteración de cociente LH/FSH. Ello es debido a la involución ovárica reproductiva y endocrina, con la consecuente alteración de los sistemas de "feedback" hormonal (Franchimont (66) y Millet y col. (353)).

Por el contrario, en los pacientes, hombres y mujeres que padecen de un hipogonadismo hipotálamo-hipofisario (Sheehan, Kallman, hipopituitarismo, etc.) los niveles de LH y FSH suelen ser muy bajos, a menudo indetectables, y el cociente LH/FSH se mantiene o altera según predomine la deficiencia de una gonadotropina sobre la otra (Franchimont (66), Djian y col. (336), etc.).

Otro aspecto muy interesante a comentar son los valores de LH y FSH obtenidos en un grupo de hombres estériles que padecían oligospermia o azoospermia, sin que existiera -- ninguna enfermedad endocrina asociada. En estos individuos, -- llama la atención el hecho de que las cifras de LH, y por lo -- tanto de testosterona, son normales, mientras que las correspondientes a LSH se encuentran aumentadas, resultados que con -- cuerdan con los obtenidos por Franchimont (240) y Van Thiel y col. (354).

Indudablemente, estos hallazgos, asociados con los altos niveles de FSH en las digenesias gonadales, con cifras normales y oligospermia acentuada, apoyan la hipótesis de -- que existe una sustancia química, de naturaleza polipeptídica, producida por el epitelio germinal, cuya existencia fue, pr -- meramente, establecida por McCullagh (239) y actualmente con -- firmada por Franchimont (240). Dicha sustancia regularía la síntesis y liberación de FSH por medio de un mecanismo de -- "feed-back" largo negativo.

La valoración de los niveles séricos de FSH y LH -- durante el ciclo menstrual normal de la mujer, ha sido estudiado por diversos autores (Midgley y Jaffe (252), Franchimont (66), Saxena y col. (279), Curchod y col. (355) y García y -- col. (334, 356)). Al igual que ellos, hemos observado un pico

máximo de LH en el día correspondiente a la mitad del ciclo (pico ovulatorio), que coincide con el máximo valor de FSH, y que hemos comprobado tomando como día de referencia ---- (día "cero") el de máxima concentración de LH y a la vez, - valorando simultáneamente LH y FSH a partir del día primero de la menstruación.

En conjunto, los niveles de LH y FSH durante la - fase folicular suelen ser superiores a los encontrados en - la fase lutéinica, pero estas diferencias no son significa- tivas, datos que coinciden con los de Wide y col. (357) y - Djian y col. (336). La pequeña subida de los niveles de FSH que encontramos en la primera etapa de la fase folicular, - descrita también por investigadores como Odell y col. (113) y Franchimont (66), puede interpretarse debido a un "feed-- back negativo" por la disminución de los estrógenos en la fase final del ciclo.

El mecanismo por el cual se produce el pico ovula- torio de LH y FSH no se conoce, aunque tiende a interpretar- se como debido a un efecto de "feed-back positivo" de los - estrógenos y, quizá, a algunos metabolitos de la progesterona. Sin embargo, otros tienden a considerar que es la dismi- nución del estradiol, fundamentalmente antes de la ovulación,

que por un mecanismo de "feed-back negativo" provoca el pico de LH (Millet y col. (353) y Monroe y col. (265)).

En dos mujeres estudiadas que presentaban ciclos - anovulatorios, confirmados por determinaciones de temperatura basal y pregnandiol, llama la atención la presentación -- muy tardía de los picos de LH y FSH, con una fase luteínica muy corta. Sherman y col. (358), Scott y col. (315) sugieren que la deficiencia de FSH en la fase folicular, con la subsiguiente malformación del folículo, sería la causa de la existencia de un cuerpo luteo inadecuado, demostrado por una insuficiente secreción de estrógenos.

El empleo de LH-RH como test dinámico para valorar la secreción pituitaria de gonadotropinas, ha sido posible - gracias a los trabajos básicos de Schally y col. (359). La - dosis de LH-RH empleada (de 25 μ g a 150 μ g) así como la vía de administración a utilizar, es diferente según los grupos de trabajo que se consideren (Franchimont y col. (312), Solbach y Weigelman (360)).

En nuestras experiencias se ha elegido una dosis de 100 μ gs, en un pulso rápido intravenoso, no habiéndose obtenido respuestas negativas en ninguno de los sujetos normales estudiados. Aono y col. (361), Mortimer y col. (362), González Bárcena y col (363), etc. emplean, para los tests dinámicos,

la misma dosis y vía de administración.

En los sujetos normales, la intensidad de respuesta de LH al test de LH-RH varía con la dosis empleada, como han demostrado Kastin y col. (211) y Franchimont y col. (312) y que, al igual que en nuestros resultados, consiste en un aumento significativo de los niveles de LH cuando las dosis inyectadas superan 25 μ g. Esta respuesta es máxima a los 30 minutos de haberse administrado. Dosis de 25 μ g de LH-RH, sin embargo no producen ninguna respuesta en los niveles de FSH, en tanto que dosis de 50 a 100 μ g inducen un ligero aumento, más tardío que el de LH (a los 90-120 minutos). Esta disociación de respuesta, observada por Franchimont (312), Besser y col. (364), Kastin y col. (311), entre otros, y confirmada en nuestros resultados, ha llevado a numerosas especulaciones sobre la posible existencia de una hormona liberadora de FSH, independiente de la de LH. A pesar de que la mayoría de los experimentos realizados han sido negativos, Garashi y col. (365) y Johansson y col. (366) mantienen la existencia de FSH-RH.

En dos sujetos con hipogonadismo hipogonadotrófico que hemos estudiado, obesidad hipotalámica y síndrome de Kallman, existe una respuesta aceptable al test, aunque desde luego en menor grado que en los normales. A pesar de que

Franchimont y col. (385) no han logrado obtener respuesta en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico, creemos que la causa de esta falta de respuesta sea debida a la insuficiente dosis empleada (25 μ g). Mortimer y col. (362), Roth (367), obtienen una respuesta similar a la nuestra, lo que demuestra que posiblemente la lesión fundamental en estos hipogonadinos esté localizada en el hipotálamo.

Una de las razones por la que ha sido difícil establecer, en mujeres, un patrón normal de respuesta al LH-RH, se debe a la variabilidad de resultados obtenidos según la fase del ciclo menstrual en que se ha realizado el experimento, como han demostrado Yen y col. (368) y Taymor (369). Las causas de estas diferencias se desconocen, pero quizá tengan relación con los niveles de estrógenos circulantes o con los cambios de sensibilidad hipotalámica durante el ciclo.

Un grupo de mujeres normales en fase folicular fueron estudiadas, y coincidiendo con los anteriores autores citados hemos conseguido una respuesta máxima de LH a los 30 minutos, mientras que la de FSH fue mucho menos acentuada y más tardía.

Un aspecto muy interesante que hemos comprobado, y que no creemos que nadie haya descrito hasta ahora, es una diferencia sexual en la respuesta de FSH al LH-RH, que es mucho más marcada en las mujeres. En realidad, estamos muy lejos de conocer el significado de estos hallazgos.

En un grupo de mujeres que padecían de necrosis - post-partum de la pituitaria (Síndrome de Sheehan) la respuesta al LH-RH era débil, pero indudablemente existía. A resultados similares han llegado Aono y col (361) y Coscia y col. (370), lo que demuestra que, en esta enfermedad, la destrucción de la pituitaria nunca es total y siempre quedan células productoras de LH y FSH funcionantes.

En dos pacientes estudiados que padecían de Síndrome de Turner con niveles altos de LH y FSH, existía una respuesta atenuada al LH-RH, que algunos autores intentan explicar como debido a una mayor sensibilidad de las células de la pituitaria por el déficit estrogénico (Siler y col. (371) y Lundberg y col. (372).

En el Síndrome de Cushing, debido a hiperplasia suprarrenal, es frecuente la existencia de una amenorrea. - Por esta razón decidimos valorar la respuesta al test de - LH-RH e intentar aclarar su mecanismo de producción. Curios

samente, hemos encontrado que la respuesta de LH y FSH es muy débil, lo que todavía nunca ha sido descrito. Nos planteamos la hipótesis de que en esta enfermedad, por algún motivo que desconocemos, la pituitaria es insensible al test dinámico. En este sentido, estamos trabajando para intentar esclarecer este interesante problema.

Los mecanismos por los cuales las hormonas periféricas controlan la síntesis/liberación de LH y FSH en el hombre y en la mujer, viene siendo tema de estudio desde hace ya algunos años. Indudablemente, todavía queda un largo camino por recorrer.

En nuestras experiencias, que coinciden con la mayoría de los autores (Capell y Paulsen (373) y Peterson y col. (374)), la testosterona inhibe los niveles periféricos de LH en el hombre, quizá a través de su transformación en 5 DHT o por intermedio de los estrógenos formados en su metabolismo. No hemos observado, por el contrario, que los niveles de FSH se modifiquen, aún cuando existen investigadores como Mauss y col. (375) que recientemente consideran esta posibilidad.

Con intención de conocer a qué nivel se realiza el control de la secreción de LH-FSH en un grupo de hombres normales sometidos a una infusión con dosis farmacológicas de testosterona, hemos realizado un test de LH-RH sin que hayamos encontrado diferencias significativas con la población normal. Ello favorece la hipótesis de que el hipotálamo es el receptor de los mecanismos de feedback negativo largo de la testosterona, aún cuando este problema no está ni mucho menos solucionado. Muhlen y Kobberling (376) -- han llegado a similares conclusiones.

El control de la secreción de gonadotropinas en la mujer, por las hormonas del ovario, es mucho más complejo y oscuro que en el hombre. La mayoría de los investigadores consideran que son los estrógenos, producidos por el folículo y en el cuerpo lúteo, los que básicamente regulan LH y FSH, y que el resto de la progesterona y de sus metabolitos es fundamentalmente aditivo. Franchimont (261), Botella --- (377), Cargille y col. (269) y Dhont y col. (378) han demostrado recientemente el efecto de los estrógenos varía según el momento del ciclo menstrual en que se administre, siendo básicamente inhibidores de LH y FSH en el comienzo de la fase folicular y posiblemente actuando de una forma estimulante durante el periodo peri-ovulatorio.

Como hemos comentado con anterioridad, esto puede guardar relación con cambios en la sensibilidad del "termostato hipotalámico". Hemos estudiado el efecto de la infusión de estrógenos equinos conjugados sobre los niveles de FSH y LH en mujeres normales durante la fase folicular, observándose una disminución de sus valores, más marcados con respecto a FSH. De este experimento podemos concluir que los estrógenos infundidos en la fase folicular, por un corto periodo de tiempo, provocarían una disminución en la síntesis/liberación de las gonadotropinas. Experimentos, que aún no hemos publicado, coinciden con los autores anteriormente citados, en los cuales, durante la fase folicular tardía y peri-ovulatoria, el efecto sobre LH-FSH es indudablemente positivo --- (Thompson y col. (264) y Cargille y col. (269)).

El sitio de acción de los estrógenos en el mecanismo de "Feedback" ha sido objeto de numerosos estudios, pero los resultados varían de unos autores a otros, quizá por emplear diferentes vías de administración y valorar distintas partes del ciclo menstrual (Schally y col. (379), Libertun y col.(380)).

Hemos estudiado la respuesta de LH y FSH al LH-RH en un grupo de mujeres en fase folicular, sometidas a una infusión con dosis farmacológicas de estrógenos, observando -

una anulación de respuesta, tanto para LH como para FSH. Esto, sin duda, favorece la interpretación de que, fundamentalmente, la pituitaria juega un papel importante como centro receptor del mecanismo de control gonadotrópico, a diferencia de lo que ocurre en los hombres. A similares conclusiones han llegado Franchimont y col. (312) y Gual (381). Pero además, Franchimont describe también un efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción de FSH.

Uno de los capítulos más apasionantes que existen actualmente en la Biología es el de la pubertad. Los mecanismos neuro-endocrinos que ponen en marcha la maduración sexual son complejos y no bien conocidos.

Hemos tenido la oportunidad de estudiar un grupo de niños en etapas prepuberales, comprendidos entre 7 y 13 años y en los que hemos valorado las cifras de LH y FSH.

De acuerdo con los trabajos de Winter y Taimor --- (296) y Grumbach (295), hemos observado que los niveles de ambas gonadotropinas van aumentando a medida que se acerca la pubertad. Sin embargo, los niveles de FSH alcanzan las cifras correspondientes a la edad adulta antes que los de LH,

lo que demuestra la importancia de la FSH en el crecimiento del testículo y desarrollo tubular.

La administración de 200 μ g de LH-RH en in vitro en niños prepuberales provoca una respuesta de la pituitaria que, aunque no tan marcada como en las etapas puberales, indica que la pituitaria es capaz de responder al estímulo hipotalámico y que el centro nodal, que pone en marcha la pubertad, radica básicamente en el hipotálamo, como señalan Kulin y col. (382,383).

Un aspecto muy interesante que hemos observado es una mayor respuesta de FSH durante las etapas prepuberales, al contrario de lo que ocurre en la edad adulta, donde la de LH es mayor. Ello también ha sido observado por otros -- autores como Chaussain y col. (384) y Franchimont y col. -- (385). Para este último autor, este fenómeno se explicaría por una falta de hormonas gonadales que estimulen la liberación de LH.

Por lo tanto, según el tipo de respuesta de la FSH al test de LH-RH, podemos diferenciar con facilidad una pubertad retrasada de un hipogonadismo.

La utilización del test de Clomipheno, un estrógeno débil derivado del Clortriantiseno, como test dinámico de exploración de eje hipotálamo-hipófisis gonadal, se basa en la afinidad que tiene este compuesto para desplazar a los estrógenos a nivel hipotalámico, evitando así las inhibiciones producidas por ellos (Eisenfeld y col. (386), Greenblatt col. -- (387), Harkness y col. (388) y Charro y col. 389).

Una dosis de 100 µg durante 5 días, es capaz de inducir en ambos sexos un aumento marcado de LH y en menor grado, de FSH, demostrando así, una integridad funcional del eje hipófiso-gonadal.

En los niños prepuberales, el clomifeno es incapaz de provocar una respuesta de las gonadotropinas. Según Kulin y col. (383) se debe a la enorme sensibilidad del hipotálamo al "Feedback" negativo gonadal. En el Síndrome de Kallman, -- donde la lesión está localizada en el hipotálamo, tampoco -- hay respuesta de LH y FSH. Ello también ha sido observado -- por Charro y col. (390).

En las disgenesias gonadales, tanto masculinas como femeninas, donde se encuentran muy elevados los niveles de gonadotropinas, el clomifeno, en vez de estimular, suprime,

hecho muy importante para el diagnóstico clínico diferencial. También ha sido observado por Franchimont y col. (269), entre otros.

De la combinación de los tests dinámicos con clomifeno y LH-RH, el clínico puede deducir una importante información, de gran utilidad para la localización de la lesión causante del hipogonadismo.

MMMM C MMMM H M MMM L L M MMM M MMM M M MMM M M MMM M M

METODOLOGICAS

En el desarrollo de los análisis radioinmunológicos para la evaluación de FSH y LH en suero, con el material donado por N.I.H. (National Institute of Health), hemos conseguido :

- 1º) Marcar las hormonas FSH y LH con ^{125}I obteniendo una actividad específica comprendida entre 100 y 200 uCi/ug. El grado de pureza de ^{125}I -FSH y ^{125}I -LH, estudiado por métodos electroforéticos, cromatoelectroforéticos e inmunolectroforéticos, está comprendido entre 90-95%. Este grado coincide con el criterio establecido para su utilización en el R.I.A. Estas hormonas marcadas pueden emplearse en radioinmunoensayos posteriores, durante un periodo de siete semanas, siendo necesaria su repurificación antes de su utilización en el ensayo; las diluciones en que se añaden al mismo se realizan de modo que 0,1 ml den 10.000-12.000 c.p.m.

- 2º) Estudiar la especificidad de los anticuerpos Anti-FSH y Anti-LH; el primero no presenta reacciones cruzadas con

LH ni con HCG. Sin embargo, en presencia de 40 μ U/ml o -- más de TSH presenta interferencias que no es preciso tener en cuenta, pues esta concentración es 8 ó 10 veces superior a los niveles normales de esta última en suero.

El Anti-LH no tiene reacción cruzada con TSH ni -- con FSH, pero con HCG se observa una gran interferencia, aspecto que hay que tener en cuenta cuando se valoran -- sueros de embarazada.

En la titulación de estos anticuerpos hemos obtenido una relación B/T de 30-40 % para concentraciones de 1:30.000 de Anti-FSH y 1:120.000 de Anti-LH, que son las diluciones que elegimos para los radioinmunoensayos, por proporcionarnos las curvas standard de mayor sensibilidad

3º) Curvas standard o patrón con una sensibilidad de 0,6 mIU/ml para LH y 1,2 mIU/ml para FSH. En ambos casos, la reproducibilidad intra-ensayo no excede del 5% y la inter-ensayo es del 14-15%. La recuperabilidad es siempre mayor del 90%.

En la transformación logit-log de estas curvas, -- obtenemos rectas cuyas pendientes varían entre -3,0 y -2,1, siendo su coeficiente de coeficientes de correlación superiores a 0,99, lo que automatización de los datos. Las curvas obtenidas con las diluciones de sueros de mujeres menopáusicas son siempre paralelas a las -- standard.

Para economizar tiempo, las diluciones de los patrones pueden realizarse con anterioridad al ensayo, debiendo ser conservadas a -20°C , sin que por ello se altere la sensibilidad del mismo. Estas diluciones pueden ser hechas en tampón fosfato con albúmina bovina, sin que sea preciso añadirles sueros humanos o de otras especies con bajas dosis de gonadotropinas.

Todas estas características demuestran que estas curvas reúnen las condiciones adecuadas para poderse aplicar a la valoración de FSH y LH en sueros plasmáticos.

En la evaluación del método basado en los "Kits" comerciales de Serono, hemos obtenido curvas standard con una sensibilidad de 1,25 mIU/ml para FSH y LH. La reproducibilidad intr-ensayo no excede al 5% y la inter-ensayo es 17-18%. La recuperabilidad, al igual que en el método anterior, es mayor del 90%.

Las transformaciones logit-log de estas curvas nos dan unas rectas que tienen pendientes que varían entre -3,0 y -2,2, con un coeficiente de correlación mayor de 0,99, y que son paralelas a las obtenidas con diluciones de sueros con altas dosis de gonadotropinas.

El corto tiempo de incubación con el que se realiza este método no permite a la reacción antígeno-anticuerpo llegar al equilibrio, como lo demuestra el aumento de esta unión en periodos de incubación mayores. Sin embargo, en el método anterior, con el empleo de un periodo más dilatado, este fenómeno no ocurre.

Las características de las curvas standard de este método permiten afirmar, que a pesar de estar basado en hormona standard procedentes de extractos urinarios, es válido para la medición de FSH y LH en suero.

La ventaja que ofrece el método de NIH en comparación con los "Kits" de Serono es, en primer lugar, que nos permite controlar el grado de pureza de la hormona marcada y, -- por lo tanto, obtener curvas más sensibles y precisas; en segundo lugar, el elevado costo que supone la adquisición de estos "Kit", es un punto muy interesante a tener en cuenta en los casos en que se pretenda valorar un gran número de muestras.

CLINICAS

1º) Con ambos métodos radioinmunológicos hemos definido nuestros patrones normales de FSH y LH en hombres y mujeres. Con éstos, como punto de referencia hemos podido clasificar los diferentes tipos de hipogonadismos.

Existe una excelente correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos, aunque la dispersión de resultados es mayor con el método de Serono.

El estudio de los niveles basales de FSH y LH durante el ciclo menstrual normal de la mujer, nos ha permitido la clasificación y diagnóstico de los diferentes tipos de esterilidad y ciclos anovulatorios.

2º) El LH-RH administrado i.v. (100 µg) es capaz de inducir una liberación de gonadotropinas, fundamentalmente de LH, máxima a los 15-30 minutos. En la mujer, la respuesta de FSH parece ser más acusada que en los hombres. El test dinámico de LH-RH es de gran utilidad para la diferenciación y localización etiológica de los hipogonadismos.

3º) La testosterona es capaz, en el hombre, de inhibir la secreción de LH pero en cambio no modifica la de FSH. Parece ser que sus receptores están localizados fundamentalmente

a nivel hipotalámico, puesto que ésta es incapaz de inhibir la respuesta hipofisaria al LH-RH , como se ha comprobado al inyectar 12 mg de testosterona dos horas antes del test de LH-RH.

Los estrógenos disminuyen los niveles de FSH y LH en las mujeres normales, en fase folicular. Su lugar de acción, parece estar localizado basicamente a nivel de la pituitaria, como indica el hecho de que suprimen la respuesta de ambas gonadotropinas al test de LH-RH.

4º) Las cifras de FSH y LH van aumentando paralelamente en el niño hasta el inicio de la pubertad. La FSH alcanza los niveles de la edad adulta a los 13 años, mientras que los de LH llegan a su máximo más tardíamente.

La pubertad se caracteriza por una respuesta positiva al Clomipheno y al LH-RH del igual grado que en la edad adulta; en etapas prepuberales no hay respuesta al Clomipheno, sin embargo el LH-RH induce una respuesta cuyo patrón es inverso al del adulto ya que provoca ya que la estimulación de FSH es mayor que la de LH.

5º) El Clomipheno, actuando directamente en el hipotálamo, induce una liberación de FSH y LH tanto en hombres como en mujeres normales. En los hipogonadismos secundarios (Síndrome de Kall-

man) con cifra bajas de LH y FSH, no hay respuesta positiva, lo que favorece la hipótesis de que en esta enfermedad el fallo es a nivel hipotalámico, ya que el LH-RH es capaz de aumentar la secreción de gonadotropinas.

En las disgenesias gonadales masculinas y femeninas, con cifras altas de FSH y LH, el clomifeno suprime los valores basales, mientras que el LH-RH hace aumentar los niveles de FSH y LH. Esto demuestra que la pituitaria no está implicada y funciona adecuadamente en esta enfermedad, a pesar de que está siendo estimulada al máximo por las hormonas hipotalámicas.

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa
ADN: Acido desoxiribonucleico
ARN: Acido ribonucleico
BSA: Albumina serica bovina
C-AMP: Adenosin monofosfato ciclico
CPM: Cuentas por minuto
CRH ó CRF: Hormona liberadora de corticotropina
CV: Coeficiente de variación
DHT: Dihidrotestosterona
DS: Desviación standard
EDTA: Acido etilen-diaminotetracetico
ESM: Error standard de la media
FSH: Hormona foliculo estimulante
GH: Hormona de crecimiento
GH-RF ó GH-RH: Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GIH ó GIF: Hormona inhibidora de la hormona de crecimiento
HCG: Gonadotropina corionica
HMG: Hormona gonadotropica de mujer menopausica
ICSH: Hormona estimulante de las celulas intersticiales
IRP-HMG: Patrón de referencia internacional de hormona gona-
dotropica de mujer menopausica
LH: Hormona luteotropica
LH-RF ó LH-RH: Hormona liberadora de hormona luteotropica
m-ARN: Acido ribonucleico mensajero
MIH ó MIF: Hormona inhibidora de la hormona melanotropa
MRH ó MRF: Hormona estimulante de la hormona melanotropa
MSH: Hormona melanotropa
NIH: National Institute of Health
NRS: Suero de conejo normal
PBS: Solucion de buffer fosfato
PIH ó PIF: Hormona inhibidora de la liberacion de prolactina
PRH ó PRF: Hormona liberadora de prolactina
PRL: Prolactina
RGG: Gammaglobulina de conejo
RIA: Radioinmunoensayo
RLA: Ensayo por unión a receptores
RPB: Tanto por ciento de unión
TCA: Acido tricloroacetico
TRH ó TRF: Hormona liberadora de tireotropina
TSH: Tireotropina

- 1- BEERSON, S.A., YALLOW, R.S., POST, J., WISHAM, L.H., NEWERLY, K..N., VILLAZON, M.J., and O.N.VAZQUEZ(1953): Distribution and Fate of Intravenously Administered Modified Human - Globin and its Effect on Blood Volume. Studies Utilizing I¹³¹ Tagged Globin. J.Clin.Invest. 32:22
- 2- BEERSON, S.A., YALLOW, R.S., SCHREIBER, S.S., and J.POST.(1953) Tracer Experiments with I¹³¹ Labelled Human Serum Albumin: Distribution and Degradation Studies. J.Clin.Invest 32:746.
- 3- BEERSON, S.A., YALLOW.(1954): The Distribution of I¹³¹ Labelled Human Serum Albumin Introduced into Ascitic Fluid: Analysis of The Kinetics of a Three Compartment Catenary Transfer System in Man and Speculations on Possible Sites of Degradation. J.Clin.Invest. 33:377.
- 4- MIIRSKY, I.A., PERISUTTI, G., and F.J.Dixon.(1954): Destruction of I¹³¹ Labelled Insulin by Liver Slices. Proc.Soc. Exper.Biol & Med. 86:228.
- 5- BEERSON, S.A., YALLOW, R.S., BAUMAN, A., ROTHSCHILD, M.A., and K..NEWERLY.(1956): Persistence of I¹³¹ Labelled Insulin in the Blood of Insulin. Treated Subjects. Northwest. Med. 55:541.
- 6- BEERSON, S.A., YALLOW, R.S., BAUMAN, A., ROTHSCHILD, M.A., and K..NEWERLY.(1956): Insulin I¹³¹ Metabolism in Human Subjects: Demonstration of Insulin Binding Globulin in The Circulation of Insulin Treated Subjects. J.Clin.Invest. 35:170.

- 7 -YALLOW, R.S., and S.A. BERSON.(1957): Apparent Inhibition of Liver Insulinase Activity by Serum and Serum Fraction Containing Insulin-Binding Antibody.
J.Clin.Invest.36:648.
- 8 - BERSON, S.A., and R.S.YALLOW.(1957):Studies with Insulin-Binding Antibody. Diabetes 6:402.
- 9 -BERSON, S.A., and R.S.YALOOV.(1958):Isotopic Tracers in The Study of Diabetes. Adv.Biol.Med.Phys.6:349.
- 10-BERSON, S.A., and R.S.YALLOW.(1957):Kinetics of Reaction Between Insulin and Insulin-Binding Antibody.
J.Clin.Invest. 36:873.(abst).
- 11-BERSON, S.A., abd R.S.YALLOW.(1959):Qualitative Aspects of The Reaction Between Insulin and Insulin Binding Antibody. J.Clin.Invest. 38:1996.
- 12-BERSON, S.A., and R.S. YALLOW.(1959): Species-specificity of Human Anti-Beef, Pork Insulin Serum.
J.Clin. Invest. 38:2017.
- 13-MORSE, J.H. (1959): Rapid Production and Detection of Insulin-Binding Antibodies in Rabbits and Guinea Pigs.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 101:722.
- 14-BERSON, S.A., and R.S. YALLOW: Recent Studies on Insulin Binding Antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci. 82:338.
- 15-YALLOW, R.S., and S.A. BERSON (1959): Assay of Plasma Insulin in Human subjects by Immunological Methods.
Nature (London) 184:1648.

- 16-NICOL, D.S.H.W., and L.F. SMITH (1960): Amino-Acid Sequence of Human Insulin. *Nature* (London) 187:483.
- 17-YALLOW, R.S., and S.A. BERSON (1961): Immunological Specificity of Human insulin: Applications to Immunoassay of Insulin. *J. Clin. Invest.* 40:2190.
- 18-UNGER, R.H., EISENTRAUT, A.M., McCALL, M.S., KELLER, S., LANZ, H.C., and L.L. MADISON (1959): Glucagon Antibodies and their use for Immunoassay for Glucagon. *Proc. Soc. Esp. Biol. & Med.* 102:621.
- 19-YALLOW, R.S., and S.A. BERSON (1970): In: Mc Arthur J.W. and T. Colton (eds). *Statistics in Endocrinology*, MIT Press, Cambridge. P. 327.
- 20-YALLOW, R.S., and S.A. BERSON (1968): General Principles of Radioimmunoassay. In: R.L. Hays, F.A. Boswitz, and B.E.P. Murphy (eds.). *Radioisotopes in Medicine. In Vitro Studies*, pp.7-41. OAR Ridge, Tenn. Atomic Energy Commission.
- 21-SCATCHARD, G. (1949): The Attraction of Protein for small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 51:660.
- 22-EKINS, K.P., and G.B. NEWMAN (1970): In: Piczfalusy, E. (ed.) *Steroid Assay by Protein Binding*. 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Stockholm. P.11.
- 23-ODELL, W.P., ROSS, G.T., and P.L. RAYFORD (1967): Radioimmunoassay for Luteneizing Hormone in Human on Serum: Physiological Studies. *J. Clin. Invest.* 46:248.
- 24-BLISS, C.T. (1952): *The Statistics of Bioassay Vitamin Methods*, Vol. II. N.Y. Acad. Press Inc.

- 25-FINNEY, D.J. (1964): Statistical Method in Biological Assay. Ed. Charles Griffin and Co., Ltd., London.
- 26-RODBARD, D., RAYFORD, P.L., COOPER, J.A., and G.T. Ross (1968): Statistical Quality Control of Radioimmunoassays. J.Clin. Endocrinol. Metab. 28:1412.
- 27-YALLOW, R.S., and S.A. BERSON (1971): Introduction and General Considerations. In: Odell, W.D., and W.H. Daughaday (eds). Principles of Competitive Protein Binding Assays. Lippincott Co., Philadelphia. Toronto. P. 6
- 28-RODBARD, D. (1973): Theory of Hormone-Receptor Interaction III. The Endocrine Target Cell as a quantal Response Unit: A General Control Mechanism. In: O'Malley, B.W., and A.R. Means (eds). Receptor for Reproductive Hormones. Plenum Press N.Y.-London. P. 342.
- 29-DUBOS, R.J. (1950): In: Louis Pasteur, free Lance of Science. Litle, Boston.
- 30-MIESCHER, P.A., and GRABAR, P. (1968): Complement: In: Immunopathology. Vol 5. Basel. Schawabe.
- 31-MERCHNIKOFF., E. (1901): L'Immunité dans les maladies Infectieuses. Masson, Paris.
- 32-COLEBROOK, L.(1954): In: Almroth Wright. Arnold. London.
- 33-HUMPHREY, J.H., and R.G. WHITE (1964): The Production of Antibody. In: Immunology for Students of Medicine. Blackwell Scientific Publications. Oxford. P.110.

- 34-CLAMAN, H.N., CHAPERON and R.F. TRIPPLET (1966): Immunocompetence of Transferred Thymus-Marrow Cell Combinations. *J. Immunol* 97:828.
- 35-MILLER, J.F.A.P. and G.E. MITCHELL (1968): Cell to Cell interaction in the Immune Response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 128:801.
- 36-PARKER, C.W., and J.P. VAVRA (1969). *Prog. Hemat* 6:1.
- 37-ROITT, J.M., GREAVES, M.F., TORRIGIANI, G., BROSTOFF, J., and PLAYFAIR, J.H.L. (1969): The Cellular basis of Immunological Responses. *Lancet* 2. 367.
- 38-SINGHOL, S.R., and RITCHTER (1968): Cells Involved in the Immune Response IV. The Response of Normal Rabbit Bone Marrow and Lymphoid Tissue Lymphocytes to Antigens in Vitro. *J. Expt. Med.* 128:1099.
- 39-FELDMAN, M., and BASTON A. (1972): Cell Interactions in the Immune Response in Vitro. *J. Exp. Med.* 136:722.
- 40-NOSSAL, G.J.V. (1967): In: Mechanism of Antibody Production. *A. Rev. Med.* 18; 81-94.
- 41-YOFFEY, J.M., (1962): The Present Status of The Lymphocyte Problem. *Lancet.* i, 206.
- 42-HUMPHREY, J.H. and R.G. WHITE (1964): Antigens. In: *Immunology for Students of Medicine.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. p. 169.

- 43-ISHIZAKA, T., CAMPBELL, D.H., and R. ISHIZAKA (1960):
Internal Antigenic Determinants in Protein Molecules.
Proc. Soc. Ex. Biol. Med. 103: 5.
- 44-NISONAFF, A. (1967): Conjugated and Synthetic Antigens.
In: Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. I Ed.
C.A. Williams & M.W. Chase. New York. Academic Press.
p. 120.
- 45-RALAT, E.A., and A.E. BEZER (1958): The Effect of Variation
in Molecular Weight on the Antigenicity of Dextran in man.
Arch. Biochem. Biophys 78:306.
- 46-BOYD, G.W., ADAMSON, A.R., FITZ, A.E., and W.S. PEART
(1969): Radioimmunoassay determination of plasma-renin
activity. Lancet 1:213.
- 47-PRESS, E.M., and R.R. PORTER (1962): Isolation and Charac-
terization of Fragments of Human Serum Albumin Containing
some of the Antigenic Sites of the whole molecule. Biochem
J. 83:172.
- 48-EISEN, H.N. (1959): In: Lawrence, H.S. (ed.). Cellular and
Humoral Aspects of the Hypersensitivity States Hueber,
New York. P. 89.
- 49-PARKER, C.W. (1965): Immunochemical Mechanism in Penicillin
Allergy. Fedd, Proc, 24:51.
- 50-ODELL, W.D., and W.H. DAUGHADAY (1971): Nature of Immuno-
logical Responses and Antigen-Antibody Interaction. In:
Odell, W.D. and W.H. Daughaday (eds). Principles of Competi-
tive Protein-Binding Assays. P. 31.

- 51-SPETOR, S., and C.W. PARKER (1970): Morphine: Radioimmunoassay. Science 168:1347.
- 52-PARKER, C.W. and M.J. HALLORAN (1968): In: Plescia O.J. and W. Braun (eds). Nucleic Acids in Immunology. Springer-Verlag, New York, p. 18.
- 53-PARKER, C.W., THIEL, J.A., and S. MITCHELL (1965): The Immunogenicity of Hapten-Polylysine Conjugates. J. Immunol 94:289.
- 54-JAFFE, B.M., NEWTON W.T., and J.E. MCGUIGAN (1970): The Effect of Carriers on the Production of Antibodies to the Gastrin Tetrapeptide. Immunochemistry 7:715.
- 55- HURN, B.A.L. and J. LANDON (1970): Antisera for Radioimmunoassay. In: Kirkham, R.E., and W.M. Hunter (eds). Radioimmunoassay Methods. Churchill Livingstone. Edimburgh. P. 129.
- 56-HUMPHREY, J.H., and R.G. WHITE (1964): Antibodies and Complement. In: Immunology for Students of Medicine. Backwell Scientific Publications. Oxford. P. 78.
- 57-COHEN, S., and R.R. PORTEZ (1964): Structure and Biological Activity of Immunoglobulins. Adv. Immunol. 4:287.
- 58-EDELMAN, G.M., and W.E. GALL (1969): The Antibody Problem. Ann. Rev. Biochem. 38:415.
- 59-PRESSMAN, D. (1965): The Nature of Antigen and Antibody Combining Regions. In: Samter Max. (ed). Immunological Diseases. Boston, Little Brown & Co. Pag. 11.

- 60-ARQUILLA, E.R. and J. FINN (1965): Genetic Control of Combining Sites of Insulin Antibodies Produced by Guinea Pigs. *J. Exp. Med.* 122:771.
- 61-BRYANT, G.D. and F.C. GREENWOOD (1973): Radioimmunoassay of Prolactin. In: Berson S.A. and R.S. Yalow (eds.). *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology*. North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- 62-BOYD, G.W. and W.S. PEART (1968): The Production of High Titre Antibody Against Free Angiotensin II. *Lancet* 2:129.
- 63-VAITUKAITIS, J., ROLLING, J.B., NIESCHCHLAG, E. and G.J. ROSS (1971): A Method for Producing Specific Antisera with Small Dosis of Immunogen. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 33:988.
- 64-PLAYFAIR, J.H.L., HURN, B.A.L. and D. SCHULSTER (1974): Production of Antibodies and Binding Reagents. *British Medical Bulletin*. Volume 30 n^o 1, January 1974. p. 24.
- 65-ODELL, W.D., ABRAHAM, G., RAUD, H.R., SWERDLOFF, R.S. and D.A. FISHER (1969): Influence of Immunization Procedures on the Titer. Affinity and Specificity of Antisera to Glycopolypeptides. In: Diczfalussy, E. (ed.). *Immunoassay of Gonadotropins*. First Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Stockholm, p. 54.
- 66-FRANCHIMONT, P. (1973): In: Berson S.A. and R.S. Yalow (eds.). *Peptide Hormones Methods in Investigative Diagnostic Endocrinology*. Vol. 2A. Mount Sinai School of Medicine. N.Y. p. 518.

- 67-ODELL, W.D., ABRAHAM, G.A., SKOWSKY, W.R., HESCOX, M.A. and D.A. FISHER (1971): Production of Antisera for Radioimmunoassay. In: Odell, W.D., and W.H. Daughaday (eds.). Principles of Competitive Protein Binding Assays. J.B. Lippincott Co. Philadelphia and Toronto, p. 58.
- 68-HABER, E., RICHARDS, F.F., SPRAGG, J., AUSTEN, R.F., VALLOTTON, M.B. and L.B. PAGE (1967): Modification in Heterogeneity of the Antibody Response. Cold. Spr. Harb. Sym. Quant. Biol. 32:299.
- 69-ODELL, W.D., CHARTERS, C., DADIDSON, W.D. and J.C. THOMPSON (1968): Radioimmunoassay for Human Gastrin Using Unconjugated Gastrin as an Antigen. J.Clin.Endocr. Metab. 28:1840.
- 70-BOYD, G.W., LANDON, J. and W.S. PEART (1967): Radioimmunoassay for Determining Plasma Levels of Angiotensin-II in Man. Lancet II:1002.
- 71-BERSON, S.A. and R.S. YALLOW (1964): In: Pincus G., Thirrmann, K.V. and E.B. Astwood (eds.). Immunoassay of Protein Hormones. The Hormones. Vol. IV. Academic Press, N.Y., p. 557.
- 72-GREENWOOD, F.C. (1969): The Radioimmunoassay of Peptide Hormones. Br. J. Hosp. Med. 2:764.
- 73-HURN, B.A.L. and J. LANDON (1970): In: Rirkham, R.E. and W.M. Hunter (eds.). Radioimmunoassay Method. Churchill Livingstone. Edimburh. p. 137.
- 74-PRESSMAN, D. and A.L. GROSSBERG (1968): The Structural Basis of Antibody Specificity. W.A. Benajamin. N.Y.

- 75-E.D. DAY (1966): Foundations of Immunochemistry. William and Wilkins. Baltimore.
- 76-ODELL, W.D., WIBBER, J.F. and W.E. PAUL (1967): Studies of Thyrotropin Physiology by Means of Radioimmunoassay. Recent. Prog. Horm. Res. 23:47.
- 77-RAUD, H.R. and W.D. ODELL (1969): The Radioimmunoassay of Human Thyrotropin. Brit. J. Hosp. Med. 2:1366.
- 78-ODELL, W.D., REICHERT, L.E. and R.W. BATES (1969): In: M. Margoulies (ed.). Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Medica. Amsterdam, p. 124.
- 79-FAIMAN, C. and R. RYAN (1967) Radioimmunoassay for Human Follicle Stimulating Hormone. J. Clin. Endocr. Metab. 27:444.
- 80-FRACHIMONT, P. (1970): A Study of Cross Reaction Between Human Chorionic and Pituitary Luteinizing Hormones (HCG and HLH). European J. Clin. Invest. 1:65.
- 81-CATT, R.J., NIALL, H.D., TREGGAR, G.W. and H. BURGER (1968): Disc Solid-Phase Radioimmunoassay of Human Luteinizing Hormone. J. Clin. Endocr. Metab. 28:121.
- 82-SAXENA, B.B., DEMURA, H., GANDY, H.M. and R.E. PETERSON (1968): Radioimmunoassay of Human Follicle Stimulating and Luteinizing Hormones in Plasma. J. Clin. Endocr. Metab. 28:519.
- 83-DOLAIS, J., FREYCHET, P. and G. ROSSELIN (1973): Dosage plasmatique de l'hormone luteinisante humaine (HLH) par méthode radioimmunologique: mise au point de la technique de dosage. Compt. Rend. 267.

- 84-HUGHES, W.J. and R. STRAESSLE (1966): The Chemical Requirements of a Satisfactory Label for Proteins. In: Donato, L, Miehaud, G. and J. Sirchis (eds.). Labelled Proteins in Tracers Studies Conference In Pisa. Brussels. Euratom 2950. p. 3.
- 85-W.J. HUGHES (1957): The Chemistry of Iodination. Ann. N.Y. Acad. Sc. 70:1.
- 86-FREEDLENDER, A.E. (1969): In: Margoulies, M. (ed.). Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Medica. In. Cong. Ser. 161. Amsterdam, p. 351.
- 87-Mc FARLANE, A.S. (1958): Efficient Trace Labelling of Protein with Iodine. Nature, London 182:53.
- 88-SAMOLS, E. and WILLIAMS, H.S. (1961): Trace Labelling of Insulin with Iodine. Nature, London 190:1211.
- 89-ROSA, U., SCASSELLATI, G.A., PENNSIS, F., RICCIONI, N., GIANONI, P. and R. GIORDANI (1964): Labelling of Human Fibrinogen with ^{131}I by Electrolytic Iodination. Biochem. Biophys. Acta 86: 519.
- 90-HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C. (1962): Preparation of ^{131}I Labelled Growth Hormone of High Specific Activity. Nature, London, 194:495.
- 91-GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. and J.S. CLOVER (1972): The Preparation of ^{131}I Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. Biochem. J. 89:114.
- 92-A.S. KESTON (1964): J. Biol. Chem. 153:335.

- 93-MARCHALONIS, J.J. (1969): An Enzymic Method for the Trace Iodination of Immunoglobulins and Other Proteins. *Biochem. J.* 113:299.
- 94-MORRISON, M., BAYSE, G.S. and R.G. WEBSTER (1971): Use of Lactoperoxidase Catalyzed Iodination in Immuno-Chemical Studies. *Immunochemistry*, 8:289.
- 95-SAXENA, B.B., HASAN, S.H., HAOUR, F. and M. SCHMIDT-GOLLWITZER (1970): Radioceptor Assay of Human Chorionic Gonadotropin: Detection of Early Pregnancy. *Science* 184:793.
- 96-BALTON, A.E. and W.H. HUNTER (1972): New Method for Labelling Protein Hormones with Radioiodine. *J. Endocrinal* 55, XXX-XXI (abstract).
- 97-BERSON, S.A. and R.S. YALLOW (1966): Iodoinsulin Used To Determinate Specific Activity of Iodine. *Science* 152:205.
- 98-YALLOW, R.S. and S.A. BERSON (1969): Topics on Radio-immunoassay of Peptide Hormones. In: Margoulies, M. (ed.) *Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Medica Foundation. Amsterdam, p. 36.*
- 99-BERSON, S.A. and R.S. YALLOW (1968): Radioimmunoassay of ACTH in Plasma. *J. Clin. Invest.* 47:2725.
- 100-YALLOW, R.S. and S. A. BERSON (1960): Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J.Clin.Invest.* 39:1157.
- 101-YALLOW R.S. (1969): Incubation Damage. In: Margoulies (ed) *Protein and Polypeptide Hormones. Excerpta Med. Foundation Amsterdam, p. 624.*
- 102-GLICK, S.M., WHEELER, M., RAGAN, A. and P. KUMARESAY (1968): Radioimmunoassay of Oxytocin. In: Back, N. and L. Martini (eds.). *Proceeding of International Symposium on the Pharmacology of Hormonal Polypeptides.*

- 103-LAU, R.S., FOTTLIEB, C.W. and W. HERBERT (1966): Preliminary Report on Coated Charwal Immunoassay of Human Chorionic Growth Hormone Prolactin and Growth Hormone. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123:126.
- 104-ROSSELIN, G., ASSAN; YALLOW, R.S. and S.A. BERSON (1966): Separation of Antibody-Bound and Unbound Peptide Hormones Labelled with Iodine-131 by Talcum Powder and Precipitated Silica. Nature London 212:355.
- 105-ADDISON, G.M. and C.N. HALER (1970): The Immunoradiometric Assay. In: Kikbean, K.E. and W.M. Hunter (eds.). Radioimmunoassay Methods. Livingstone Ediburgh and London.
- 106-DONINI, S. and P. Donini (1969): Radioimmunoassay Employing Palymerized Antisera. Acta Endocrinal (RBH) (Suppl.) 142:257.
- 107-COLT, E.W.D., MILES, L.E.M., BECKER, D.L. and N.J. SHAH (1971): A Sensitive New Immunoassay for Calcitonin Employing Labelled Antibody. J.Clin.Endocr.Metab. 32:285.
- 108-CATT, R J. and G.W. TREGGAR (1967): Solid Phase Radioimmunoassay in Antibody Coated Tuber. Science 158:1570.
- 109-GOODFRIEND, T.L., BULL, D.L. and D.B. FARLEY (1968): Radioimmunoassay of Angiotensin. J.Lab.Clin.Med. 72:648.
- 110-WIDE, L. and J. PORATH (1966): Radioimmunoassay of Protein with the Use of Shephadex Coupled Antibodies. Biochem. Biophys. Acta 130:257.

- 111-GENUTH, S., FOCHMAN, L.A. and H.E. LEBOVITZ (1965): A Radioimmunoassay Method for Insulin Using Insulin ^{125}I and Gel Filtration. *J.Clin.Endocr.Metab.* 25:1043.
- 112-GRODSKY, G.M. and P.H. FORSHAM (1960): An Immunochemical Assay of Total Extractable Insulin in Man. *J. Clin. Invest.* 39:1070.
- 113-ODELL, W.D., WILBER, J.F. and W.E. PAUL (1965): Radioimmunoassay in Human Serum. *J. Clin.End. Metab.* 25:1179.
- 114-BURR, I.M., GRANT, D.B., SIZONENKO, P.C., KAPLAN, S.L. and M.M. GRUMBACH (1969): Some Critical Factors in Double Antibody Radioimmunoassay Systems Utilizing Sheep Anti-Rabbit Precipitating Sera for Measurement of Human Serum LH, FSH, HGH. *J.Clin. Endocr. Metab.* 29:948.
- 115-MIDGLEY, A.R., REBAR, R.W. and G.D. MISWENDER (1969): Radioimmunoassays Employing Double Antibody Techniques. In: E. Diczfalussy (ed.). *Immunoassay of Gonadotropins. Karolinska Symposia. Stockholm.*
- 116-DAUGHADAY, W.H. and L.S. JACOBS (1971): Methods of Separating Antibody Bound from Free Antigen. In: Odell, W.D. and W.H. Daughaday (eds.). *Principles of Competitive Binding Assays. J.B. Lippincott Co. Philadelphia and Toronto. p. 309.*
- 117-HUNTER, W.M. and P.C. GANGULI (1970): The Separation of Antibody Bound from Free Antigen. In: Kirkham, R.E. and W.M. Hunter (eds.). *Radioimmunoassay Methods. Livingstone Edimburgh and London. p. 243.*
- 118-PAPKOFF, H.(1973): Methods of Extraction and Purification of Peptides Hormones. In: Berson, S.A. and R.S. Yalow (eds.). *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology. Vol. 2A. North Holland Publishing Company. Amsterdam.*

- 119-COCH, J.A., PROVETTO, J., CABOT, H.M., FIELITZ, C.A. and R. CALDEYRO-BARCIA (1965): Oxytocin Equivalent Activity in the Plasma of Women in Labor and During Puerperium. Am. J. Obstet. Gynecol. 91:10.
- 120-PARROT, D.M.V. (1955): The Assay of Adrenocorticotrophic Activity in Plasma Extracts. J. Endocrinol. 12:120.
- 121-YALLOW, R.S., PLICK, S.M., ROTH, J. and S.A. BRESON (1964): Radioimmunoassay of Human Plasma ACTH. J. Clin. Endocrinol. 24:1219.
- 122-DEMURA, H., WEST, C.D., NUGENT, C.A., NAGAMURA, K. and F.H. TYLER (1966): A Sensitive Radioimmunoassay for Plasma ACTH Levels. J. Clin. Endocrinol. 26:1297.
- 123-APOSTOLAKIS, M. (1959): Detection and Estimation of Pituitary Gonadotropins in Human Plasma. J. Endocrinol. 19:377.
- 124-KELLER, D.J. and E. ROSEMBERG (1965): Estimation of Pituitary Gonadotropins in Human Plasma. J. Clin. Endocrinol. 25:1050.
- 125-COCH, J.A., FIELITZ, C.A., PROVETTO, A., CODA, H. and A. FRAGA (1968): Isolation and Estimation of Oxytocin from the Blood of Puerperal Women During Sucking. J. Endocrinol. 40:137.
- 126-YAMASHIRO, D. (1964): Partition Chromatography of Oxytocin on Sephadex. Nature 201:76.
- 127-GRAIG; L.C., HARFENIST, E.J. and A.C. PALADINI (1964): Dialysis Studies, Behaviour of Angiotensin, Oxytocin, Vasopresin of Some of Theirs Analogues. Biochem. 3:764.

- 128-ARAKAWA, K., NAKATAKI, M., MINOHARA, A. and M. NAKAMURA
(1967): Isolation and Aminoacid Composition of Human
Angiotensin I. Biochem. J. 104:900.
- 129-HERBERT, V., LAU, S.S., GOTTLIED, C.W., and S.J. BLEICHER
(1965): Coated Charcoal Immunoassay of Insulin. J. Clin.
Endocrinol 25:1375.
- 130-YALLOW, R.S. and BERSON S.A. (1971): Problems of
Validation of Radioimmunoassay. In: Odell, W.D. and
Daughaday (eds.). Principles of Competitive Assay. P.374.
- 131-YALLOW, R.S., ROTH, J., FLICK, S.M. and S.A. BERSON
(1965): Proceeding of 2nd International Congress of
Endocrinology. Part. 1. Excerpta Medica Foundation.P.292.
- 132-HEENDENSON, J.R. (1970): Serum Insulin or Plasma Insulin?
Lancet 2:545.
- 133-BERSON, S.A. and R.S. YALLOW (1968): The Harvey Lecturer,
Series 62. Academic Press. New York. P. 107.
- 134-YALLOW, R.S. and S.A. BERSON (1970): Size and Charge Dis-
tinctions Between Endogenous Human Plasma Gastrin in Peri-
pheral Blood and Heptadecapeptide Gastrin. Gastroenterol.
58:1.
- 135-BERSON; S.A. and R.S. YALLOW (1968): Immunochemical
Heterogeneity of Parathyroid Hormone in Plasma. J.
Clin. Endocrinol Metab. 28:1037.
- 136-YALLOW, R.S. and S.A. BERSON (1970): In: Camerini-Pavalos
and H.S. Cole (eds). Early Diabetes. Supplement. Advance in
Metabolic Disorders. Academic Press. New York. Pag. 95.

- 137-GREGORY, R.A. and H.J. TRACY (1964): The Constitution and Properties of Two Gastrins Extracted from Hog Antral Mucosa. *Gut*. 5:103.
- 138-FELDMAN, H. and D. RODBARD (1971): Mathematical Theory of Radioimmunoassay. In: Odell, W.D., and W.H. Daughaday (eds.) Principles of Competitive Protein Binding Assays. J.B. Lippincott Company. Philadelphia and Toronto. P. 158.
- 139-BAULIEU, E.E. and J.P. RAYNAUD (1970): A "Proportion Graph" Method for Measuring Binding Systems. *Eur. J. Biochem.* 13:293.
- 140-BORTH, R. (1970): In discussion, p. 11. In: Diczfalusy, E. (ed.). Steroid Assay by Protein Binding, 2nd Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Stockholm.
- 141-GADDUM, J.H. (1933): Reports on Biological Standards. III Methods of Biological Assay Depending on a Quantal Response. Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. 183, London.
- 142-HUNTER W.M., and F.C. GREENWOOD (1964): A Radio-immuno-electrophoretic Assay for Human Growth Hormone *Biochem. J.* 91:43.
- 143-MIDGLEY, A.R., NISWENDER, G.D. and R.W. RELAR (1969): Diczfalusy, E. (ed.). Immunoassay of Gonadotropins. First Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Stockholm. P. 247.

- 144-RYAN, R.J. (1.969): A Comparison of Biological and Immunologic Potency Estimates of Human Luteinizing (LH) and Follicle Stimulating (FSH) Hormones. In: Diczfalussy, E. (ed.). First Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology, Bogtrykkeriet Forum. Copenhagen, p. 300.
- 145-BLISS, C.L. (1970): Proceedings of the Workshop Conference on Statistics in Endocrinology Dedham, Mass. Cambridge, Massachusetts Institute of Technology Press. In: Mc Arthur J.W. and T. Colton (eds.) Statistics in Endocrinology. p. 341.
- 146-RODBARD, D. (1974): Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. Clin. Chem. 20/10: 1255.
- 147-RODBARD, D. and J.E. LEWALD (1970): Computer Analysis of Radioligand and Radioimmunoassay Data. Acta Endocrinol. (Copenhagen) 64, Suppl. 147:79.
- 148-STEDMAN, S.L. and F.M. PAHLEY (1953): Assay of the Follicle Stimulating Hormone Based on the Augmentation with Human Chorionic Gonadotropins. Endocrinology 53:604.
- 149-PARLOW, A.F. (1961): In: Albert, A.(ed.). Human Pituitary Gonadotropins. C.C.Thomas. Springfield Illinois, p. 301.
- 150-GREEP, R.O., VAN DIKY and B.F. CHUW (1941): Use of Anterior Lobe of Prostate Gland in Assay of Metakendrin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46:644.
- 151-REICHERT, L.E. and A.R. MIDGLEY (1968): In: Rosenberg, E. (ed.) Gonadotropins. Geron-X Inc. Los Altos. California, p.25
- 152-ODELL, W.D. and G.T. ROSS (1971): Correlations of Bioassay and Immunoassay Potencies for FSH, LH, TSH and HCG. In: Odell, W.D. and W.H. Daughaday (eds.) Principles of Competitive Protein Binding Assays. Philadelphia and Toronto J.B. Lippincott Co. p. 401.

- 153-LEAF, A. and C.H. COGGINS (1974): The Neurohypophysis. In: R.H. Williams (ed.). Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co. Philadelphia.London.Toronto. p. 80.
- 154-DAUGHADAY, W.H. (1974): The Adenohypophysis. In: R.H. Williams (ed.). Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co. Philadelphia.London.Toronto. p. 31.
- 155-FARGUHAR, M.G. and J.F. RINEHART (1954): Electron Microscopic Studies on the Anterior Pituitary Gland of Contrast Rats. Endocrinology. 54:516.
- 156-RENNELS, C.G. (1962): An Electron Microscope Study of Pituitary Autograft Cells in the Rat. Endocrinology 71:713.
- 157-PIERCE, J.G. (1973): General Chemistry and Characterization of Glycoproteins of the Pituitary. In: Berson S.A. and R.S. Yallow (eds.). Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology (Vol. 2A) North-Holland Publishing Company. Amsterdam, p. 43.
- 158-REICHERT, L.E. (1973): Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH). In: Berson, S.A. and R.S. Yallow (eds.). Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology. Vol 2A. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, p. 509.
- 159-PAPKOFF, H. and M. EKBLAD (1970): Ovine Follicle Stimulating Hormone: Preparation and Characterization of its Subunits. Biochem. Biophys. Res Commun. 40:614.

- 160-PIERCE, J.G., BAHL, O.P., CARNELL, J.S. and N. SWAMINATHAN (1970): Biologically Active Hormones Prepared by Recombination of the Chain of Human Chorionic Gonadotropin and the Hormone-Specific Chain of Bovine Thyrotropin or of Bovine Luteinizing Hormone. *J.Biol.Chem.* 246:2321.
- 161-STOCKELL-HARTREE, A.M., THOMAS, A.M., BRAIKEVITCH, M., BELL, E.T., CHIRSTIE; D.W., SPAULI, G.V., TAYLON, R. and J.G. PIERRE (1971): Preparation and Properties of Subunits of Human Luteinizing Hormone. *J. Endocrinol*, 51:169.
- 162-HOWARD, S.M. and J.G. PIERRE (1969): The Tryptic Glycopeptides of Bovine Tyrotropin. Their Comparison and Similarities to Those of Luteinizing Hormone. *J. Biol. Chem.* 244:6468.
- 163-PAPKOFF, H.M., SAIRAM, M.R. and C.H. LI (1971): Amino Acid Sequences of the Subunits of Ovine Interstitial Cell Stimulating Hormone. *J. Amer. Chem. Soc.* 93:1531.
- 164-WILHELMI, A.E. (1961): *Can. J. Biochem.* 39:1659.
- 165-PARLOW, A.F., WILHELMI, A.E. and L.E. REICHERT, Jr. (1965): Further Studies on the Fractionation of Human Pituitary Glands. *Endocrinology*, 77:1126.
- 166-HARTREE, A.S. (1966): Separation and Partial Purification of the Protein Hormones Found in Human Pituitary Glands. *Biochem. J.* 100:754.
- 167-REICHERT, L.E. Jr. and A.F. PARLOW (1964): Partial Purification and Separation of Human Pituitary Gonadotropins. *Endocrinology*, 74:236.

- 168-RATHMAN, P. and B.B. SAXENA (1970): Isolation and Physicochemical Characterization of Luteinizing Hormone from Human Pituitary Glands. *J. Biol. Chem.* 245:3725.
- 169-REICHERT, L.E. Jr., KATHAN, R.H. and R.J. RYAN (1968): *Endocrinology* 82:109.
- 170-BELL, J.J., CANFIELD, R.E. and J.J. SCIARRA (1969): Purification and Characterization of Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinology* 84:298.
- 171-BRAUNSTEIN, G.D., REICHERT, L.E. Jr., VAN HALL, E.V., VAITUKAITIS, J.L. and G.T. ROSS (1971): The Effects of Desialylation on the Biologic and Immunologic Activity of Human Pituitary Luteinizing Hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42:962.
- 172-RATHMAN, P. and B.B. SAXENA (1971): Subunits of Luteinizing Hormone from Human Pituitary Glands. *J. Biol. Chem.* 246:7087.
- 173-REICHERT, L.E. Jr., RASCO, M.A., WARD, D.N., MISWENDER, G.D. and MIDGLEY A.R. Jr. (1971): Isolation and Properties of Subunits of Bovine Pituitary Luteinizing Hormone. *J. Biol. Chem.* 244:5110.
- 174-SAIRAM, M.R., PAPKOFF, H. and C.H. LI (1972): The Primary Structure of Ovine Interstitial Cell-Stimulating Hormone. I. The α -Subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 153:554.
- 175-SAIRAM, M.R., SAMY, T.S.A., PAPKOFF, H. and C.H. LI (1972): The Primary structure of Ovine Interstitial Cell-Stimulating Hormone. II. The β -Subunit *Arch. Biochem. Biophys.* 153:572.

- 176-CHUNG; D. SAIRAM, M.R. and C.H. LI (1973): The Primary Structure of Ovine Interstitial Cell-Stimulating Hormone III: Disulfide Bridge of the α -Subunit. Arch. Biochem. Biophys. 159:678.
- 177-SHERWOOD, O.D., GRIMEK, H.J. and W.H. Mc SHAN (1970): Purification of Luteinizing Hormone from Sheep Pituitary Glands and Evidence for Several Physicochemically Distinguishable Active Compounds. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 221:87.
- 178-ROSS, D. (1967): Human Follicle-Stimulating Hormone. Almquist and Wiksells AR. Uppsala.
- 179-PECKHAM, W.D. and A.F. PARLOW (1969): ON the Isolation of Human Pituitary Follicle-Stimulating Hormone. Endocrinol. 84:953.
- 180-REICHERT, L.E. Jr. (1971): Electrophoretic Properties of Pituitary Gonadotropins as Studied by Electrofocusing . Endocrinology, 88:1029.
- 181-REICHERT, L.E. Jr. (1967): Selective Inactivation of the Luteinizing Hormone Containant in Human Pituitary Follicle Stimulation Hormone Preparations by Digestion with α -Chymotrypsin. J. Clin. Endocrinol. 27:1065.
- 182-SAXENA, B.B. and RATHMAN, R. (1971): Dissociation Phenomenon and Subunit Nature of Follicle-Stimulating Hormone from Human Pituitary Glands. J. Biol. Chem. 246:3549.
- 183-SHOME, B. and A.F. PARLOW (1974): Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH): First Proposal for the Amino-Acid Sequence of the α -Subunit of Human Luteinizing Hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:199.

- 184-SHOME, B., and A.F. PARLOW (1974): Human Follicle Stimulating Hormone: First Proposal for the Amino-Acid Sequence of the Hormone-Specific, B-subunit (hFSHB), J. Clin. Endocrinal Metab. 39:203.
- 185-MARTINI, L. and M. MOTTA (1970): (eds.) The Hypothalamus. New York. Academic Press.
- 186-HARRIS, G.W.(1955): Neural Control of the Pituitary Gland. Arnold, London.
- 187-SHALLY, A.V., ARIMURA, A. and A.J. RASTIN (1973): Hypothalamic Regulatory Hormones. At Least Nine Substances from the Hypothalamus Control the Secretion of Pituitary Hormones. Science, 179:341.
- 188-SHALLY, A.V., REDDING; T.W., BOWERS, C.Y., and J.F. BARRET (1969): Isolation and Properties of Porcine Thyrotropin Releasing Hormone. J. Biol. Chem. 244:4077.
- 189-FOLKERS, K. ENZMANN, F. BOLER, J., BOWERS, C.Y. and A.V. SHALLY (1969): Discovery of Modification of The Synthetic Tripeptide Sequence of the Thyrotropin Releasing Hormone Having Activity. Bioche.Bioph.Res. Common. 37:123.
- 190-NAIZ, R.M.G., BARRET, J.R., BOWERS, C.Y. and A.V SHALLY (1970): Structure of Porcine Thyrotropin Releasing Hormone. Biochemistry 9:1103.
- 191-BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N. BUTCHER, M., RIVIER, J. and R. GUILLEMIN: A Hypothalamic Polipeptide that Inhibits the Secretion of Pituitary Growth Hormone Science (1973) 179:77.
- 192-SHALLY, A.V., DUPONT, A., ARIMURA, A. REDDING, I.W. and G.L. LINTHICUM (1975). Federation Proceedings, 34: 584.

- 193-Mc CARM, S.M., TALEISNIG, S. and H.M. FRIEDMAN
(1960): LH-Releasing Activity in Hypothalamic Extracts
Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 104:432.
- 194-SHALLY, A.V., ARIMURA, A., BALA, V., NAIR, R.M.G.,
MATSUO, H., REDDING, T.W., DEBELJUK, L., and W.F.
WHITE (1971): Isolation and Properties of the FSH
and LH Releasing Hormone. Biochem. Biophys. Research
Commun. 43: 393.
- 195-BURGUS, R., BUTCHER, M., LING, N., MANAHAN, M. RIVIER,
J., FELLOWS, R. AMOSS, M., BLACKWELL, R. VALE, W. and
R. GUILLEMIN (1974): Structure Moléculaire du contrô-
lant la sécrétion de LH. C.R.Acad. Sci. 273:1611.
- 196-MATSUO, H., NAIS, R.M.G., ARIMURA, A. and A.V. SHALLY
(1971): Structure of the Porcine LH and FSG Releasing
Hormone. I The Proposed Amino Acid Sequence. Biochem.
Byophys. Res. Comm. 43:1334.
- 197-MATSUO, H. ARIMURA, A., NAIR, R.M.G. and A.V. SHALLY
(1971): Synthesis of the Porcine LH and FSH Releasing
Hormone by the Solid-Phase Method. Biochem.Biophys.
Res. Comm. 45:822.
- 198-COY, D.M., COY, G.J. and A.V. SHALLY (19): In:
Methods in Neurochemistry, in press. Eds. N. Mark and
R. Rodnight. Plenus Press. N.Y.
- 199-ARIMURA, A., SATO, H., KU;ASAKA, T., WOROBEK, R.B.,
DEBELJUK, L., DUNN, J., and A.V. SHALLY (1973):
Production of Antiserum to LH-Releasing Hormone (LH-
RH) Associated with Gonadal Atrophy in Rabbits: Develop-
ment of Radioimmunoassay for LH-RH. Endocrinology 93:
1092.

- 200-KASTIN, A.J., ARIMURA, A., GONZALEZ BARCENA, D., COY, D. H., MILLER, M.C., NISHI, N., LEE, L., DURAN-HUERTA, H. SCHALCH, D.S. and A.V. SHALLY (1974): International Journal of Fertility 19:202.
- 201-VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, D.V., ARIMURA, A., COY, E.J., HIROTSU, Y. and A.V. SHALLY (1974): Synthesis and Biological Properties of (LEU-GJ-LH-RH) and (D-LEU-G, DESGLY-NH₂¹⁰) - LH-RH Ethycamide. Biochim.Biophys.Res.Comm. 59-1226.
- 202-FRANCHIMONT, P. (1971): The Regulation of Radioimmunoassay of Gonadotropins. In: Martini, L., and W.I. Ganong (eds.). New York Oxford University Press, p. 331.
- 203-SUTHERLAND, E.W. (1956): Hormonal Regulatory Mecanism. In: Liebecq, C. (ed.) Proceedings of the Third International Congress of Bioquimistry. Bru sels, 1955. N.Y. Academic Press.
- 204-SUTHERLAND, E.W. (1972): Studies on the Mechanism of Hormone Action. Science 177:401.
- 205-BERGSTROM, S. (1967): Prostaglandins. Members of a New Hormonal Systems. Science 157:382.
- 206-DE LANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEY, W.D. COOPER, R.A. and E.G. KRESS (1968): Activation of Sheletal Muscle Phosphorilase Jinase by Adenosine Triphosphate and Adenosine 3'5' Monosphosphate. J.Biol.Chem. 243:2200.

- 207-BROSTOM, C.O. and CORBIN, J.D. (1971): Interaction of the Subunits of Adenosine 3' 5' Cyclic Monophosphate - Dependent Protein Kinase of Muscle. Proc. Nat. Acad. Sc. USA 68:2444.
- 208-KASE; N.G. and L. SPEROFF (19): The Ovary. In: Bondy, P.K. and L.E. Rosenburg (eds.). Diseases of Metabolism Endocrinology. W.B. Saunders Company. Philadelphia. p. 1585.
- 209-RYAN, K.Y. and PETRO, Z. (1966): Steroid Biosynthesis by Human Ovarian Granulosa and Theca Cells. J. Clin. End. Met. 26:46.
- 210-CHANNING, C.P. (1969): The Use of Tissue Culture of Granulosa Cells as a Method of Studying the Mechanisms of Luteinization. In: Mc Kers, R.W. (ed.). The Gonads. Meredith Corporation. N.Y. p, 295.
- 211-RYAN, R.J. and Z. PETRO (1967): Steroid Biosynthesis by Separate and Recombined Granulosa and Theca Cells. Abstract 109. Proceedings of Endocrine Society. Miami Beach.
- 212-MASON, N.R. (1970): Steroid A-Ring Reduction by Rat Ovaries. Endocrinology 87:450.
- 213-ARMSTRONG, D.T., O'BRIEN, J. and R.O. GREEP (1964): Effects of Luteinizing Hormone on Progesterin Biosynthesis in The Luteinized Rat Ovary. Endocrinology 75:488.
- 214-MARSH, J.M. and K. SAVARD (1966): Mode of Action of LH on Steroidogenesis in the Corpus Luteum in Vitro. J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 1:113.

- 215-MARCH, J.M. (1970): The Stimulatory Effect of Luteinizing Hormone on Adenyl Cyclase in the Bovine Corpus Luteum. *J. Biol. Chem.* 245:1596.
- 216-MARCH, J.M., BUTCHER, R.W., SAWARD, R. and E.W. SUTHERLAND (1966): The Stimulatory Effect of Luteinizing Hormone on Adenosin 3', 5'. Monophosphate Accumulation in Corpus Luteum Slices. *Journal of Biological Chemistry* 241:5436.
- 217-MASON, R.N., SHAFFER, R.J. and R.E. TOOMEY (1973): Stimulation of Cyclic AMP Accumulation in Rat Ovaries in Vitro. *Endocrinology* 93:34.
- 218-CHANNING, C.P. (1974): Temporal Effects of LH, HCG, FSH and Dibutyryl Cyclic 3', 5' AMP upon Luteinization of Rhesus Monkey Granulosa Cells in Culture. *Endocrinology* 94:1215.
- 219-KORITZ, S.B. and I.N. HIRSHFIELD (1966): Studies on the Control of Pregnenolone Synthesis. In: *Proceedings of Second International Congress of Hormonal Steroids*. L. Martini (ed.). Milan. Italy. Excerpta Medica Foundation. ICS 132, p. 404.
- 220-KUEHL, F.A., HUMES, J.L., CIRILLO, V.J. and E.A. HAM (1972): C-AMP and Prostaglandins in Hormone Action. *Advances in c-Nucleotide Research*. Vol. 1. Ruven Press N.Y., p. 493.
- 221-MARSH, J.M., NORMAN, S.T., YANG and W.J. LE MAIRE (1974): Prostaglandin Synthesis in Rabbit Graafian Follicles in Vitro. Effect of Luteinizing Hormone and Cyclic AMP. *Prostaglandins*. Vol. 7, n° 4.

- 222-MENON, K.M.J. (1973): Purification and Properties of a Protein Kinase from Bovine Corpus Luteum That is Stimulated by Cyclic Adenosine 3'-5'- Monophosphate and Luteinizing Hormone. J.Biol.Chem. Vol.238., n^o2, p. 494.
- 223-LUNENFELD, B. and A. ESHKAL (1968): In: Gonadotropins. E. Rosemberg. (ed.). Geron X Inc. Los Altos California 197.
- 224-SMITH, O.W., and K.J.RYAN (1961): Biogenesis of Estrogens by the Human Ovary. The Conversion of Androstenedione-4-C¹⁴ to Estrone and Estradiol² in High Yield. Endocrinology, 69:869.
- 225-PAULSEN, C.A. (1974): In: R.H. Williams (ed.). Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Company. The Testis. Philadelphia. London. Toronto. p. 80.
- 226-LIPSETT, M.B. and R.J. SHERINS (1974): In: Bondy, P.K. and Rosemberg, L.E. (eds.). The Testis. Diseases of Methabolism. Endocrinology. W.P. Saunders. Company. Philadelphia. London. Toronto, p. 1553.
- 227-EIK-NESS, K.B. (1971): Production and Secretion of Testicular Steroids. Recent Prog. Hormone, Res. 27:517.
- 228-LUCAS, W.M. and W.F. WHITMORE (1957): Identification of Testosterone in Human Spermatic Vein Bloos. J. Clin. Endocr. 17:465.
- 229-ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W. (1968): Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem. 37:149.

- 230-CATT, K.J., WATANABE, R. and M.L. DUFFAN (1970): Cyclic AMP Released by Rat Testis during Gonadotropin Stimulation in Vitro. *Nature*, 239:280.
- 231-MOYLE, W.R. and J. RAMACHANDRAN (19): Effect of LH on Steroidogenesis and Cyclic AMP. Accumulation in Rat Leyding Cell Preparations and Mouse Tumor Leyding Cells. *Endocrinology* 93:127.
- 232-ROMMERTS, F.F.G., COOKE, B.A., VAN DER KEMP, J.W.C.M. and H.J. VAN DER MOLEN (1973): Effect of Luteinizing Hormone on 3'-5' Cyclic AMP and Testosterone Production in Isolated Interstitial Tissue of Rat Testis. *FEBS Letters* Vol. 33, n° 1.
- 233-CATT, K.J. and M.L. DUFFAN (1973): Interactions of LH and HCG with Testicular Gonadotropin Receptor. In: O'Malley, B.W. and A.R. Means (eds.). *Receptor for Reproductive Hormones*. Plenum Press. N.Y. London, p.379.
- 234-HALL, P.F. (1970): Gonadotrophic Regulation of Testicular Function. In: *The Androgens of the Testis*. Eik-Ness, K.B. (eds.). New York Marcel Dekker, Inc. 9. 73.
- 235-HALL, P.F. (1966): On the Stimulation of Testicular Steroidogenesis in the Rabbit by Interstitial Cell-Stimulating Hormone. *Endocrinology* 78:690.
- 236-MEANS, A.R. and VAITUKAITUS, J. (1972): Peptide Hormones "Receptos" Specific Binding of ³H-FSH to Testis. *Endocrinology* 90:39.
- 237-KUEHL, F.A., PATANELLI, D.J., TARNUFF, J. and J.S. HUMES (1970): *Biol. Reprod.* 2:1154.

- 238-MEANS, A.R. and J. VAITUKAITUS (1972): Peptide Hormone "Receptors" Specific Binding of ^3G -FSH to Testis. Endocrinology 90:39.
- 239-Mc CULLAGH, D.R. and SCHNEIDER, I. (1940): Effect of a Non-Androgenic Testis Extract on the Estrus Cycle in Rats. Endocrinology 27:899.
- 240-FRANCHIMONT, P. and S. CHARI (1974): Control of Gonadotropin Secretion in Man. Fourth International Congress on Hormonal Steroids. Simposia Abstract Book September 2-7-1974. México.
- 241-LUGARO, G. CASELLATO, M.M., MAZZDA, G. FACHINI, G. and G. CARREA (1974): Neuroendocrinology 15:62.
- 242-JOHNSON, R.H. and EWING, L.L. (1971): Follicle Stimulating Hormone and the Regulation of Testosterone Secretion in Rabbit Testis. Science 174:977.
- 243-DEKRETSEK, D.M., CATT, R.J. and C.A. PAUSEK (1971): Studies on the in Vitro Testicular Binding of Iodinated Luteinizing Hormone in Rats. Endocrinology 80:332.
- 244-DEKRETSEK, D.M., CATT, R.J. BURGER, H.G. and G.G. SMITH (1969): Radioautographic Studies on the Localization of ^{125}I -Labelled Human Luteinizing and Growth Hormone in Immature Male Rats. J.Endocr., 43:105.
- 245-BHALLA, V.K. and L.E.REICHERT, Jr. (1974): Gonadotropin Receptors in Rats Testis. J. Biol. Chem. Vol. 249, n $^{\circ}$ 24 p.7996.
- 246-LUNENFELD, B. and A. ESKAL (1967): In: Wood, I.G. and J.A. Loraine (eds.). Vitamin and Hormones. Acad. Press N.Y., 25:137.

- 247-LEE, C.Y. and R.J. RYAN (1973): Luteinizing Hormone Receptor in Luteinized Rat Ovaries. In: O'Malley, B.W. and A.R. Means (eds.). Receptors for Reproducible Hormones. Plenum Press. New Yor. London, p. 419.
- 248-RAJANIEMI, H.J., HIRSHFIELD, A.N. and A. RESS MIDGLEY Jr. (1974): Gonadotropin Receptors in Rat Ovarian Tissue. I. Localization of LH Binding Sites by Fractionation of Subcellular Organelles. Endocrinology 95:579.
- 249-MEANS, A.R. (1973): Specific Interaction of ³H-FSH with Rat Testis Binding Sites. In: O'Malley, B.W. and A.R. Means (eds.). Receptors for Reproductive Hormones. Plenum Press. New York. London.
- 250-DUFAU, M.L., CATT, R.J. and T. TSURUHARA (1972): A Sensitive Gonadotropin Responsive System. Radioimmunoassay of Testosterone Production by the Rat Testis in Vitro. Endocrinology 90:1032.
- 251-CATT, R.J., DUFAU, M.L. and T. TSURUHARA (1971): Studies on Radioligand Receptor Assay System for Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin. J. Clin. Endocr. 32:850.
- 252-MIDGLEY, A.R. and R.B. JAFFE (19): Episodic Fluctuations of LH During the Menstrual Cycle. Regulation of Humans Gonadotropins, J. Clin. Endocr. 33:969.
- 253-COBLE, Y.D., ROHLER, P.O., CARGILLE, C.M. and G.T. ROSS (1969): Production Rates and Metabolic Clearance Rates of Human Follicle-Stimulating Hormone in Premenopausal and Postmenopausal Women. J. Clin. Invest. 48:359.

- 254-VANDE WIELE, R.L. and M. FERIN (1974): The Control of Pulsatile Gonadotropin Secretion. In: Cronobiological Aspects of Endocrinology Simposia Medica Hoechst 9 F.K. Schattauer Verlag. Stuttgart. New York, p. 303.
- 255-MOTTA, M., PIVA, F. and L. MARTINI (1970): The Hypothalamus as the Center of Endocrine Feedback Mechanism. In: The Hypothalamus, by L. Martini, M. Motta, F. Fraschini. Academic Press Inc. New York, p. 1
- 256-FRASCHINI, F., MOTA, M. and L. MARTINI (1968): A "Short" Feedback Mechanism Controlling FSH Secretion. *Experientia*, 24:270.
- 257-MOTTA, M., FRASCHINI, F. and L. MARTINI (1969): Short Feedback Mechanism on the Control of Anterior Pituitary. In : W.F. Ganong and L. Martini (eds.). *Frontier in Neuroendocrinology*. Oxford University Press, New York. p. 211.
- 258-HYYPPA, M. MOTTA, M. and L. MARTINI (1971): Ultrashort Feedback Control of Follicle Stimulating Hormone Releasing Factor Secretion. *Neuroendocrinology* 7:227.
- 259FRANCHIMONT, P. (1973): Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH). Regulation of Secretion. In: Berson, S.A. and R.S. Yalow (eds.). *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology* North-Holland Co. p.516.
- 260-YUSMAN, M.A. and M.L. TAYMOR (1970): Serum Levels of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone and Plasma Progesterone Related to Ovulation by Corpus Luteum Biopsy. *J. Clin. Endocr.* 30:396.

- 261-FRANCHIMONT, P. (1971): Sécration normale et Pathologique de la Somatotrophine et des Gonadotrophines Humaines. Masson and Cie (eds.) 1971, p. 141.
- 262-MIDGLEY, A.R, Jr., and R.B. JAFFE (1968): Regulation of Human Gonadotrpins. IV. Correlation of Serum Concentrations of Follicle Stimulating and Luteinizing Hormones during the Menstrual Cycle. J. Clin. Endocr. 28:1699.
- 263-CARGILLE, C.M., BURGER, H.G., CATT, K.J. and A. DOIG (1964): J. Clin. Invest. 28:999.
- 264-THOMPSON, I.E., RARAM, R.S. and TAYMOR, M.L. (1974): Possitive Feedback Effects of Estrogen in Amenorrhic Women. American Journal of Obstetric and Gynecology. Vol. 118, n^o , p. 788.
- 265-MONROE, S.E., JAFFE, R.B. and A.R. MIDGLEY, jr. (1972): Regulation of Human Gonadotrophins.XII. Increase in Serum Gonadotropin in Response to Estradial. J.Clin.End. 34:342.
- 266-FRANCHIMONT, P. and HENDRICK (1971): Radioimmunoassay of Gonadotropin. Hormone Metab. Res. Suppl. 3, 36.
- 267-ISCI, C.C. and S.S.C. YEN (1971): Acute Effects of Intravenous Infusion of 17 B Estradial on Gonadotropin Release in Pre- and Post-Menopausal Women. Clin. Endocri. Metab. 32:766.
- 268-FRANCHIMONT, P. (1968): Le desage radioimmunologique des gonadotrophines. Ann. Endocrinol 29:403.

- 269-CARGILLE, C.M., VAITUKAITIS, J.L., BERMUDEZ, J.A. and G.T. ROSS (1973): A Differential Effect on Ethinyl Estradiol upon Plasma FSH and LH Relating to Time of Administration in the Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 36:87.
- 270-CARGILLE, C.M., ROSS, G.T., and T. YOSHIMI (1969): Daily Variations in Plasma Follicle Stimulating Hormone Luteinizing Hormone and Progesterone in the Normal Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 12.
- 271-NEILL, J.D., JOHANSSON, E.P., DATTA, J.K. and E. KNOLL (1967): Relationship between the Plasma Levels of Luteinizing Hormone and Progesterone during the Normal Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocr.* 27:1167.
- 272-FRANCHIMONT, P. LEGRES, J.J., AYALON, D. and A. MUTSERS (1970): Suppressive Action of Mestranolone Enanthate and Acetate on Gonadotropin (FSH and LH) Levels Determined by Radioimmunoassay in Eugonadal and Post-menopausal Women. *Obstet. Gynecol.* 36:93.
- 273-SWERDLOFF, R.S. and W.D. ODELL (1969): Serum Luteinizing and Follicle Stimulating Hormone Levels during Sequential and Non-Sequential Contraceptive Treatment of Eugonadal Women. *J. Clin. Endocr. Metab.* 29:157.
- 274-ROSS, G.T., ODELL, W.D. and P.L. RAYFORD (1967): Luteinizing Hormone Activity in Plasma during the Menstrual Cycle. *Science*, 155:1679.
- 275-VRIZ-JUSTICE, A., HACKMANN, E. and M. LICHTSTEINER (1974): The Effect of Oestradiol Dipropionate and Progesterone on Monoamine Uptake in Rat Brain. I. *Of Neurochem. Vol. 22 Pergamon Press. G.B.* p. 187.

- 276-SAR, M. and W.E. STUMPF (1973): Neurons of the Hypothalamus Concentrate (³H) Progesterone or Its Metabolites. Science 183:1266.
- 277-LEE, P.A., JAFFE, R.B., MIDGLEY, A.R., Jr., ROHEN, F., and G.D. MISWENDER (1973): Regulation of Serum Gonadotropin.VIII. Supresion of Serum LH and FSH in Adult Males following Exogenous Testosterone Administration. J. Clin. Endocr. 35:636.
- 278-MURSE, H.C., HORIKE, N., ROWLEY, M.J., and C.G. HELLER (1973) Testosterone Concentration in the Testis of Normal Men: Effects of Testoterone Propionats Administration. J. Clin. Endocr. 37:882.
- 279-SAXENA, B.B., LEYENDECKER, G., CHEN, W., GANDY, H. and R.E. PETERSON (1969): Radioimmunoassay of FSH and LH by Chromatoelectrophoresis. Acta Endocrinol Suppl. 142:185.
- 280-MASSA, R. TUPNICKA, E.S., KNIEWALD, Z., and L. MARTINI (1972): The Transformation of Testoterone into Dihydrotestosterone by the Brain and the Anterior Pituitary. Steroid Biochemistry 3:385.
- 281-FRANCHIMONT, P. (1970): Application of Radioimmunoassay of Gonadotropin in Clinical Research. In: I. Irvine (ed.) Reproductive Endocrinology. Edinburg. Livingstone p. 1.
- 282-DEBELJUK, L., ARIMURA, A. and A.V. SHALLY (1972): Effect of Testoterone and Estradiol on the LH and FSH Release induced by LH-Releasing Hormone (LH-RH) in Intact Male Rats. Endocrinology 90:1578.

- 283-SAR, M., and W.E. STUMP (1972): Cellular Localization of Androgen in the Brain and Pituitary after the Injection of Tritiated Testosterone. *Experientia* 28:1364.
- 284-SAWYEZ, C.H., MARKEE, J.E. and W.H. HOLLINSHEAD (1947): Inhibition of Ovulation in the Rabbit by the Adrenergic Blocking Agent Dibenamine. *Endocrinology* 41:395.
- 285-KAMBERI, I.A. and S.M. Mc CANN (1969): Effect of Biogenic Amines, FSH-Release of FSH-Release of FSH by Pituitaries Incubated in other Substances on the Release of FSH by Pituitaries Incubated In Vitro. *Endocrinology*, 85:815.
- 286-KAMBERI, I.A., SCHNEIDER, H.P.G. and S.M. Mc CANN (1970): Action of Dopamine to Induce Release of FSH-Releasing Factor (FRF) from Hypothalamic Tissue In Vitro. *Endocrinology*, 86:278
- 287-KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and J.C. PORTER (1970): Effect of Anterior Pituitary Perfusion and Intraventricular Injection of Catecholamines and Indoleamines on LH Release. *Endocrinology* 87, 1.
- 288-KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and J.C. PORTER (1971): Effect of Anterior Pituitary Perfusion and Intraventricular Injection of Catecholamines on FSH Release. *Endocrinology* 88: 1003
- 289-SCHNEIDER, H.P.G. and S.M. Mc CANN (1970): Release of LH-Releasing Factor (LRF) into the Peripheral Circulation of Phypophysectomized Rats by Dopamine and its Blockage by Estradiol. *Endocrinology* 87:249.

- 290-FUXE, K. and T. KOK (1967): The Influence of Central Catecholamines Neurons on the Hormone Secretion from the Anterior and Posterior Pituitary. In: F. Stutiusky (ed.) Neurosecretion. Springer Verlag Berlin, 227.
- 291-SAWYERS, C.H., HILLIARD, J., RANEMATS, S., SCARAMUZZI, R., and C.A. BLAKE (1974): Effects of Intraventricular Infusions of Norepinephrine and Dopamine on LH Release and Ovulation in the Rabbit. Neuroendocrinology 16 (a): 328.
- 292-KORDON, C. and J. GLOWINSKI (1970): Role of Brain Catecholamines in the Control of Anterior Pituitary Functions. In: L. Martini and J. Meites (eds.). Neurochemical Aspects of Hypothalamic Function. Academic Press. New York, p. 85.
- 293-KALRA, P.S. and S.M. Mc CANN (197): Involvement of Catecholamines in Feedback Mechanisms. In: Progress in Brain Research: Drug Effects on Neuroendocrine Regulation Elsevier, New York, Vol. 39.
- 294-McCANN, S.M. (1975): The Effects of Catecholamines on the cretion of FSH, LH and Prolactin by the Adenohypophysis. In: Charro, A.L., Fdez-Durango, R. and G. Lopez del Campo (eds.). Excerpta Medica. (In Press.)
- 295-GRUMBACH, M.M., ROTH, J.C., KAPLAN, S.L. and R.P. KELCH (1974): Hipothalamic-Pituitary Regulation of Puberty in Man: Evidence and Concepts Derived from Clinical Research. In: Grumbach, M.M., Grave, G.D., and F.E. Mayer (eds.). The Control of the Onset of Puberty. p. 115
- 296-FAIMAN, C. and J.S.D. WINTER (1974): Gonadotropins and Sex Hormone Patterns in PUBerty: Clinical Data. In: Grumbach, M.M., Grave, G.P. and F.E. Mayer (eds.). The Control of the Onset of Puberty, p. 32.

- 297-**VEN, S.S.C.** and **J.J.VIČIĆ** (1970): Serum Follicle-Stimulating Hormone Levels in Puberty. *Am. J. Ob. Gin.* 106:134.
- 298-**YEN, S.S.C., VIČIĆ, J.J.** and **D.V. KEARCHNER** (1969): Gonadotropin Levels in Puberty. In: *Serum Luteinizing Hormone. J. Clin. Endocrinal.* 29:382.
- 299-**KELCH, R.P., KAPLAN, S.L.** and **M.M. GRUMBACH** (1973): Suppression of Urinary and Plasm Follicle-Stimulating Hormone by Exogenous Estrogens in Prepubertal and Pubertal Children. *J. Clin. Invest.* 52:1122.
- 300-**KAPEN, S., BOYAR, R.M., FINKELSTEIN, J.W., HELLMAN, L.** and **WEITZMAN, E.D.** (1974): Effect of Sleep-Wake Cycle Reversal on Luteneizing Hormone Secretary Pattern in Puberty. *J. Clin. Endocrinal. Metab.* 39:293.
- 301-**WURTMAN, R.J, ACELRD, J.** and **D.E. KELLY** (1968): *The Pineal.* Academic Press, New York, London, p. 111
- 302-**CAVIEZEL, P.** and **L. MARTINI** (1971): Hormones and Brain Development. In: *Paoletti, R. and A.N. Davison (eds.). Chemistry and Brain Development.* Plenum Press.
- 303-**ADLER, R.D.** (1966): Masculinization of the Female Rat by Intracranial Implantation of Androgen in Infancy. *Abstr. 2nd. Inter. Congr. Hormonal Steroid. Ecerpta Med. Intern. Congr. Ser. 111: 364*
- 304-**FRANCHIMONT, P.,** and **HENDRICK** (1971): Radioimmunoassays of Gonadotropins. *Hormone Metab. Res. Suppl.* 3: 46.
- 305-**PETERS, H.** (1973): *The Development and Maturation of the Ovary and its. Functions.* Excerpta Medica, ICS 267. Amsterdam.

- 306-BERGER, M.J., TAYMOR, M.L., KARAM, K. and F. NUDEMBERG
(1972): The Relative Roles of Exogenous and Endogenous
Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone
(LH) in Human Follicular Maturation and Ovulation
Induction. Fert. Steril. 23:783.
- 307-ROSS, G.T., CARGILLE, C.M., LIPSETT, M.B., RAIFORD, P.L.,
MARSHALL, J.R., STROTT, C.A. and RODBARD, D. (1970):
Pituitary and Gonadal Hormones in Women During Spontaneous
and Induced Ovulatory Cycles. Rec. Prog. Horm. Res. 26:1.
- 308-PAULSEN, C.A., GORDON, D.L., CARPENTER, R.W., GANDY, H.M.
and W.D. DRUCKER (1968): Klinefelter's Syndrome and its
Variants: A Hormonal and Chromosomal Study. Recent Prog.
Hormone Res. 24:321.
- 309-MATSUMOTO, S. IGARASHI, M., OZAWA, M., TOHMA, K., SATO, T.,
KUBO, H., INOUE, S., OKA, Y. and HOSAKA, H. (1962): Studies
on Menstrual Disorders. II. Endocrinological Analysis in
Cases of Amenorrhea. J. Jap. Obst. and Gynec. Soc. 9:161.
- 310-WYSS, R.H., RARSNIA, R., HEINRICHS, W.L. and W.L. WERRMANN
(1968): Inhibition of Uterine Receptor Binding of Estradiol
by Anti-Estrogens (Clomiphene and GL-868). J. Clin. Endocr.
Metab. 28:1824.
- 311-KASTIN, A.J., SHALLY, A.V., GUAL, C., MIDGLEY, A.R. Jr.,
MILLER, M.C. and A. LABEZA (1971): Post-Response
Relationship of Luteinizing Hormone to LH-RH in Man. J.
Clin. Invest. 50:1551.

- 312-FRANCHIMONT, P. BECKER, W., ERNOULD, Ch ., THYS, Ch.,
DEMOULIN, A., BOURGUIGNON, J.P., LEYRUS, J.J. et J.C.
VALCKE (1973): Action de l'hormone hypothalamique libérant
l'hormone lutéinisant (LH-RH) sur les gonadotrophines chez
le sujet normal. Annales d'Endocrinologie, Paris Tom. 34,
n° 5, p. 477.
- 313-BOTELLA-LLUSIA, J., CHARRO, A.L., GUADALIX, F.J. and R.
FDEZ-DURANGO (1975): LH-RH as a Diagnostic Aid in
Amenorrhea and Sterility. In: Charro, A.L., Fdez-Durango,
R. and López del Campo, J.G. (eds.). The Basic Principles
and Clinical Application of the Hypothalamic Hormones.
Excerpta Medica. Amsterdam. (in press).
- 314-COUTTS, J.R.T., DODSON, K. and M.C. MACNAUGHTON (1974):
Hormone Profiles in Normally Menstruating and Infertile
Women. Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. Suppl. 4/1
S:169.
- 315-STROTT, Ch., CARGILLE; M., ROSS, G.T. and M.B. LIPSETT
(1971): The Short Luteal Phase . J. Clin. Endocr. 30:246.
- 316-COLE, H.H. (1975): Studies on Reproduction with Emphasis
on Gonadotropins Antigonadotropins and Progonadotropins.
Biology of Reproduction 12:194.
- 317-KELCH, R.P., GRUMBACK, M.M. and S.L. KAPLAN (1972): Studies
on the Mechanism of Puberty in Man. In: Saxena, B.B.,
Beling. C.G. and H.M. Gandy (eds.). Gonadotropins. New York
Wileg. Interscience. p. 524.

- 318-RUBIN, R.T., GOUIN, P.R., KALES, A. and W.D. ODELL (1973):
Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone and Growth
Hormone Secretion in Normal Adult Men During Sleep and
Dreaming. Psychosomatic Medicine. Vol 35:309.
- 319-CROOKE, A.C. and W.R. WUTT (1959): The Excretion of
Follicle Stimulating Hormone by Pregnant Women. J. Obst.
Gynecol. 66:297.
- 320-ZARATE, A., CANALES, E.S., SORIA, J., GONZALEZ, A., SCHALLY,
A.V. and A.J. KASTIN (1974): Further Observations on the
Therapy of Anovulatory Infertility with Synthetic
Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. Fertility and
Sterility. Vol. 25:1.
- 321-PATTON, W.C., THOMPSON, I.E., BERGER, M.J., CHONG, A.P. and
M.L. TAYMOR (1974): Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing
Hormone. Its Use in the Differential Diagnosis of Secondary
Oligo-Amenorrhea. Obst. Gynecol. Vol 4, no 6:823.
- 322-DONINI, P., PUZZUOLI, O., D'ALESSIO, I., LUNENFELD, B.,
ESHKOL, A. and A.F. PARLOW (1966): Acta Endocrinol. (Kbh.)
52:186.
- 323-OLIVIERI, V. (1971): Assessment of Specificity of
Gonadotrophic Antisera and Their Stability in Lyophilized
Form. In: Kirkham, V.E. and Hunter, W.M. (eds.). Radio-
immunoassay Methods. Churchill. Livingstone. Edinburgh and
London.
- 324-MYERS, W.G. and J.C. VAN DER LEEDEN (1960): Radioiodine-125
J.Nucl. Med. 1:149.
- 325-YALLOW, R.S. ROSS, G.T. and A.R. Jr. MIDGLEY (1971): In:
Odell, W.D. and W.H. Daughaday. Principles of Competitive
Protein-Binding Assays. J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
Toronto. p. 297.

- 326-JEFFCOATE, S.L. (1971): Purification of ^{125}I -LH and ^{125}I -FSH by Cellulose Adsorption Chromatography. In: Kirkham, R.E. and W.H. Hunter (eds.). Radioimmunoassay Methods. Churchill. Livingstone. Edimbourg and London. p. 30.
- 327-ACONO, T. and M.L. TAYMOR (1968): Radioimmunoassay for Follicle Stimulating Hormone (FSH) with ^{125}I Labelled FSH. Am. J. Obst. Gynecol. 100:10.
- 328-KOHLER, P.O. (1963): Effect of Iodination on the Biological Activity and Metabolism of Human Luteinizing Hormone. J. Clin. End. Met. 28:613.
- 329-SCHAFF, S., ROSEN, S. and J. ROTH (1968): Antibodies to Human Follicle Stimulating Hormone: Complete Cross-Reactivity with Three Other Hormones. J. Clin. Invest. 47:1722.
- 330-LEMARCHAND-BERAUD, T. and J. GOMEZ (1971): Dosage Radio-immunologique des Gonadotropines plasmatiques; problemes de spécificité. Schweiz Med. Wschr. 101:1108.
- 331-LANDON, J. (1967): Biochem. J. 105:1075.
- 332-HUNTER, W.M. (1969): Assessment of Radioiodinated Hormone Preparations. In: Diczfalussy (ed.) Immunoassay of Gonadotropins. Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Stockholm, p. 134.
- 333-GONÇALVES SOBRINHO, L. (1971): Regulação da Secreção de Gonadotrofinas Hipofisárias em Seres Humanos. Arquivo de Patologia. Vol. XLIII nº 1. Palhava. Lisboa.

- 334-GARCIA, M.D. y R. SANTELICES (1974): Validation of the Radioimmunoassays for Pituitary Gonadotropins. II: Human Follicle Stimulating Hormone. Reproducción. Vol. 1, nº 3 p. 271.
- 335-WIDE, L. ROSS, P. and C. GEMZILL (1961): Acta Endocr. (Kbh) 37:445.
- 336-DJIAN, R., MATTEI, A. and P. JAQUETT (1973): Le dosage de l'hormone luteinisante plasmatique (LH) par méthode radioimmunologique. J. Gyn. Obst. Biol. Repr. 2:161.
- 337-REUTER, A.M., HENDRICK, J.C. et P. FRANCHIMONT (1973): Mise au point d'un dosage radio-immunologique rapide des gonadotrophines. Ann. Biol. Clin. 31:479.
- 338-JACOBS, H.S., VANTHUYRE, C. and R.P. EKINS (1974): Immunological Cross-Reaction of LH and HCG. In: Radio-immunoassay and Related Procedures in Medicine. International Atomic Energy Agency. Vienna. Vol. 1, p. 237.
- 339-NEIL, J.D., PECKHAM, W.D. and E. KNOBIL (1969): Nature (London) 213:1014.
- 340-MORGAN, C.R. and A. LAZAROW (1963): Immunoassay of Insulin: Two Antibody System. Diabetes. 12:115.
- 341-WELLBERN, T.A. and T.R. FRASER (1965): The Double-Antibody Immunoassay of Insulin. Diabetologia 1:211.
- 342-BRUNFELDT, R. and K.K. JORGENSEN (1961): Some Factors of Significance in the Doble Antibody Immunoassay of Insulin. Acta Endocr. Copenh. 54:347.
- 343-BUCKLER, J.M.H. (1971): A Comparison of the Effects of Human Serum in Two Double Antibody Radioimmunoassay System for the Estimation of Luteinizing Hormone. In: Kirkham R.E. and W.M. Hunter (eds.). Churchill. Livingstone, Edinburgh London.

- 344-HUNTER, W.M. (1969): Discussion. In: Acta Endocr. (Rbh).
Suppl. 142:254.
- 345-ØRSKOV, H. (1969): Specificity of Radioimmunoassay.
Interference with Primary Hormone-Antibody Reaction by
Salts and other Solutes. In: M. Margoulies (ed.) Protein and
Polypeptide Hormones. p.566.
- 346-VEKEMANS, M. and C. ROBYN (1974): A Four-hour Double
Antibody Radioimmunoassay for Human LH. Europ. J. Obstet.
Gynec. Reprod. Biol. 13:111.
- 347-GITSCH, E. and J. SPONA (1973): Radioimmunologische LH-
Bestimmung im Serum abs Hiefe Zur Ter-minisierung der
Ovulation. Geburtsh. u. Frauenheilk 33:297.
- 348-RODBARD, D., RUDER, H.J., VAITUKAITUS, J. and H.S. JACOBS
(1971): Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand
Assays: Improved Sensitivity Obtained by Delayed Additics
of Labelled Ligand. Amer. J. Obstet. Gynec. 101:874.
- 349-ISOJIMA, S., NAKA, O., KUYAMA, R. and N. ADECHI (1970):
Rapid Radioimmunoassay of Human Luteinizing Hormone Using
Polymerized Anti-Human Chorionic Gonadotropin as Immuno-
Adsorbent. J. Clin. Endocr. 31:693.
- 350-ZAHARKO; D.S. and L.V. BECK (1968): Studies of a
Simplified Plasma Insulin Immunoassay Using Cellulose Powder.
Diabetes 17:444.
- 351-NAGATA, Y., NAKAMURA, R.M., OSBORN, C.E., NAFTALIN, F. and
D.R. MISHELL (1975): The Effect of pH Radioimmunoassay of
LH and FSH. Journal of Laboratory and Clinical Medicine.
Vol. 85, nº 3:515.

- 352-TAYMOR, M.L. and J. MIYATA (1969): Discrepancies and Similarities of Serum FSH and LH Patterns as Evaluated by Different Assay Methods. In: E. Diczfalussy (ed.). Immunoassay of Gonadotropins. Karolinska Symposia on Research. In Reproductive Endocrinology. Stockholm, p. 324.
- 353-MILLET, D., FRANCHIMONT, P., HAYEK, G., THEVENET, M. and A. METTER (1973): FSH et LH plasmatiques dans les aménorrhées neuro-pituitaires. Etude statique, effets dynamiques des oestrogènes. Annales d'Endocrinologie Tome 34, n° 2, p. 93.
- 354-VAN THIEL, D.H., SHERINS, R.J., MYERS, G.H. and W.T. DE VITA (1972): Evidence for a Specific Seminiferous Tubular Factor Affecting Follicle-Stimulating Hormone Secretion in Man. J. Clin. Invest. 51:1009.
- 355-CUCHOD, A., LEMARCHAND-BERAUD, T. and H. ACHTARI (1971): Utilité et limite des dosages radio-immunologiques de la FSH et de la LH dans les cas de stérilité féminine et d'aménorrhée. Schweiz. Med. Wschr. 101:1114.
- 356-GARCIA, M.D. and O. GUTIERREZ (1974): Validez de Radio-inmunoensayos de las Gonadotropinas Pituitarias. I. Hormona Luteinizante. Reproducción, Vol. 1, p. 53.
- 357-WIDE, L., NILLIUS, S.J., GEMZELL, C. and P. ROOS (1973): Radioimmunosorbent Assay of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in Serum and Urine from Men and Women. Acta Endocrinologica. Supp. 174, Vol. 73.
- 358-SHERMAN, B.M. and S.G. KORENMAN (1974): Measurement of Plasma LH, FSH, Estradiol and Progesterone in Disorders of the Human Menstrual Cycle: The Short Luteal Phase. J. Clin. Endocr. Metab. 38:89.

- 359-SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.J., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T.W., NAIR, R.M.G., DEBELJUK, L. and WHITE, W.F. (1971): Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polipeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. *Science* 173:1036.
- 360-SOLBACH, J. and W. WEIGELMAN (1973): Intranasal Application of Luteinizing-Hormone Releasing Hormone. *Lancet* 1:1259.
- 361-AONO, T., MINAGAWA, J., KINUGASA, T., MIYAKE, A. and K. KURACHI (1974): The Diagnostic Significance of LH-Releasing Hormone Test in Patients with Amenorrhea. *A. J. Obst. Gyn.* Vol. 119, no 6:740.
- 362-MORTIMER, C.H., BESSER, G.M. and A.S. McNEILLY (1974): The Induction of Gonadotropin Secretions with Repeated Subcutaneous Injections of LH-RH in Men with Hypogonadotropic Hypogonadism. *J. of Endocr.* 61, LXI-LXII.
- 363-GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., MILLER, M.C., LEE, L., RIVAS-LLAMAS, R. and SCHALLY, A.V. (1974): Response to LH-RH in Women Before and After Treatment with Prednisone. *In. J. Fertil* 19:107.
- 364-BESSER, G.M., Mc NEILLY, H.P., REUTER, A. et p. FRANCHIMONT (1972): Hormonal Responses to Synthetic Luteinizing Hormone and Follicle Stimulatory Hormone in Man. *Brit.Med.J.* 3:267.
- 365-GARASHI, M., TAJA, K. and I. SHIKAWA (1974): Existence of FSH-RF Distint from LH-RH. *Psychoneuroendocrinology.* p.178.
- 366-JOHANSSON, R.N.G., CURRIE, B.L., FALKERS, R. and C.Y. BOWERS (1973): Biosynthesis and Evidence for the Existence of the Follicle Stimulating Hormone. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 50:8.

- 367-ROTH, J.C., GRUMBACH, M.M. and S.L. KAPLAN (1973): Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Factor on Serum Testosterone and Gonadotropins in Prepubertal, Pubertal and Adult Males. J.Clin. Endocr. Metab. Vol. 37, n° 5, p.680.
- 368-YEN, S.S.C., VANDERBERG, G., REBAR, R. and Y. EHARA (1972): Variation of Pituitary Responsiveness to Synthetic LRF During Different Phases of the Menstrual Cycle. J.Clin. Endocr. Metab. Vol 35, n° 6:931.
- 369-TAYMOR, M.L. (1974): The Use of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Gynecologic Endocrinology. Fertility and Sterility. Vol. 25, n°11:992.
- 370-COSCIA, A.M., FLEISHER, N. and P.R. BECK (1974): The Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Factor on Plasma LH in Pituitary Disease. J.Clin.Endocr.Metab. 38:83.
- 371-SILER, T.M. and YEN, S.S.C.(1973): Augmented Gonadotropin Response to Synthetic LRF in Hypogonadal State. J.Clin. Endocr.Metab. Vol 37; n° 3:491.
- 372-LUNDBERG, P.O. and L. WIDE (1973): The Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone on Blood Levels of Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone in Klinefelter Patients. Int.J.Fertil 18:97.
- 373-CAPELL, P.T.y PAULSEN, C.A. (1972): The Effect of Exogenous Testosterone Upon Serum FSH and LH Concentration in Normal Males. Contraception 6:135.
- 374-PETERSON, N.T., MIDGLEY, A.R. and R.B. JAFFE (1969): Regulation of Human Gonadotropins. III:Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone in Sera from Adult Males. J. Clin. Endocr. 28:1473.

- 375.- MAUSS, G.B., RICHTER, E., BORMACHER, K., LEYENDECKER, G. and W. NOCKE (1.975) : The Role of Testosterone in the Feedback Control of Male FSH and LH Secretion. Klin. Wschr. 53:237.
- 376.- MUHLEN, A. and J. KOBBERLING (1.973) : Effect of Testosterone on the LH and FSH Release Induced by LH-Releasing Factor (LRF) in Normal Men. Horm. Metab. Res. 5:266.
- 377.- BOTELLA- LLUSIA, J. (1968) : Tratado de Ginecologia. I. Fisiologia Femenina. Cientifico Medica.
- 378.- DHONT, M., VAN DER KERCKHOVE, D. and A. VERMEULEN (1974) The Effect of Ethinyl Estradiol Administration During the Follicular Phase of the Menstrual Cycle on LH, FSH, Progesterone and Estradiol Levels in the Subsequent Luteal Phase. J. Clin. Endocr. Metab. Vol 39. 3:465.
- 379.- SHALLY, A.V., PARLOW, A.F., CARTER, W.H., SAITO, M., BOWERS, C.Y. and A. ARIMURA (1970) : Studies on the Site of Action of Oral Contraceptive Steroids. II. Plasma LH and FSH Levels After Administration of Antifertility Steroids and LH-Releasing Hormone (LH-RH). Endocrinology Vol 86, 3:550.
- 380.- LIBERTUN, C., COOPER, K.J., FAWCETT, C.P. and S.M. McCann (1974): Effects of Ovariectomy and Steroid Treatment on Hypophyseal Sensitivity to Purified LH- Releasing Factor (LRF). Endocrinology. Vol 94, 2:518.
- 381.- GUAL, C., ALCOCER, Y., ECHEVERRYA, Y., MIDGLEY, R.A. Jr., and H.E. SCAGLIA (1974) : Regulatory Effects Pituitary of Steroids on the Pituitary Response to LH-RH. IV : International Congress of Hormonal Steroids. Sept. 2-7. 1.974.

- 382-KULIN, H.E., RIFKIND, A.R. ROSS, G.T. and W.D. ODELL
(1967): Total Gonadotropin Activity in the Urine of
Prepubertal Children. J. Clin. Endocr. Metab. 27:1123.
- 383-KULIN, H.E., GRUMBACH, M.M. and S.L. KAPLAN (1969):
Changing Sensivity of the Pubertal Gonadal Hypothalamic
Feedback Mechanism in Man. Science, 166:1012.
- 384-CHAUSSAIN, J.L., GARNIER, P.E., BINET, E., VASSAL, J.,
SCHOLLER, R. and J.C. JOB (1974): Effect of Synthetic Lutei-
nizing HOrmone-Releasing Hormone (LH-RH) on the Release of
Gonadotropins in Hypophyso-Gonadal Disorders of Children
and Adolescents. III. Hypopituitarism. J. Clin. Endocr.
Metab. Vol. 38, n° 1:58.
- 385-FRANCHIMONT, P., LEGROS, J.J., ERNOULD, Ch., VALCKE, J.C.
and DECONINCK, B. (1972): La sécrétion gonadotrope au
cours de la puberté normale et retardée. Extrait de
"Problèmes actuels d'endocrinologie et de Nutrition"
p.129.
- 386-EISENFELD, A.J. and J.A. AXELROD (1960): Effect of Steroid
Hormones Ovariectomy, estrogen Pretreatment Sex and Immaturi-
ty on the Distribution of ³H-Estradiol. Endocrinology,
79:38.
- 387-GREENBLATT, R.B., BARFIELD, W.E., JUNGCK, E.C. and A.W.
RAY (1961): Inhibition of Ovulation with MRL-41. J. Amer.
Med. Ass. 178:101
- 388-HARKNESS, R.A., BELL, E.T., LORAIN, J.A. and W.I, MORSE
(1964): The Effect of Clomiphene on Endocrine Function in
Normal Men. Endocr. 51:53.

389-CHARRO, A.L., LEVIN, S.R., BECKER, N., HOFELDT, F.,
FRIEDMAN, S. and P. FORSHAN (1973): Clomiphen in the
Evaluation of the Pituitary-Gonadal Axis in Acromegaly.
J.Clin. Endocr. Metab. 36:512.

390-CHARRO, A.L., GUADALIX, J.F., FDEZ-DURANGO, R., BAGAZGOITIA,
J., RUIZ GONZALEZ, C. and J. BOTELLA LLUSIA (1974): Prueba
del Clomifeno y sus Valores en Amenorreas y Anovu-
Amenorreas. Reproducción. Vol. 1, p. 159.