



UNIVERSIDAD DE GRANADA

INFLUENCIA DEL SEPTUM PELLUCIDUM
SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROFINAS
Y PROLACTINA EN RATAS MACHO

Alfonso Carreras Egaña

TESIS DOCTORAL

1983



Biblioteca Universitaria de Granada



01146243

~~P.T. 5-56~~

T 9/48

R.55.402

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
N.º Documento	615036352
N.º Cópia	116270289

INFLUENCIA DEL SEPTUM PELLUCIDUM SOBRE LA SECRE
CION DE GONADOTROFINAS Y PROLACTINA EN RATAS MA
CHO.

Memoria que presenta para optar
al grado de Doctor en Ciencias
(Sección Biológicas).

El Licenciado:



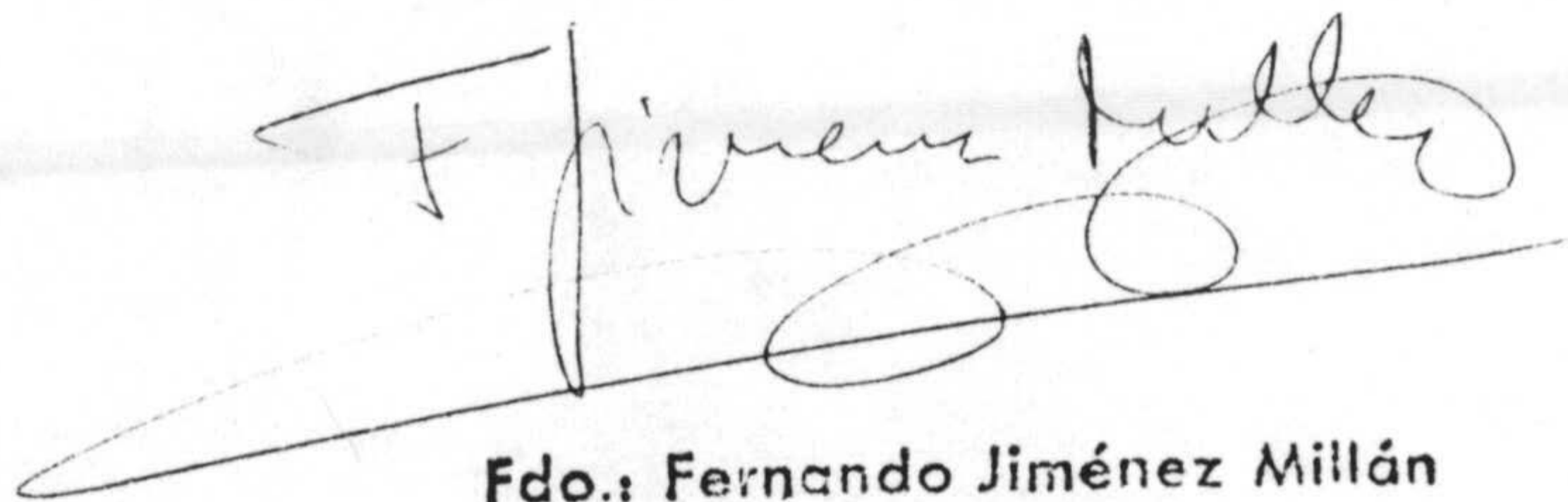
Fdo. Alfonso Carreras Egaña

D.FERNANDO JIMENEZ MILLAN, CATEDRATICO DE -
ZOOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE GRA-
NADA

C E R T I F I C A :

Que la Memoria del trabajo titulado "INFLUENCIA DEL SEPTUM PELLUCIDUM SOBRE LA SECRECION DE GONADOTROFINAS Y PROLACTINA EN RATAS MACHO", presentada para aspirar al grado de Doctor por D.ALFONSO CARRERAS EGAÑA, ha sido revisada por mí, encontrándola conforme para ser leída y defendida en esta Facultad de Ciencias ante el Tribunal que en su día se designe. Por todo lo cual acepto actuar como ponente de esta tesis doctoral.

Granada, 21 de octubre de 1.983



Fdo.: Fernando Jiménez Millán
Catedrático, Jefe Dpto. Zoología
Fac. Ciencias, Univ. Granada

DON CARLOS OSORIO PELAEZ, CATEDRATICO DE FISILOGIA Y BIOQUIMICA, Y DOÑA ESPERANZA ORTEGA SANCHEZ, PROFESOR TITULAR DE FISILOGIA Y BIOQUIMICA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE GRANADA.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que presenta, a superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, DON ALFONSO CARRERAS EGAÑA, sobre el tema "INFLUENCIA DEL SEPTUM PELLUCIDUM SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROFINAS Y PROLACTINA EN RATAS MACHO" ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los cursos 1980-81, 1981-82 y 1982-83, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del Título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, 26 de Octubre de 1983

Dr. Esperanza Ortega

Carlos Osorio Pelaez

A MI PADRE

A MI MUJER

A MI HIJO

Mi agradecimiento a:

DR.D.CARLOS OSORIO PELAEZ, por la oportunidad que me ha dado de trabajar en su equipo de investigación, por su ayuda, estímulo y dirección, sin -- los cuales este trabajo no habría podido realizarse.

DRAS.DÑA.MARIA ESTRELLA RUIZ REQUENA, DÑA. ESPERANZA ORTEGA SANCHEZ Y DÑA.CARMEN GLORIA MENDOZA OLTRAS y a los DRES.D.DARIO ACUÑA CASTROVIEJO Y D.-- FRANCISCO VIVES MONTERO, por la ayuda en la puesta a punto de las técnicas y realización de esta Tesis.

SRTAS.ROSARIO ARCA, ANTONIA CUESTA, SACRAMENTO DONAIRE, CONCEPCION MONTALBAN, AMPARO MUÑOZ, - ANTONIA NAVARRA Y MERCEDES PEREZ, por su colaboración en el trabajo experimental, y al resto del personal del laboratorio que de una forma u otra han podido - contribuir a la realización de esta Tesis.

INDICE

I N D I C E

<u>INTRODUCCION</u>	1.
GONADOTROPINAS	1.
- Hipofisis	1.
- Hormonas gonadotropicas de la adenohipofisis	2.
- Quimica de las hormonas gonadotropicas.	4.
- Biosíntesis y almacenamiento de gona- dotropinas	10.
- Secreción de gonadotropinas	13.
- Mecanismo de acción de las hormonas liberadoras de gonadotropinas	19.
- Control hormonal de la secreción de - gonadotropinas	21.
- Gonadotropinas plasmáticas	26.
- Metabolismo y secreción de gonadotro- pinas	33.
- Acciones biológicas de las gonadotro- pinas	35.

- Acciones de la FSH	35.
- Acciones de la LH	41.
PROLACTINA	45.
- Control de la secreción de prolactina .	47.
- Prolactina en plasma	52.
- Acciones de la prolactina	54.
SEPTUM	58.
<u>OBJETO DE LA TESIS</u>	64.
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	66.
- Reactivos	66.
- Tampones	71.
- Yodo radioactivo	74.
- Materiales y aparatos	74.
- Animales de experimentación	76.
- Método de destrucción del septum	76.
- Operación simulada de lesión del septum	80.

- Perfusión de cerebro	81.
- Orquidectomía	82.
- Recogida de muestras	83.
- Método de estimulación del septum	84.
- Operación simulada de estimulación	85.
- Histología	86.
- Marcaje de hormonas	91.
- Procedimiento	91.
- Resultados	93.
- Preparación de la columna sephadex ..	93.
- Valoración del primer anticuerpo	94.
- Primer anticuerpo de FSH	95.
- Primer anticuerpo de LH	98.
- Principio de radioinmunoanálisis	99.
- Determinación de hormonas	99.
- Procedimiento operativo	100.
- Preparación de la curva standard	101.
- Curva standard para FSH	101.
- Curva standard para LH	101.
- Preparación del primer anticuerpo para FSH	102.
- Preparación del primer anticuerpo para LH	102.

- Preparación de la hormona marcada	
FSH y LH	103.
- Preparación del segundo anticuerpo	103.
- Reacción antígeno-anticuerpo	103.
- Incubación	104.
- Separación de la hormona libre de la unida al anticuerpo	105.
- Medida de la radioactividad	105.
- Cálculo de resultados	105.
- Construcción de la curva standard	106.
- Protocolo para la experiencia de LH y FSH	107.
- Curva standard de LH	108.
- Curva standard de FSH	109.
- Marcaje de prolactina	110.
- Procedimiento	110.
- Resultados	112.
- Preparación de la columna sephadex ..	112.
- Valoración del primer anticuerpo de prolactina	113.
- Radioinmunoanálisis de prolactina	114.
- Curva standard para prolactina	114.
- Preparación del primer anticuerpo para prolactina	115.

- Preparación de la prolactina marcada ..	115.
- Preparación del segundo anticuerpo	116.
- Protocolo para la experiencia de pro- lactina	117.
- Curva standard de prolactina	118.
- Radioinmunoanálisis de testosterona ...	119.
- Procedimiento de extracción	121.
- Protocolo para la experiencia de tes- tosterona	123.
- Curva standard de testosterona	124.
<u>RESULTADOS</u>	125.
- Estudio estadístico	125.
- Cálculo de la media y la varianza ...	125.
- Test de comparación de dos medias. Test de comparación de dos varian- zas	126.
- Resultados de la valoración del primer anticuerpo para FSH	129.
- Resultados de la valoración del primer anticuerpo para LH	131.
- Coeficiente de variación	133.

- Tablas y gráficas de resultados 134.

DISCUSION 167.

CONCLUSIONES 184.

BIBLIOGRAFIA 186.

INTRODUCCION

G O N A D O T R O P I N A S

HIPOFISIS

La hipófisis es una glándula compleja situada en una cavidad ósea llamada la silla turca, en el esfenoides en la base del cráneo. Sus dimensiones normales en el hombre son 10 x 13 x 6 mm. y su peso es aproximadamente 0,5 gramos.

Está formada por dos lóbulos principalmente: el lóbulo anterior, llamado adenohipófisis que constituye aproximadamente el 75 % del peso total de la glándula y el lóbulo posterior o neurohipófisis. En el ser humano no se distingue el lóbulo intermedio en el adulto, aunque sí está presente en la época fetal y durante el embarazo, así como en la mayoría de los vertebrados.

Embriológicamente se desarrolla de dos esbozos diferentes. A partir de una bolsa ectodérmica situada a la altura de la membrana faríngea, se origina una evaginación que penetrando en dirección dorsal va a contactar con otra - que crece en dirección opuesta a expensas de la parte más alta del canal neural. La primera evaginación va a dar lugar a la adenohipófisis y la procedente del canal neural dará la neurohipófisis.

La adenohipófisis tiene una estructura típicamente glandular. Resultante de la conjunción de unidades glandulares funcionalmente - independientes unidas por tejido conjuntivo y rodeadas de capilares.

HORMONAS GONADOTROPICAS DE LA ADENOHIPOFISIS

En 1.927, Smith y Engle revelaron la presencia de sustancias gonadotropicas en la hipófisis. Pocos años más tarde, en 1.931, Fevold

y Col., mostraron que había dos factores presentes en la hipófisis anterior que regulaban el desarrollo y las funciones de las gónadas en hembras. Son glicoproteínas secretadas por la adenohipófisis y ejercen un control hormonal sobre la función gonadal y la reproducción.

La acción primaria de la FSH se ejerce sobre la regulación de los procesos relacionados con el desarrollo y maduración de los folículos en los ovarios y de los espermatogonias en los testículos. La LH actúa sobre las células productoras de esteroides en ambas gónadas. En el macho la LH estimula la producción de andrógenos por las células de Leydig. Evans y Col., en 1.937, introdujeron el término de hormona estimulante de las células intersticiales para la hormona que estimula las células intersticiales de los testículos pensando que esta hormona era diferente de la LH, comprobándose posteriormente que son la misma hormona. En la hembra, la LH induce la secreción de estrógenos y también participa en la ovulación haciendo que se rompan los folículos liberando el ovulo. Las accio-

nes de estas dos hormonas están limitadas al sistema reproductivo.

QUIMICA DE LAS HORMONAS GONADOTROPICAS

La LH y la FSH son hormonas glicoproteicas muy similares entre sí, cada hormona está -- compuesta por dos subunidades polipeptídicas ligadas por un enlace no covalente de gran afinidad.

Ellis, en 1.961, observó que la LH de oveja se inactivaba con disoluciones de urea 6 M. -- Más tarde Li y Starman, en 1.964, y Ward y Arnott, en 1.965, vieron que bajo ciertas condiciones la LH se disocia en dos moléculas de igual tamaño. En -- 1.966, Ward y Col., obtuvieron dos glicopeptidos de diferente composición química sugiriendo que la LH estaba compuesta por dos subunidades. Ward y Col., en 1.967, denominan a estas subunidades A y S, Papkoff y Samy, también en 1.967 las llamaron CI y CII. Fueron Pierce y Papkoff, los que en datos no publicados sugirieron los términos de subunidad α para

la subunidad común o similar a las tres hormonas glicoproteicas y subunidad β para la subunidad que lleva la especificidad hormonal.

Los estudios sobre los coeficientes de sedimentación de FSH también sugieren la presencia de un fenómeno de disociación (Papkoff y Col., 1.967). Gray en 1.967, y Ryan y Co., en 1.970, sugieren la presencia de dos subunidades. Papkoff y Ekbalad, en 1.970, disociaron las dos subunidades de FSH y Saxena y Rathnam, en 1.971, hacen lo mismo con FSH humana.

La subunidad α es común a todas las hormonas glicoproteicas (Pierce y Col., 1.971; Papkoff y Col., 1.973; Justisz y Tertrin-Claru, 1.974; Liu y Ward, 1.975 y Bishop y Col., 1.976) poseyendo esencialmente la misma secuencia de aminoácidos dentro de la misma especie. La subunidad α carece de actividad biológica.

La otra subunidad denominada β tiene distintas secuencias de aminoácidos según la -

hormona de la que se trate y es la que lleva la información que le dá la actividad hormonal específica que se expresa una vez asociada a la subunidad α . La subunidad β aislada puede tener una baja actividad hormonal propia (Catt y Col., 1.973) aunque ésta pueda ser debida a contaminación de la hormona intacta.

El peso molecular de la molécula de LH es aproximadamente 28.000 y el de la FSH aproximadamente 33.000. El peso molecular de la subunidad α común es 14.000. La variabilidad de los pesos moleculares de estos compuestos es debida a - las variaciones en los grupos de carbohidratos - unidos a la molécula y no a cambios en la secuencia de aminoácidos.

Los grupos de carbohidratos se encuentran en localizaciones específicas dentro de - la estructura de cada subunidad, teniendo dos restos la subunidad α común, un resto la subunidad β de LH y dos restos la subunidad β de FSH. Estos restos de carbohidratos abarcan aproximada-

mente el 16 % de la molécula de LH siendo más variable para la FSH. Estos restos están compuestos por manosa, galactosa, fucosa, glucosamina, galactomina y ácido sialico.

Los oligosacaridos están ramificados y su ramas terminan principalmente en ácido neuramínico , fucosa y probablemente galactosa.

El contenido de ácido sialico varía - ampliamente siendo de cinco restos en la FSH y uno o dos en la LH. Estas diferencias son responsables de las variaciones en las propiedades isoeléctricas de las gonadotropinas, las cuales son glicoproteinas ácidas con valores del Pk de 4,5 - 5 para la FSH y 5,5 para la LH. La supresión de los residuos de ácido sialico acorta drásticamente la vida media de circulación en sangre de la hormona (Van Hall y Col., 1.971). Los restos de carbohidratos también - influyen en la capacidad de las hormonas para combinarse y activar sus lugares receptores en los testículos y los ovarios (Tsuruhara y Col., 1.972; Moyle y Col., 1.975).

Cada subunidad está internamente ligada por puentes disulfuro, habiendo cinco en la subunidad α y seis en la β . No hay puentes disulfuro entre ambas subunidades ni ningún otro tipo de enlace covalente. La estructura tridimensional de las subunidades β debe ser muy similar debido a que son capaces de formar híbridos interespecíficos con subunidad α de otras especies. También las subunidades α y β de LH y FSH son intercambiables entre sí formando híbridos con actividad biológica que estará determinada por la subunidad β (Papkoff, 1.965; Saxena y Rathnam, 1.971). Las subunidades α y β se combinan para dar la hormona activa observándose que la subunidad α contiene algunos o todos los lugares de reconocimiento para el receptor y se observa además que la subunidad β solo adquiere una conformación activa después de combinarse con la subunidad α . Aloj y Col., en 1.973, vieron que se producían cambios conformacionales durante la asociación de las subunidades aisladas.

Si se modifica químicamente la sub-

unidad α ésta no se recombina con la subunidad β nativa y si lo hace, no se expresa la actividad hormonal (Bishop y Col., 1.976).

Cuando se aplican análisis de subunidades en tejidos y fluidos corporales, estos radioinmunoanálisis específicos han mostrado cantidades significativas de subunidad α en hipófisis, placenta, plasma y orina. En hembras no preñadas, aparece un exceso de subunidad α en hipófisis, suero y orina (Prentice y Ryan, 1.975) y un aumento de subunidades α en circulación después de estimular la secreción de gonadotropinas con GnRH (Hagen y McNelly, 1.975).

La aparición de subunidades α en circulación en respuesta al GnRH es debida a la secreción por la hipófisis de las subunidades libres y no a la disociación periférica del LH secretado (Edmons y Col., 1.975).

Las subunidades α son frecuentemente formadas y liberadas por la hipófisis, mientras

que las subunidades β están limitadas en su producción en la biosíntesis de hormonas glicoproteicas, sugiriendo el papel limitador de la proporción de la subunidad β en la síntesis de hormonas glicoproteicas.

La amplia formación de la subunidad α por células neoplásicas y posiblemente por -- ciertas bacterias indican que pueden ser una antigua proteína con una función general en la relación celular.

BIOSÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE GONADOTROPINAS

La LH y la FSH son sintetizadas y segregadas por las células hipofisarias (Baker y Col., 1.972). La naturaleza glicoproteica de estas hormonas es la responsable de la tinción de los gránulos de las gonadotropas por colorantes que reaccionan con los carbohidratos, tales como el azul alcian o el reactivo ácido de Schiff.

En la rata, las gonadotropas son - grandes células redondas que contienen dos poblaciones de gránulos de diámetros de 200 mm. unos y entre 400 y 500 mm. otros y tienen el retículo endoplasmático rugoso en forma de vesículas -- (Farquhar y Col., 1.975). En la hipofisis humana las gonadotropinas están presentes en células de pequeño a mediano tamaño por todo el "pars distalis" en acinos formados predominantemente por otros tipos de células y a menudo contienen dos - tipos de gránulos diferentes (Phifer y Col., - 1.973).

En ratas, por estudios inmunocitoquímicos con microscopio óptico (Baker y Col., - 1.972) y con microscopio electrónico (Moriarty, 1.976) se ha visto que algunas gonadotropas contienen las dos hormonas, mientras que otras sólo contienen una de las dos hormonas. Las gonadotropas muestran cambios morfológicos de machos a - hembras y durante los diferentes estados de actividad secretora. La presencia de LH y FSH en la misma población celular es consistente con la secreción acoplada de éstos y con los efectos si-

multáneos del GnRH sobre la secreción de ambas -
hormonas en varias especies.

La biosíntesis de hormonas gonado-
tropicas se cree que ocurre por los procesos nor-
males de síntesis ribosomal de cadenas peptídi-
cas con la subsiguiente adición de los restos car-
bohidratados. Los azúcares situados más profunda-
mente como la manosa son añadidos probablemente
en el retículo endoplasmático rugoso después de
la síntesis de las cadenas polipeptídicas de las
subunidades. La adición de los azúcares termina-
les tales como galactosa, fucosa y ácido sialico
es generalmente efectuada en el apartado de Gol-
gi, aunque también puede ocurrir en el retículo
endoplasmático durante estados de actividad aumen-
tada (Farquhar y Col., 1.975).

La subunidad α es biosintetizada -
más activamente tanto por la hipofisis como por -
la placenta, la infusión de GnRH produce la libe-
ración de LH y de subunidades α en hombres nor-
males (Edmonds y Col., 1.975). La concentración -

de subunidades β es relativamente baja en hipófisis y placenta y raramente se encuentra en plasma. Así parece probable que la formación de la respectiva subunidad β actúe de marcapasos en la biosíntesis de las hormonas glicoproteicas hipofisarias y placentales. Este hecho está apoyado por los estudios de Landsfeld y Col., en 1.976, sobre el RNA mensajero de ambas subunidades en células corionicas y de la placenta. El RNA mensajero de la subunidad α se detecta fácilmente, mientras que el de la subunidad β es difícil de detectar.

SECRECION DE GONADOTROPINAS

La secreción de las hormonas de la hipófisis anterior está controlada por el sistema nervioso por medio de peptidos liberadores e inhibidores que son llevados a la adenohipófisis por el sistema porta hipofiseal. Los factores liberadores e inhibidores son el puente entre el hipotálamo y la hipófisis (Schally y Col., 1.968; McCann y Porter, 1.969; Burgus y Guillemin, 1.970).

Las hormonas liberadoras estimulan la liberación y síntesis de las hormonas de la hipófisis anterior, sus efectos son rápidos produciendo exocitosis y la descarga de los gránulos de las células hipofisarias. La liberación puede ocurrir en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas.

Los factores liberadores son sintetizados en neuronas especializadas del hipotálamo y posteriormente transportadas a través de fibras nerviosas a la eminencia media donde se almacenan y desde la cual son liberados en el sistema porta-hipofisario y conducidos de este modo a la hipófisis anterior en donde ejercen sus funciones (Porter y Col., 1.971; Vale y Col., 1.973; Rodgers, - 1.975; Labrie y Col., 1.976).

McCann y Col., en 1.960, establecieron la existencia de un factor de liberación de LH que controla la secreción llamado LHRH, o bien GnRH que es capaz de estimular la liberación tanto de LH como FSH. Este GnRH es activo para libe-

rar la hormona en dosis del orden de nanogramos (Fawcett y McCann, 1.971). El LHRH es un decapeptido que fué aislado por primera vez del hipotálamo del cerdo por Schally y Col., en 1.971).

Bremner y Paulsen, en 1.974, sugieren la existencia de dos reservas de LH en la hipófisis humana. Las observaciones de Lasley y Col., en 1.975, indican la existencia de una reserva preformada de LH que es liberada rápidamente por el GnRH de acuerdo con las observaciones "in vitro" de que esta liberación inicial de LH en respuesta al GnRH no requiere síntesis de proteínas. La segunda reserva puede representar una liberación más organizada por los granulos de las gonadotropas junto con la estimulación de la biosíntesis de hormonas.

La FSH a diferencia de la LH, durante la infusión de GnRH muestra solo un simple aumento de sus niveles en plasma. La falta de una respuesta primaria de FSH nos indica, o bien la falta de una reserva de granulos rápidamente

liberables en las gonadotropas, o bien que esta reserva necesita la estimulación de un factor de liberación más específico. Los datos experimentales favorecen ésta última posibilidad.

Igarashi y McCann, en 1.964, demostraron la existencia de un factor de liberación de FSH. Dhariwal y Col., 1.965; Schally y Col., 1.966; Kobayashi y Col., 1.967; Igarashi y Col., 1.968 y Justisz, en 1.970, informaron que la FSHRH se podía separar del LHRH por filtración en sephadex, aunque estudios más recientes usando radioinmunoensayo no han logrado separar el FSHRH (Fawcet y McCann, 1.971; Schally y Col., 1.971).

Las observaciones de Gay y Col., en 1.970; Daane y Parlow, en 1.971; Kalra, Ajika y Col., en 1.971; Kalra, Krulich y Col., en 1.971 y McCann y Col., en 1.972 muestran que el sistema de control de FSH es distinto de el de LH, indicando que o existe un FSHRH separado o que la sensibilidad de la hipófisis a un solo RH está más

marcada para la LH que para la FSH o que el mecanismo de realimentación ejercido por los esteroides e inhibina modifique la respuesta de la hipófisis al LHRH.

Aunque Watanabe y McCann, en 1.968, localizaron el FSHRH en una zona no coincidente con la zona en que Schneider y Col., en 1.969, y Crichton y Col., en 1.970, localizaron el LHRH. En estudios más recientes utilizando radioinmunoensayo Quijada y Col., en 1.971, han mostrado que las áreas que contienen FSHRH y LHRH son coextensivas y se extienden de la región supraquiasmática al área de la eminencia media y núcleo arcuato.

Sin embargo, cuando el LHRH porcino fué obtenido en un estado altamente purificado se vió que éste era capaz de liberar LH y FSH en humanos (Kastin y Col., 1.969). Igualmente preparaciones de LHRH y FSHRH purificadas de origen humano no mostraron que estas dos actividades no podían ser separadas (Kastin y Col., 1.971). La LHRH sin

tética es capaz de liberar LH y FSH "in vivo" e "in vitro", esto ha llevado a la hipótesis de un solo factor de liberación llamado GnRH que controla las secreciones de ambas gonadotropinas hipofisarias.

El GnRH se secreta al sistema porta-hipofiseal de forma pulsátil (Wang y Col., 1.976, Nakai y Col., 1.978). La administración continua de GnRH en animales con lesiones hipotálamicas, inhibe la secreción de gonadotropinas. La secreción de gonadotropinas depende pues más del patrón de GnRH que de la cantidad de esta secretada.

La secreción intermitente de GnRH permite la regeneración de los receptores de esta en las gonadotropas de la hipófisis mientras que la infusión continua no (Knobil, 1.980). Los cambios en la frecuencia de estimulación por GnRH no solo puede alterar la concentración de LH y FSH sino que puede alterar la relación entre las concentraciones de ambas (Hausler y Col., 1.979).

MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS LIBERADORAS
DE GONADOTROPINAS

La principal acción de los factores liberadores de gonadotropinas es estimular una liberación inmediata de gonadotropinas de las células de la hipófisis. Además los factores de liberación también estimulan la biosíntesis de las -- hormonas (McCann, 1.971).

Hay dos teorías sobre el mecanismo de acción de los factores liberadores de gonadotropinas:

La primera es la teoría del acoplamiento estímulo-secreción de Douglas y Poisner , 1.964. Según esta hipótesis, los factores de liberación inducirían un cambio en la permeabilidad de la membrana celular de las gonadotropinas que llevaría a la despolarización de la membrana celular y la captación de calcio. Los iones de calcio podrían entonces activar el proceso de liberación por algún mecanismo desconocido.

La otra hipótesis postula que el sistema de la adenil-ciclasa está implicado. Según esta hipótesis los factores de liberación se combinan con receptores específicos en la membrana celular que podrían causar la activación de la adenil-ciclasa llevando a la formación de AMP cíclico a partir de ATP. El AMP cíclico de alguna forma llevaría a la liberación de la hormona, (Kraicer, 1.975).

Una posible resultante de la combinación de estas dos teorías sería que el AMP cíclico producido como resultado de la activación de la adenil-ciclasa podría actuar sobre la membrana celular o sobre otros gránulos celulares, tales como las mitocondrias y causar la captación de calcio que podría entonces activar el proceso de liberación.

La acción del AMP cíclico podría incluir a la protein kinasa en la hipófisis como en otros muchos tejidos. Esta protein kinasa podría estar incluida en la estimulación de la síntesis

de proteínas, la cual puede ocurrir bajo la influencia de los LHRH (LaBrie y Col., 1.971).

La unión de la neurohormona al receptor localizado en la membrana plasmática podría estimular la actividad de la adenil-ciclasa. Los cambios en los niveles intracelulares de AMP cíclico podrían entonces modular la actividad de la protein kinasa y producir cambios en los niveles de fosforilación de diferentes substratos proteínicos intracelulares. Aumentando los niveles de AMP cíclico que producirían cambios en la actividad de varios procesos especializados de las correspondientes células hipofisarias (LaBrie y Col., 1.979).

CONTROL HORMONAL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

El control hormonal de la secreción de gonadotropinas depende de los niveles plasmáticos de testosterona, estrógenos, progesterona y de la propia LH y FSH. Estas hormonas ejercen sus acciones sobre el hipotálamo y la hipófisis mediante

mecanismos de retroalimentación positivos y negativos.

Las gonadotropinas hipofisarias pueden ejercer un efecto de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo inhibiendo la liberación de gonadotropinas (David y Col., 1.966; Corbin y Story, 1.967; Martini y Col., 1.968). La inyección artificial de LH disminuye los niveles de LHRH - circulante en sangre (McCann y Porter, 1.969) y bloquean la respuesta de la hipófisis a este LHRH (Watson y Col., 1.970). Esta retroalimentación de gonadotropinas probablemente solo funciona para los niveles máximos de la liberación de gonadotropinas.

Existe un sistema de retroalimentación negativa de la testosterona en machos. Lee y Col., en 1.972, observaron diferencias en la inhibición de LH y FSH. La administración artificial de la testosterona a dosis fisiológicas produce una disminución en los niveles plasmáticos de LH (Sherins y Loriaux, 1.973; Stewart-Bentley, Odell

y Horton, 1.974). Sin embargo, para lograr un efecto supresor sobre la FSH se necesitan dosis muy superiores, equivalentes a 5 veces la secreción diaria de testosterona (Stewart-Bentley, Odell y Horton, 1.974).

Es probable que la testosterona por sí misma no sea la que ejerce estos efectos, sino que se convierta previamente en otro esteroide, - puede que sea la progesterona, o bien la dihidrotestosterona, o los isómeros $3-\alpha$ ó $3-\beta$ del $5-\alpha$ androstendiol. Si se añade testosterona directamente a un cultivo de células de la hipófisis se inhibe la liberación de LH producida por LHRH - poniendo de manifiesto que la testosterona ejerce un efecto directo sobre la hipófisis, independiente del que realiza al convertirse en sangre periférica en estrógenos (Santen y Col., 1.973).

Sherius y Col., 1.971 y Odell y Moyer en 1.971, sugirieron que la testosterona no es suficiente para mantener reprimida la FSH. Ramirez y McCann, en 1.963 y 1.965, postularon que los estróge-

nos pueden sinergizar con la testosterona para mantener reprimida la secreción de gonadotropinas en machos.

Las hormonas sintetizadas en el ovario pueden actuar sobre algunos centros cerebrales o directamente sobre la hipófisis anterior modificando su actividad a través de mecanismos de retroalimentación positivos o negativos. Moore y Price, 1.932, consideraban que el ovario y la adenohipófisis estaban unidos por un sistema rígido de interacciones hormonales.

Nillius y Wide, en 1.970; Yen y Tsa, en 1.971; Wise, Gross y Schalch, en 1.973, demostraron en mujeres postmenopausicas el efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos sobre la liberación de gonadotropinas. Esta retroalimentación negativa de los estrógenos es el factor principal que mantiene relativamente bajas concentraciones basales de LH y FSH en plasma (Vande-Wiele y Col., 1.970; Knobil, 1.974).

Los lugares de acción del estradiol parecen ser a nivel del hipotálamo y de la hipof^{is} anterior. En el hipotálamo, disminuyen la secreción de GnRH (Davison y Col., 1.976) mientras que en la hipófisis, el efecto inhibitorio lo ejercen disminuyendo la sensibilidad de las gonadotropas al GnRH (McCann, 1.974; Davinson y Col., - 1.976).

Bajo ciertas condiciones los estrogénos pueden estimular en vez de inhibir la secreción de gonadotropinas (Hohlweg y Junkman, 1.932). Se ha visto en animales de experimentación que los estrogénos pueden estimular la liberación de LH - (Everett, 1.964). La administración de una dosis - adecuada de estrógenos dispara la liberación de LH en mujeres (Nillius y Wide, 1.971; Levendecker, - Wardlaw y Nocke, 1.972; Monroe, Jaffe y Migley, - 1.972; Yen y Tsa, 1.972; Shaw, 1.975) y en monos - Rhesus (Knobil, 1.974).

La progesterona es menos efectiva que los estrogénos para inhibir la liberación de gonadotropinas (Nallar, Antunes-Rodrigues y McCann, -- 1.966; Nillius y Wide, 1.971). La progesterona tie-

ne una pequeña acción de retroalimentación negativa sobre la secreción basal de gonadotropinas (Larsson-Cohn, Johansson, Wide y Genzell, 1.972; Zeil-maker, 1.966). El lugar de acción es principalmente en el hipotalamo aunque se indican algunos efectos sobre la hipófisis (Baker, Eskin, August, -- 1.973). La progesterona en pequeñas cantidades puede sinergizar con los estrógenos para mantener reprimida la secreción de LH en la hembra (Ramirez y McCann, 1.963, 1.965).

La progesterona puede tener un efecto de retroalimentación positiva administrándola en la última parte del proestrus avanzando la ovulación en ratas (Everett y Sawyer, 1.949) e induciendo la liberación de LH (Nallar, Antunes-Rodrigues y McCann, 1.966).

La FSH al llegar al folículo induce la secreción de inhibina-F la cual inhibe la secreción de FSH por la hipófisis (Barracough, 1.981).

GONADOTROPINAS PLASMATICAS

Las hormonas glicoproteicas circulan en la sangre en formas moleculares generalmente si

milares a aquéllos extraídos de la hipofisis aunque han sido detectadas pequeñas diferencias entre ambos.

Prentice y Ryan, en 1.975, por filtración en gel de LH y FSH plasmáticos, vieron que la mayoría corresponde a la forma monomérica de la forma aislada en la hipófisis y pequeñas cantidades de una forma mayor, la cual puede presentar la proteína ligada a material agregado.

El contenido ácido sialico de las hormonas gonadotropicas y otras glicoproteicas tienen un gran efecto sobre el grado de eliminación de la circulación. También el tamaño molecular aparente de ciertas gonadotropinas está influido por la eliminación de residuos de ácido sialico (Bogdanove y Col., 1.974; Peckham y Knobil, 1.976).

Van Hall y Col., en 1.971 y Duffau y Col., en 1.971, midieron la concentración de LH y FSH en circulación por radioinmunoanálisis utilizando antisueros provocados contra las hormonas purificadas. La separación del anticuerpo ligado a la -

hormona marcada con ^{125}I durante el radioinmunoanálisis se hace por precipitación con un segundo anticuerpo o por procedimientos en fase sólida. - Otros métodos como la absorción del trazador libre o la precipitación química del complejo ligado han sido empleados con menor frecuencia.

Para obtener antisueros contra FSH se ha usado la misma hormona, pero para obtener los antisueros contra LH se ha usado frecuentemente la hCG dada su similitud y su más fácil obtención. Se han utilizado antisueros contra la subunidad β de las glicoproteínas mejorando así la especificidad del análisis diferenciando de esta forma la LH de la hCG (Vaitukaitis y Col., 1.976; Vandalem y Col., 1.975; Chen y Col., 1.976). En los análisis corrientes de LH y FSH se utilizan antisueros provocados contra preparaciones purificadas de las respectivas hormonas.

Las concentraciones plasmáticas de LH y FSH se expresan normalmente en términos de preparaciones standard calibradas en unidades biológicas, siendo del orden de varios nanogramos por

mililitro.

Utilizando radioinmunoensayos se han efectuado los perfiles de secreción de las gonadotropinas y hormonas esteroides durante el ciclo menstrual. En un ciclo normal los niveles de LH aumentan lenta pero progresivamente durante la fase folicular antes del pico preovulatorio de mitad del ciclo y disminuye progresivamente durante la fase lutea. Los valores de FSH aumentan durante la primera mitad de la fase folicular, disminuyendo durante la segunda mitad antes del pico preovulatorio, coincidiendo con el de la LH, después disminuye progresivamente durante la fase lutea - hasta pocos días antes de la menstruación en los que aumenta de nuevo (Neill, Johansson, Datta y Knobil, 1.967; Midgley y Jaffe, 1.968; Mishell, Nakamura, Crosignani, Stone, Kharma y Nagaya, -- 1.971; Abrahan, Odell, Swerdloff y Hopper, 1.972).

Los niveles de estradiol y dihidroprogesterona aumentan marcadamente durante la última parte de la fase folicular disminuyendo ligeramente durante la ovulación, aumentando de nuevo du-

rante la fase lutea, cayendo otra vez al final de la fase lutea. La concentración de progesterona - en plasma se mantiene baja durante la fase folicular y empieza a aumentar durante la ovulación alcanzando sus valores máximos 8 o 10 días después de los picos de LH y FSH despues de lo cual los niveles de progesterona caen progresivamente hasta la menstruación. Ross, Cargille, Lipsett, Rayford, Marshall, Strott y Rodbard, 1.970, atribuyen los cambios en la concentración de gonadotropinas a los cambios en los niveles de los esteroides sexuales. Se cree que los cambios en los niveles de LH y FSH durante los ciclos normales son - debidos a acciones de retroalimentación positiva y negativa de los esteroides sexuales ovaricos sobre la secreción hipotalámica de GnRH y sobre la respuesta de las células de la hipofisis a las hormonas hipofisiotropicas.

La ovulación está precedida por oleadas expontáneas de LH y FSH, siendo la concentración plasmática de ambas gonadotropinas mayores - durante la fase folicular.

El papel jugado por la FSH en el proceso ovulatorio permanece desconocido y el hecho de que coincida con el pico de LH puede ser simplemente debido a que el GnRH libera las dos gonadotropinas. Sin embargo, aunque la LH por sí sola pueda producir la rotura del folículo, hay evidencias que sugieren que la LH y la FSH trabajan sinérgicamente (Harrington y Bex, 1.970).

Además de las fluctuaciones mensuales que caracterizan al ciclo menstrual hay variaciones de las gonadotropinas durante las diferentes etapas del desarrollo (Midgley y Jaffe, 1.971). Después del nacimiento de la hCG y los estrógenos plasmáticos están elevados mientras que la LH y FSH son muy bajas. Durante la primera semana la hCG deja de detectarse y los estrógenos caen al nivel prepuberal. En los machos esta va seguida por un rápido, pero pasajero aumento en suero de los niveles de LH y FSH con un aumento secundario en suero de testosterona y estradiol. La LH y FSH aumentan durante las primeras semanas de vida, descendiendo a los niveles prepuberales hacia el cuarto mes. En las hembras el

aumento de FSH es más marcado y prolongado, no cayendo los valores plasmáticos al nivel prepuberal hasta los 4 años de edad (Winter y Col., 1.975). Durante todo el periodo prepuberal la concentración de FSH se mantiene superior a la de LH.

En la pubertad aparece una liberación pulsátil de gonadotropinas, al principio aparecen los picos de LH (Boyar y Col., 1.972). Durante la pubertad aumenta la secreción de gonadotropinas, siendo ésta cuatro veces mayor - para FSH y dos veces mayor para LH en comparación con los niveles de secreción prepuberales (Rifkind y Col., 1.967).

La liberación pulsátil de gonadotropinas establecida durante la pubertad está caracterizada por un aumento rápido durante 10 - 15 minutos seguida de una caída lenta con un periodo medio de 50 minutos para la LH y algo mayor para FSH. Los pulsos de LH y FSH frecuentemente coinciden, pero no siempre. Durante el ciclo menstrual los pulsos ocurren a intervalos

de 1 - 2 horas durante la fase folicular y de 4 horas durante la fase lutea. Durante la vida adulta el cociente FSH/LH se invierte manteniéndose los niveles de LH superiores a los de FSH después de la menopausia o la castración, las gonadotropinas circulantes están muy elevadas - debido a la supresión de la acción de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales.

METABOLISMO Y SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

El hígado y el riñón juegan un gran papel en la eliminación y excreción de las hormonas hipofisarias. La vida media en circulación de la LH es aproximadamente de 30 minutos, siendo de 3 horas la de FSH. El grado de eliminación metabólica es de aproximadamente 25 ml/min. y no está afectada por la función gonadal del individuo. A pesar de la similitud de estas hormonas, sobre todo LH y hCG, hay una gran diferencia en la eliminación plasmática renal de estas hormonas. Las diferencias en los -

sustituyentes glucídicos de la molécula son importantes determinantes del metabolismo.

El tiempo de supervivencia de las glicoproteínas en circulación está muy influenciado por el contenido de ácido sialico de la molécula, siendo más prolongado para las moléculas más altamente sialificadas. Así la FSH con un contenido de un 5 % de ácido sialico tiene una vida media en sangre pequeña y todavía más pequeña para la LH que sólo tiene un 2 %.

La eliminación enzimática de ácido sialico hace que las hormonas glicoproteicas sean eliminadas rápidamente de la circulación, principalmente por vía hepática, después de unirse a receptores para asialoglicoproteínas en el hígado (Ashwell y Morell, 1.974). La pérdida del ácido sialico no afecta la actividad biológica intrínseca a nivel de los tejidos.

La mayoría del metabolismo de las glicoproteínas hipofisarias ocurre en lugares extragonadales.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LAS GONADOTROPINAS

Las funciones biológicas de LH y FSH son estimular la maduración y funcionamiento de los testículos y ovarios y regular la gametogénesis y la esteroidogénesis de las gónadas.

ACCIONES DE LA FSH

Los efectos biológicos de la FSH se ejercen sobre la maduración y funcionamiento de las células somáticas inmediatamente asociadas con la gametogénesis. Es responsable del desarrollo completo del folículo ovárico en la hembra después del estado de formación del antro, actuando sinérgicamente con LH y es necesario para los pasos finales de la maduración espermiática en el macho localizándose principalmente en las células de sertoli en los tubos seminíferos en los testículos (Steinberger, 1.975).

La FSH se une a receptores ováricos sobre todo en las células de la granulosa, mien-

tras que los receptores de LH están presentes en las células tecales, intersticiales y luteas y - en un grado variable en las células de la granulosa (Midgley, 1.973).

El contenido folicular de receptores para FSH aumenta por proliferación de las células de la granulosa o bien por un aumento del número de receptores en cada célula sufriendo - entonces la formación del antro. Los altos niveles de FSH y estradiol en el fluido del antro estimulan un aumento en la proporción de mitosis - de las células de la granulosa, así como de su - capacidad biosintética y en el número de receptores para LH en estas células (Zelevnik, Midgley y Reichert, 1.974; McNatty y Sawers, 1.975; Channig y Tsafiriri, 1.977). Este proceso está regulado por la presencia en el líquido folicular de - inhibidores (LI) y estimuladores (LS) de la luteinización (Anderson y Hoover, 1.981). La maduración folicular está por tanto asociada a la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa (Channig y Kammerman, 1.974). El control de estos cambios celulares en las actividades mediadas por - FSH puede estar ejercida a través de cambios en

la concentración de los estrógenos sobre la respuesta ovárica a los niveles de FSH.

En la maduración del folículo intervienen principalmente FSH, andrógenos, estrógenos, LH y prolactina. De estas hormonas, FSH, andrógenos y estrógenos son responsables de la proliferación de las células de la granulosa y del aumento de su capacidad biosintética, mientras que la LH es responsable de parar la proliferación de las células de la granulosa y junto con la prolactina es responsable de iniciar la luteinización de estas células. Así una secuencia definida de cambios hormonales en el microambiente de los folículos de Graafian desarrollados es necesaria para el crecimiento de los folículos y para la actividad esteroideogénica - de las células de la granulosa antes y después de la ovulación. Así la secuencia FSH-FSH más - estradiol-FSH más LH más estradiol parece ser - esencial para la maduración y proliferación de las células de la granulosa, así como para producir la máxima actividad de biosíntesis de esteroides (McNatty y Sawers, 1.975; McNatty, Bennie, Hunter y McNeilly, 1.975).

Otra acción importante de la FSH en las células de la granulosa es la estimulación de la aromatización de los andrógenos para formar 17- β -estradiol. Los trabajos de -- Falck, en 1.965; Hilliard y Col., en 1.974; - Mills, en 1.975; McNatty y Col., en 1.976 y Erickson y Ryan, en 1.976, dan soporte a la teoría bicelular de la biosíntesis de estrógenos, sugiriendo que los andrógenos secretados por la teca difunden por el fluido folicular y son aromatizados a estrógenos por las células de la granulosa.

El descubrimiento de que la FSH aumenta la producción de estrógenos por estimulación del sistema de enzimas aromatizantes, el cual utiliza los andrógenos formados por las células de la teca bajo la influencia de LH, ha llevado a sugerir un modelo en el que intervienen dos tipos celulares y las dos gonadotropinas para el control de la biosíntesis de estrógenos. Este mecanismo de control implica las acciones físicamente separadas y bioquí

micamente distintas de la FSH y LH y explica el sinergismo entre las dos gonadotropinas en la relación de la biosíntesis y secreción de estrógenos (Armstrong y Papkoff, 1.976).

En los testículos la FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis debido a su acción sobre las células de los tubos seminíferos. El mantenimiento de la espermatogénesis depende de la presencia de una alta concentración de testosterona intratesticular, la cual a su vez depende de la acción esteroidogénica de la LH en las células de Leydig. Aunque la FSH no es esencial para completar la espermatogénesis en el adulto, hay pocas dudas de que es necesaria para la maduración de los túbulos durante el desarrollo y para iniciar la secuencia espermatogénica durante la pubertad (Steinberger, 1.975). Las acciones de FSH sobre los tubos seminíferos se ejercen sobre las células de Sertoli, las cuales son las "células diana" para la FSH en los testículos (Means y Col., 1.976). La FSH estimula la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos en los testículos de la

rata (Steinberger, 1.971).

La unión de la FSH a los receptores de membrana en las células de Sertoli está seguida por la activación de la adenil-ciclasa en la membrana celular y aumenta los niveles intracelulares de AMP cíclico. Esto lleva a la activación del AMP cíclico de la proteinkinasa en el citosol y la consecuente fosforilación de varias proteínas que median los efectos bioquímicos de la FSH, éstos incluyen un aumento en la síntesis de RNA y proteínas celulares (Means y Col., 1.976), aumenta la formación de una proteína específica transportadora de andrógenos (Fritz, 1.973) y la conversión de testosterona en estradiol (Dorrington y Armstrong, 1.975). Los efectos de la FSH están ejercidos principalmente sobre las células de Sertoli inmaduros y sobre el proceso que inicia la división meiótica de los espermatocitos (Steinberger, 1.975).

ACCIONES DE LA LH

La LH en los testículos y los ovarios actúa predominantemente sobre el proceso esteroidogénico dando como resultado la biosíntesis y secreción de andrógenos y progesterona. Estos efectos están iniciados por la unión de la hormona circulante a receptores específicos de alta afinidad en la membrana celular (Catt y Col. 1.972; Lee y Ryan, 1.972) que llevan a la activa ción de la adenil-ciclasa y probablemente otras respuestas asociadas a membranas que median la acción de la hormona sobre la esteroidogénesis (Catt y Duffau, 1.976). Las acciones celulares de la LH están ejercidas sobre las células de Leydig o las células intersticiales de los testículos y sobre varios tipos celulares en los ovarios.

Los receptores específicos de alta afinidad de las células diana son moléculas proteicas con poca cantidad de componentes fosfolípidos o carbohidratos (Duffau y Catt, 1.976). Estas moléculas receptoras son asimétricas y ligeramente hidrofóbicas por naturaleza. Tienen un

peso molecular aproximadamente de 200.000 y cada molécula de receptor se une a una sola molécula de gonadotropina. Los receptores de LH de los testículos parecen estar compuestos por subunidades de peso molecular aproximado de 90.000.

En las células de Leydig la unión de la LH a los receptores de la membrana plasmática está seguido por la estimulación de la actividad de la adenil-ciclasa y la elevación de los niveles de AMP cíclico intracelular (Mendelson y Col., 1.975). El aumento de la formación de AMP cíclico lleva a la activación de la proteinkinasa en el citoplasma de las células de Leydig y la subsiguiente fosforilación de proteínas que se cree que regulan los primeros pasos en la esteroidogénesis (Podesta y Col., 1.976).

Es probable que la fosforilación de los componentes que influyen en el transporte del colesterol, o en el sistema enzimático que separa la cadena lateral del colesterol, o ambas, sean una parte importante de la secuencia

que lleva al aumento de la esteroidogénesis.

Las acciones de las gonadotropinas sobre la biosíntesis de esteroides dependen también de la síntesis de RNA y proteínas. Tales -- proteínas pueden funcionar como un regulador del proceso que lleva a la biosíntesis de andrógenos y su secreción (Cooke y Col., 1.975). La regulación de la biosíntesis de testosterona por LH ocurre en las primeras etapas del camino biosintético, principalmente sobre la conversión de colesterol en pregnenolona en la mitocondria.

Las evidencias aportadas por los - trabajos de Mendelson y Col., en 1.975; Cooke y Col., en 1.976 y Duffau y Col., en 1.977, apoyan el concepto de que el mecanismo por el cual la - LH induce la síntesis de esteroides depende de pequeños cambios en la producción de AMP cíclico que llevan a un aumento de la actividad de la kinasa proteica, la fosforilación de los componentes celulares reguladores y la síntesis de las - proteínas que regulan la ruta esteroidogénica.

Mendelson y Col., en 1.975, postulan que existe un número de receptores en las - células de Leydig muy superior al necesario, -- puesto que la ocupación de un pequeño tanto - por ciento de estos receptores es suficiente para producir la respuesta esteroidogénica, es - pues, un mecanismo para aumentar la sensibili- dad de la respuesta celular a bajas concentra- ciones de gonadotropinas (Catt y Duffau, 1.973). También puede ser debido a la necesidad de una reserva de receptores, por si éstos lugares son degradados después de la interacción hormona-receptor permitiendo el reemplazamiento de estos lugares.

En el ovario las acciones bioquí- micas de la LH para producir la esteroidogénesis son también mediadas por el AMP cíclico y la proteinkinasa. El desarrollo de receptores para LH en los folículos ováricos lleva a un aumento en la respuesta de la adenil-ciclasa y AMP cíclico que lleva a la maduración de las células de la - granulosa (Channing y Leowitz-Rigby, 1.975; Lee,

1.976). También hay receptores para LH en el cuerpo luteo (Lee y Col., 1.973). La activación de estos receptores por acción de las gonadotropinas - es seguida por la formación de AMP cíclico y síntesis de progesterona (McDonald y Greep, 1.972).

PROLACTINA

La prolactina es una hormona peptídica que difiere en su estructura y acciones de LH y FSH, siendo similar a la hormona del crecimiento (GH). Fué descubierta en 1.928 por Stricker y Grueter, pero hasta 1.970 no se obtuvieron evidencias claras que pudieran separar la prolactina de la GH como hormonas diferentes (Frantz y Kleinberg, 1.970; Friesen y Col., 1.970; Forsyth y Myres, 1.971; Forsyth y Col., 1.971) y fué aislada en hipófisis humana por Lewis y Col., en 1.971. - Las acciones de la prolactina están ejercidas por todo el organismo además de sus efectos característicos sobre los tejidos reproductores. En mamíferos, los efectos de la prolactina sobre la reproducción incluyen la estimulación y mantenimiento

to del crecimiento de las mamas y la secreción de leche, así como otras acciones sobre los testículos y ovarios y tejidos accesorios. La prolactina es pues, una hormona metabólica, sus acciones sobre los tejidos reproductores forman - solo una pequeña parte de sus amplios efectos - sobre el metabolismo y el crecimiento en una -- gran variedad de tejidos diana (Cowie y Forsyth, 1.975).

La prolactina tiene un peso molecular aproximado de 22.000, la hormona está constituida por una sola cadena polipeptídica de 198 aminoácidos libre de grupos de carbohidratos. - Dentro de la cadena tiene 3 puentes disulfuro entre los restos de cistina 4-11, 58-173 y 190-198. Hay algunas evidencias que indican la existencia de una molécula precursora de mayor peso molecular, esta pre-prolactina sería pasada a prolactina por las propias células de la hipófisis (Frantz, 1.976; Evans y Rosenfeld, 1.976; Mauver y Col., 1.976; Dannies y Tashjian, 1.976; Mauver y Col., 1.977).

Las células productoras de prolactina son las lactotropas, estas células constituyen al menos la tercera parte de la población celular de la hipófisis normal (Zimmerman y Col. 1.974). En la rata las lactotropas están frecuentemente rodeando a las células gonadotropicas, tienen forma de taza y reticulo endoplasmático rugoso abundante y grandes gránulos redondos de 600-900 mm. de diámetro, en los estados en los que la secreción está aumentada los gránulos -- son pequeños de tamaño y de forma irregular - (Farquhar y Col., 1.975).

CONTROL DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

La prolactina, junto a la hormona de crecimiento son las únicas hormonas de la adenohipófisis que carecen de regulación por retroalimentación por hormonas producidas en alguna glándula diana, aunque se han aportado evidencias sobre la posibilidad de una retroalimentación positiva desde el tejido mamario sobre -

la secreción de prolactina (Northrup y Col., 1.975; Harada, 1.976; Cole y Col., 1.976).

El control primario de la secreción de prolactina está ejercido por una doble regulación hipotalámica con un sistema de factores liberadores e inhibidores. El hipotálamo ejerce un control inhibitorio tónico sobre la secreción de prolactina, la interrupción de las conexiones hipotálamo-hipófisis aumenta los niveles de prolactina en suero (Turkington, 1.971; Siler y Col., 1.972). Hay dos factores hipotalámicos que controlan la secreción de prolactina, el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF) y el factor liberador de prolactina (PRF). Las neurohormonas son liberadas por terminaciones situadas en la eminencia media y transportadas a su lugar de acción en la lactotropa por el sistema hipofisario.

Hay evidencias que indican que la dopamina hipotalámica es el factor inhibidor de la liberación de prolactina (Van Maanen y Smelik, 1.968; McLeod y Col., 1.976). La presencia de do-

pamina en la sangre porta-hipofiseal, pero no de noradrenalina apoya la idea de que la dopamina - actúe como PIF (Ben-Jonathan y Col., 1.977; Ben-Jonathan y Col., 1.980). La administración de agonistas de la dopamina produce un efecto progresivo similar sobre la secreción de prolactina - (Lachelin y Col., 1.977). También se han encontrado receptores específicos para dopamina en las células secretoras de prolactina (Kimura y Mc - Leod y Col., 1.975; Cronin y Col., 1.978).

El ácido γ -aminobutirico (GABA) es capaz de modificar la secreción de prolactina. Se han descrito receptores específicos para GABA en la hipófisis (Grandison y Guidotti, 1.979) y se ha demostrado que el GABA que se encuentra en esta glándula tiene su origen en el sistema nervioso central (Racagni y Col., 1.979). El GABA - ejerce una doble acción sobre la secreción de prolactina, una inhibidora (Vijayan y McCann, 1.978; Lamberts y McLeod, 1.978; Libertum y Col., 1.979) y otra liberadora (Pass y Ondo, 1.977; Locatelli y Col., 1.979) aunque "in vitro" el GABA ejerce -

una acción inhibitoria sobre la liberación de prolactina. La concentración de GABA necesaria para producir este efecto es más alta que la de dopamina.

Existen pruebas que sugieren que - el TRF hipotalámico (factor liberador de tirotropina) es capaz de estimular efectivamente la secreción de prolactina. La administración a ratas de antisuero de TRF produce una disminución de - la liberación de prolactina y TSH, haciendo evidente el papel que el TRF juega en la regulación de la secreción de prolactina (Koch y Col., --- 1.977). Se ha sugerido la existencia de un PRF - distinto de TRH en la eminencia media del hipotalamo de mayor tamaño molecular que TRH (Kokubu y Col., 1.975; Szabo y Frohman, 1.976; Boyd y Col. 1.976).

La prolactina ejerce una acción de retroalimentación negativa sobre su propia secreoción, un aumento de prolactina disminuye su propia liberación (McLeod y Col., 1.966; Chen y Col. 1.967; Sinha y Tucker, 1.968; Mena y Col., 1.968).

Este efecto está ejercido sobre el hipotalamo , aumentando el contenido de dopamina, y sobre su propia hipófisis (Clemens y Meites, 1.968; Meites y Col., 1.972; Hokfect y Fuxe, 1.972).

Los estrógenos estimulan la síntesis y liberación de prolactina (Frantz y Col., 1.972; Yen y Col., 1.974; Abu-Fadil y Col., -- 1.976; Ehara y Col., 1.976). Este efecto parece estar ejercido a nivel del hipotalamo suprimiendo la dopamina y sobre la propia hipófisis directamente sobre las lactotropas induciendo la síntesis y almacenamiento de prolactina (Ahren y Col., 1.971; Shenai y Wallis, 1.975; Gautvik y Kriz, 1.976). Se han descrito receptores de estrógenos en la hipófisis anterior (Weisenberg y Col, 1.979). Los estrógenos también aumentan la proporción de mitosis de las células secretoras de prolactina produciendo hipertrofia de hipófisis durante el embarazo (Erdheim y Stume, 1.909; Romeis, 1.940). En la hembra los estrógenos y la testosterona parecen aumentar la síntesis y secreción de prolactina. En el macho la testosterona no tiene efecto, pero los -

estrógenos tienen un efecto similar al que en la hembra (Yamamoto y Col., 1.975). Esta acción de la testosterona puede ser debida a la conversión periférica de ésta en estrógenos.

Hay un gran número de estímulos no específicos que producen una elevación de la secreción de prolactina, entre éstos se incluyen - el ejercicio físico, el stress quirúrgico y la - anestésia (Kato y Col., 1.974).

PROLACTINA EN PLASMA

Desde la 25° semana de gestación - los niveles de prolactina en el feto humano aumentan progresivamente hasta el nacimiento disminuyendo después a los niveles prepuberales hacia la 6° semana de vida (Aubert y Col., 1.975). Durante la pubertad, en las chicas aumentan progresivamente los niveles de prolactina en suero hasta alcanzar el nivel de las hembras adultas (Ehara y Col. 1.975; Lee y Col., 1.976). En los chicos este au-

mento es mucho menor y en estado adulto la media de los niveles de prolactina en suero, en machos, es inferior al de hembras (Guyda y Friesen, -- 1.973; Ehara y Col., 1.973; Aubert y Col., 1.976). Después de la menopausia no se producen cambios - significativos en la concentración de prolactina en plasma.

La secreción de prolactina se produce de forma pulsatil variando cada pocos minutos (Parker y Col., 1.973; Sassin y Col., 1.972; McNelly y Col., 1.974). Además hay un ritmo día/noche en la secreción de prolactina que está relacionado con el sueño (Nokin y Col., 1.972). Los - niveles de prolactina aumentan durante la noche - después de dormirse el individuo y disminuyen por la mañana, aumentando también durante la siesta , hay también ritmos durante el sueño (Parker y Col. 1.974).

Algunos autores sugieren que se producen cambios en los niveles de prolactina durante el ciclo menstrual, aumentando a mitad del ciclo, continuando con niveles altos durante la fa-

se lutea (Robyn y Col., 1.977), aunque otros autores no han encontrado tales variaciones (Friesen y Col., 1.972; McNelly y Chard, 1.974).

Durante el embarazo, la prolactina en suero empieza a aumentar en el primer trimestre y sigue aumentando progresivamente hasta alcanzar 10 veces la concentración que en mujeres no preñadas (Jaffe y Col., 1.973; Tysom y Col., 1.972; Schenker y Col., 1.975; Gazarek y Col., 1.975; Kawaguchi, 1.975; Mochizuki y Col., 1.976). La administración de estrógenos está seguida de un aumento de prolactina en plasma, el progresivo aumento de ésta durante el embarazo humano es probablemente debido a los altos niveles de estrógenos circulantes (Frantz, 1.976). En las especies en las que durante el embarazo no aumentan los estrógenos tampoco lo hace la prolactina (Friesen y Col., 1.972).

ACCIONES DE LA PROLACTINA

Las acciones de la prolactina están

ejercidas sobre la osmorregulación, el metabolismo y la reproducción, el crecimiento y desarrollo. La prolactina es una reguladora importante de la fertilidad así como de la lactación en humanos (Nicoll y Bern, 1.971). De acuerdo con las numerosas acciones de la prolactina se han encontrado receptores específicos para esta hormona en hígado, corteza adrenal, glándulas mamarias, próstata, riñón, cerebro y folículos pilosos así como en testículos y ovarios. En el hígado los receptores de prolactina son dependientes de esteroides siendo aumentados por estrógenos, así como por la propia prolactina y reducidos por andrógenos (Posner y Col., 1.974).

En la glándula mamaria la prolactina estimula el crecimiento de la mama y la iniciación de la secreción de la leche (Cowie y Forsyth, 1.975), uniéndose a receptores específicos y activando la síntesis del RNA mensajero necesaria para la síntesis y secreción de las proteínas de la leche. Hay evidencias que indican que la prolactina entra en las células hepáticas y mamarias en cantidades significativas y puede ejercer una acción in

tracelular además de las respuestas producidas - por su asociación con los receptores de la superficie celular.

En la hembra la prolactina actúa como una hormona luteotrópica, esta acción es - compleja y varía con las especies y los diferentes estados de la función reproductiva (Cowie y Forsyth, 1.975). En roedores la prolactina tiene también una acción luteolítica y puede ser la -- responsable de la regresión lútea durante el ciclo normal del estro. En mujeres la prolactina - ejerce un efecto directo de inhibición sobre la formación de progesterona por las células de la granulosa (McNatty y Col., 1.974). En roedores - la prolactina también tiene una acción reguladora sobre los receptores de gonadotropinas en las células lúteas, produciendo un aumento de los receptores de LH cuando se administra durante la - luteinización folicular (Richards y Willians, -- 1.976).

La prolactina tiene una acción directa en la regulación de la función testicular

(Hansson y Col., 1.976). Los efectos de la prolactina sobre los testículos y organos sexuales accesorios puede ser al menos en parte debidos a la acción directa de la hormona sobre estos tejidos. Existen receptores específicos de prolactina en el compartimento intersticial de los testículos (Charrreau y Col., 1.977), en la vesícula seminal (Barkey y Col., 1.977), así como la próstata y en el epididimo (Aragona y Friesen, 1.975). La prolactina también puede actuar aumentando el número de receptores de LH (Bohnet y Friesen, 1.976). La prolactina actúa sinérgicamente con LH para estimular la producción de andrógenos (Purvis y Col., 1.979).

S E P T U M

El septum pellucidum está formado por dos láminas delgadas unidas de materia gris, atravesadas por gran cantidad de fibras que están ordenadas en el plano vertical, en la cisterna anterior del ventrículo lateral. Están situadas entre el cuerpo calloso por delante y arriba y el trígono por debajo y atrás (Lucien et Beau, 1.933).

El núcleo septal varía con las diferentes especies de mamíferos estando bien desarrollado en los mamíferos inferiores, habiéndose demostrado que están muy relacionados los tamaños relativos de este núcleo y el hipocampo (Stephan y Andy, 1.962).

La anatomía del septum, según Pa-

turet, 1.964, es la siguiente: tiene forma triangular, de bordes curvilíneos, el borde superior se inserta en la parte media de la cara inferior del cuerpo calloso, su borde inferior es más corto y cóncavo y se fija sobre la cabeza del cuerpo calloso, el borde posterior muy cóncavo se fija sobre los pilares anteriores y el cuerpo del trígono, el ángulo inferior se fija por encima de la comisura blanca. El ángulo posterior forma la cola del septum.

El septum pellucidum está formado por dos láminas delgadas que envuelven entre ellas una pequeña hendidura triangular cuya base mide 2-3 mm. aproximadamente que corresponde a la separación de los pilares anteriores del trígono. En el feto la cavidad del septum comunica con la cola del septum a través de un pequeño intersticio con el ventrículo de Verga, pero en el adulto esta cavidad se queda totalmente cerrada no comunicándose con ninguno de los ventrículos.

Las láminas que forman el septum es

tán constituidas por cuatro capas, la capa más interna es una capa conjuntiva, vascular de naturaleza leptomeníngea que tapiza las paredes de la cavidad del septum, hay una segunda capa de sustancia gris, llamada capa gris interna que se puede comparar con la corteza cerebral, pero que está considerablemente atrofiada. A ésta le sigue una capa de sustancia blanca, llamada capa blanca externa y por último una capa epitelial formada por la membrana endimaria que reviste la cara externa del septum.

Embriológicamente, el septum es un resto del fondo de la cisura interhemisférica del embrión, envuelta por la aparición del cuerpo calloso que divide la cisura del embrión en dos partes, una parte supracallosa que será la cisura interhemisférica propiamente dicha del adulto y otra infracallosa en la que las paredes se fusionan en los extremos dando el septum.

El septum sirve de enlace anatómico y funcional a través de sus conexiones , entre

las áreas límbicas y el diencéfalo (Nauta, 1.960). Las principales conexiones del septum están establecidas con el hipocampo y reciprocamente, y fueron ya mostradas por Ramón y Cajal, en 1.911. Estas fibras proceden de los diferentes campos citoarquitectónicos del hipocampo y terminan en el septum en tres zonas verticales (Raisman, Cowan y Powell, 1.966). Las fibras procedentes de la parte anterior del campo CA1 llegan a la zona media mientras que la parte posterior de la zona intermedia y los campos CA3 y CA4 mandan sus fibras bilateralmente sobre la zona lateral; estas fibras pasan por el componente precomisural del fornix y parece ser que tienen una acción excitadora, monosináptica sobre el septum (De France, Kitai, Shimono, 1.973). También el septum recibe fibras procedentes del subiculum (Chronister, Sikes y White, 1.976; Meibach y Siegel, 1.977; Swanson y Cowan, 1.977; Harkmark, Hohler y Srebro, 1.978). Otro grupo de aferencias parten de la corteza piriforme y probablemente de la amígdala y el tubérculo olfatorio (Cowan, Raisman y Powell, 1.965).

Las fibras procedentes del hipotálamo y el cerebro medio pasan por el fascículo - prosencefálico medial al núcleo septal y núcleos de la banda lateral (Guillery, 1.957; Nauta y - Kuypers, 1.958). La única parte de la corteza ce^{re}bral de la que se ha mostrado que manda proyec^{ci}ones al septum es la circunvolución del cingu^{lo} (Powell y Robinson, 1.975; Powell, Akagi y Ha^{tt}on, 1.974).

De las proyecciones eferentes del núcleo septal, el mayor grupo lo forman las que van al hipocampo (Daitz y Powell, 1.954; Cragg y Hamlyn, 1.959; Cragg, 1.965; De Vito y White, -- 1.966; Raisman, 1.966; Mosko, Lynch y Cotman, -- 1.973; Mellgran y Srebro, 1.973; Segal y Landis, 1.974; Meibach y Siegel, 1.977). Parece ser que estas fibras proceden principalmente del núcleo septal medial y núcleos de la banda lateral (Segal y Landis, 1.974; Meibach y Siegel, 1.977), - estas proyecciones llegan a todas las zonas del hipocampo y parecen estar distribuidas difusamen^{te} y tienen actividad colinérgica (Lewis y Shute, 1.967; Mellgren y Srebro, 1.973).

Hay un grupo de fibras que parten del septum y pasan por el fascículo prosencefálico medial al hipotálamo lateral (Nauta, 1.956; Valenstein y Nauta, 1.959). Otras pasan al hipotálamo y llegan al talamo, a los núcleos antero-medial, anteroventral y dorsomedial (Powell, -- 1.973; Culberson y Bach, 1.973; Meibach y Siegel 1.977). Hay fibras que van hacia el núcleo medial de los cuerpos mamilares (Simons y Powell, 1.972; Swanson y Cowan, 1.976) y fibras que llegan a los núcleos central y medial de la amígdala (Swanson y Cowan, 1.976) y otras que van al núcleo habenuar medial (Raisman, 1.966).

Teniendo en cuenta la gran cantidad de interconexiones que existen entre el núcleo septal, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo, no es raro que si se lesiona alguno de ellos se produzcan unos síntomas similares a pesar de las diferencias funcionales de estas regiones. Se ha visto que todos los comportamientos y funciones psicológicas que han sido investigadas están afectadas de algún modo por las lesiones del septum (Grossman, 1.976).

OBJETO DE LA TESIS

El objeto de la tesis es estudiar el posible papel que pueda jugar el septum pellucidum sobre el control de la secreción de gonadotropinas y prolactina de la hipofisis en ratas macho para lo cual haremos los siguientes apartados:

- Estudio de los niveles en suero de LH, FSH, prolactina y testosterona en ratas macho - con el septum pellucidum lesionado electrolíticamente en comparación con ratas controles a las que se les practicará la operación simulada.

- Estudio de los niveles en suero de LH, FSH y prolactina en ratas orquidectomizadas con el septum pellucidum lesionado electrolíticamente - en comparación con ratas orquidectomizadas a las que se les practicará la operación simulada.

- Estudio de los niveles en suero de LH, FSH, prolactina y testosterona en ratas macho -

a las que se les estimulará eléctricamente el septum pellucidum, en comparación con ratas controles a las que se les practicará la estimulación simulada.

MATERIAL Y METODOS

R E A C T I V O S

Los reactivos han sido proporcionados por el National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMDD) (USA).

LH de rata purificada para radioiodación
(NIAMDD - RAT LH-I-5)

El producto viene liofilizado y hay - que disolverlo en tampon fosfato 0,01 M, ClNa 0,15, mertiolato 0,01 % a PH 7,6, a la concentración de 100 microgramos por mililitro.

Se hacen alicuotas de 25 microlitros - en tubos de 1 mililitro que se congelan rápidamente y se mantienen congelados a -20° C hasta su uso posterior.

La LH de rata purificada tiene una potencia biológica de aproximadamente 1,0 x NIH-LH-S1,

la contaminación por FSH es menor de 0,04 x NIH-FSH-S1 y la contaminación por TSH es menor de -- 0,03 USP unidades/mg.

Antisuero para LH de rata

(NIAMDD-ANTI-RAT LH-SERUM S-5)

El producto viene en estado líquido - siendo estable en esta forma, se disuelve en la - proporción 1/100 en tampon fosfato 0,01 M, ClNa - 0,15 M, EDTA 0,05 M, suero de conejo normal 3 % y azida sódica 0,1 % a pH 7,6.

Se hacen alicuotas de 100 microlitros en tubos de 1 mililitro que se congelan rápidamente y se mantienen congelados a -20° C hasta su -- uso.

Preparación standard de LH de rata

(NIAMDD-RAT LH-RP-1)

El producto viene en forma de polvo liofilizado que se disuelve en tampon fosfato 0,01 M,

ClNa 0,15 M, albumina bovina 1 % y azida sódica 1% a pH 7,6 a concentración de 0,1 mg/ml.

Se hacen alicuotas de 50 microlitros - en tubos de 1 mililitro, se congelan rápidamente y se mantienen congelados a -20° C.

FSH de rata purificada para radioiodación

(NIAMDD-RAT FSH-I-5)

El producto viene liofilizado y se sigue con él, el mismo proceso que con la LH (NIAMDD-RAT LH-I-5) disolviendolo en el mismo tampon y se hacen alicuotas de 25 microlitros que se congelan.

La potencia biológica es aproximadamente 150 x NIH-FSH-S1, la contaminación de LH es menor de 0,002 x NIH-LH-S1.

Antisuero para FSH de rata

(NIAMDD-ANTI-RAT FSH SERUM-10)

El producto viene en forma líquida esta-

ble, que se disuelve en la proporción 1/10 en - el mismo tampón que la NIAMDD-ANTI-RAT LH-SERUM -S5 y se hacen alicuotas de 100 microlitros en tubos de 1 mililitro y se congelan.

Preparación standard de FSH de rata

(NIAMDD-RAT FSH-RP-1)

El producto viene en forma de polvo liofilizado y se disuelve en el mismo tampon que la NIAMDD-RAT LH-RP-1 a concentración de 0,1 mg/ml. se hacen alicuotas de 100 microlitros y - se congelan.

Prolactina de rata purificada para radioiodación.

(NIADDK-rPRL-I-5)

El producto viene en forma liofilizada y hay que disolverlo en una disolución de - 100 microgramos por mililitro.

Se hacen alicuotas de 25 microlitros

en tubos de 1 mililitro que se congelan y se man tienen congelados hasta su posterior utilización.

La prolactina de rata purificada - tiene una potencia biológica de 30 unidades interna cionales por miligramo. La contaminación por - rGH es menor del 3 % y de otras hormonas de la hi pófisis anterior es menor del 1 %.

Antisuero para prolactina de rata

(NIADDK-Anti-rPRL-5-8)

El producto viene en forma líquida es table, se disuelve en la proporción 1/10 en tampón fosfato 0,01 M, ClNa 0,15 M. EDTA 0,05 M. a pH 7,6 y se hacen alicuotas de 25 microlitros en tubos de 1 mililitro y se mantienen congelados a -20°C hasta su uso.

Preparación standard de prolactina de rata

(NIADDK-rPRL-RP-3)

El producto viene en forma liofiliza-

da y hay que reconstituirla con mililitro de -
agua destilada dando una solución de 10 micro-
gramos por mililitro en tampon fosfosalino 1 %
de albumina bovina.

Se hacen alicuotas de 25 microlii
tros en tubos de 1 mililitro que se mantienen
congeladas a -20°C hasta su uso.

Su potencia biológica es la misma
que la de la NIADDK-rPRL-I-5.

T A M P O N E S

Tampon borato 0,01 M., pH 8,6

Se hacen dos soluciones de la siguiene
te forma:

- Solución A.- Se pesan 1,24 gramos de BO_3H_3
y 1,49 gramos de ClK y se disuelven en un
litro de agua destilada.

- Solución B.- Se disuelven 0,4 gramos de NaOH en un litro de agua destilada.

Se mezclan un litro de la solución A con 240 mililitros de la solución B y se completa el volumen hasta dos litros con agua bidestilada, ajustandose el pH a 8,6.

Tampón bicarbonato.

Se hace una disolución tomando 42 miligramos de CO_3HNa y disolviendolo en 50 mililitros de agua destilada.

Tampón fosfosalino 0,01 M., pH 7,6

Se pesan las cantidades indicadas de los siguientes productos: 2,61 gramos de PO_4HNa_2 ; 0,34 gramos de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{H}_2\text{O}$; 18 gramos de ClNa y se le añade agua destilada hasta un volumen final de 2.000 cc.

Tampon fosfosalino 0,05 M, pH 7,6

Se pesan 3,08 grs. de PO_4HNa_2 ; 0,425 grs. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{H}_2\text{O}$ y 4,5 grs. de ClNa que se disuelven en 500 cc. de agua destilada.

Tampon fosfosalino 0,5 M, pH 7,6

Se toman 7,09 grs. de PO_4HNa_2 ; 6,28 grs. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{H}_2\text{O}$ y 0,2 grs. de ClNa y se disuelven en 100 cc. de agua destilada.

Tampon EDTA titriplex, pH 7,6

Se hacen dos disoluciones diferentes, en la primera se disuelven 1,3789 grs. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua destilada, la segunda se hace disolviendo en 1 litro de agua destilada -- 1,7798 grs. de PO_4HNa_2 .

Se mezclan 132 cc. de la primera disolución con 868 cc. de la segunda para dar 1 litro de disolución a la que se añade 8,775 grs. de ClNa ,

30 cc. de suero de conejo, 1 gr. de azida sódica, 22,60 grs. de ácido etilendinitrilotetra-acético, (sal tetrasódica, tetrahidratada) y 18,6 grs. de ácido etilendinitrilotetraacético, (sal disódica, dihidratada).

YODO RADIOACTIVO

Para el marcaje radioactivo de las hormonas, tanto LH como FSH, para radioinmunoanálisis, se utiliza I^{125} suministrado por Nuclear Iberica - en forma de Ioduro sódico en solución de hidróxido sódico a pH entre 7 y 11.

MATERIALES Y APARATOS

- Pipetas automáticas de punta intercambiable.
- Micropipetas.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de vidrio de 1,5 y 10 ml.
- Tubos de plástico de 5,5 cm. de largo x 10 mm. de diámetro.
- Tubos de plástico de 5 cm. de largo x 0,8 cm. de diámetro.

- Tubos de cristal para la extracción de sangre.
- Vasos, matraces y probetas de distintas medidas.
- Jeringas de 10 cc.
- Gradillas del tamaño adecuado para el transporte de cada tipo de tubo.
- Agitador magnético, modelo Micromixer Beckman - Spinco 154 B.
- Agitador Vortex rotante, modelo Atom 85.
- Agitador rotativo Selecta.
- Bomba de vacío.
- Congelador Scientmp 110.
- Centrífuga, tipo Jouan-Paris K-63 F con termostato Fournier.
- Cámara fría con temperatura entre 2 y 4° C para incubación.
- Contador gamma, modelo Wallac LKB 1.280 ultrogamma.
- Colector de fracciones, LKB 7.000 ultrorac.
- Columnas Sephadex Bio-Rad.
- Peso Krups-Perla.
- Estereotáxico para roedores David Kopf Instrumens.
- Motor portafresas Casali DSE 47.
- Polímetro ICE Supertester 680 R.
- Electrocoagulador de corriente continua.
- Material quirúrgico.

- Cemento plástico acrílico Simplex Rapid.
- Spongostan film Medu D-25.
- Balanza de precisión Sauter tipo 414.
- Medidor de pH Photovolt pH meter 112.
- Estimulador Cibertec CS-10.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado ratas macho de la raza Wistar con peso comprendido entre 200 y 250 grs. proporcionadas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Comisión de Servicios Técnicos - de la Universidad de Granada.

Las ratas han sido mantenidas en jaulas con un fotoperiodo de 12 horas a una temperatura de 20 a 25° C con agua y comida "ad libitum".

METODO DE DESTRUCCION DEL SEPTUM

Las coordenadas estereotáxicas son derivadas del atlas de Konig y Klipper (1.967), se toma de punto de referencia la unión de la sutura de --

Bregma con la sutura media, a partir de este punto se localiza el punto de introducción de los electrodos, siendo sus coordenadas 0,4 mm. anterior al punto de referencia, y con una separación entre los dos electrodos de 1 mm. Los electrodos se introducirán 4,5 mm. de profundidad, utilizando de nivel de referencia a la duramadre.

Se utilizan electrodos de acero cubiertos de una película aislante de esmalte menos en la punta, los electrodos son comprobados electrolíticamente cada vez, antes de ser utilizados.

Las ratas son anestesiadas con equitenin, cuya fórmula es:

- 21,25 grs. de hidrato de cloral disueltos en 49,4 ml. de etanol.
- se añaden 81 ml. de nembutal (4,86 grs. de nembutal disueltos en agua destilada).
- se añaden 189 ml. de propilenglicol.
- se añaden 10,63 grs. de sulfato magnésico disuelto en agua.
- se añade agua destilada hasta completar 500 ml.

La anestesia se aplica por via intraperitoneal en cantidad de 0,2 ml. por cada 100 grs de peso del animal. La rata suele dormirse aproximadamente a los 3 minutos.

Una vez dormida se procede a fijar la cabeza de la rata en el estereotáxico de la siguiente forma: se introduce uno de los soportes laterales del aparato por el oído del animal hasta alojarlo en la cápsula otica, al hacer esta operación se oirá un pequeño crujido debido a la rotura del tímpano, se repite entonces esta operación en el otro oído. De esta forma se evita que la cabeza pueda tener movimiento hacia los lados, pudiendo girar hacia arriba y hacia abajo teniendo como eje de giro el que pasa por los dos soportes.

Este último movimiento se evita alojando los incisivos superiores de la rata en un soporte anterior y fijandolos, siendo este soporte regulable en altura, dando así la inclinación deseada a la cabeza del animal, quedando de esta forma el cráneo perfectamente fijo.

Con un bisturí se hace una incisión lon

gitudinal en la mitad de la parte superior de la cabeza cortando la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo, separando ambos bordes con pinzas hemostáticas. Se corta el periostio por encima de la línea media y se separa hacia ambos lados.

Se localiza la sutura de Bregma y se toma como referencia 0 de las coordenadas estereotáxicas, se coloca el electrodo derecho sobre esta punta y se desplaza 0,5 mm. hacia la derecha, quedando así los electrodos centrados sobre la línea media, y 0,4 mm. hacia atrás marcando con un lápiz sobre el cráneo los puntos sobre los que caen los electrodos y se retiran.

Entonces con el torno portafresas se hace un orificio en la calota por donde tienen que entrar los electrodos hasta la duramadre, viéndose debajo de ésta el seno cavernoso que pasa debajo de la línea media; se limpia y se cortan con spongostan las pequeñas hemorragias óseas que se han producido al perforar.

Se vuelven a colocar los electrodos en el lugar correcto y se bajan hasta apoyarlos sobre

la duramadre, a partir de ese punto se bajan 4,5 mm. quedando así los dos electrodos localizados en el septum. Se introduce un electrodo de masa bajo la piel del animal y el otro se conecta sucesivamente a cada uno de los dos electrodos. - Con el electrocoagulador se hace pasar una corriente de 2 mA. durante 10 segundos por cada electrodo destruyendo así el núcleo septum.

Con cuidado se sacan los electrodos, se tapa el orificio de la calota con cemento - plástico acrílico y se cose la piel con puntos de sutura.

Las ratas se mantienen en las mismas condiciones de luz y temperatura en jaulas individuales con comida y agua "ad libitum" durante 4 días.

OPERACION SIMULADA DE LESION DEL SEPTUM

Se efectúa exactamente el mismo proceso siendo la única diferencia que una vez introducidos los electrodos en el septum, no se hace -

pasar ninguna corriente eléctrica.

PERFUSION DEL CEREBRO

El objeto de la perfusión del cerebro es eliminar todos los restos de sangre y endurecerlo para su posterior estudio histológico. Para ello se procede a anestesiar la rata con equiten-sin y en posición "decubito supino" se hace una incisión en la parte superior de la cavidad abdominal, se procede a abrir la caja torácica cortando el diafragma y las costillas a ambos lados del esternón quedando así el corazón al descubierto. En este momento se introduce una canula en el ventrículo, por la que se hace pasar suero salino y se pinza la arteria aorta por debajo del corazón para cortar la circulación inferior del tronco. El corazón sigue latiendo durante unos segundos y después el suero seguirá circulando por presión, cuando se ha lavado bien el circuito sanguíneo, que se notará en que los ojos y los pulmones habrán adquirido un color blanquecino, entonces se cambiará el paso de suero salino por el de formol 40 % para fijar el cerebro del animal y se mantiene así hasta que se queda rígido.

Una vez hechas estas operaciones se -
quita la canula y se procede a extraer el cerebro
cortando el cráneo por la parte superior, el cere
bro se conserva en formol hasta su posterior estu
dio.

ORQUIDECTOMIA

Las ratas se anestesian con equitensin,
se colocan en posición de "decubito supino" y se -
hace un corte en el escroto con las tijeras a tra
vés del cual se localizan las bolsas escrotales, -
se hace un corte en una de ellas y se extrae el --
testículo a través de la abertura; una vez fuera -
se procede a separar el epididimo cortándolo con -
mucho cuidado en dirección al ileo por donde entra
la arteria, el nervio y sale la vena, entonces se
hace una doble ligadura y se corta en medio, sepa
rando el testículo.

Se repite la misma operación en el otro
lado, se desinfecta con polvos de sulfamida y se -
cose con puntos de sutura.

RECOGIDA DE MUESTRAS

A los cuatro días exactos de la operación se procede a la extracción de la sangre. Se anestesian de nuevo las ratas con equitensin, una vez dormidas, se le hace una incisión transversal en la parte baja del vientre de lado a lado del animal, entonces con ayuda de dos pinzas se separa la masa visceral hacia un lado y se limpia el fondo de la cavidad hasta dejar al descubierto la arteria aorta a la altura de la bifurcación en las dos arterias iliacas.

Se utiliza una jeringa de 10 cc. con la aguja puesta de forma que el bisel mire hacia abajo, para evitar que al pinchar la arteria salte la sangre debido a la presión arterial.

La aguja se introduce en dirección ascendente por el vértice que forma la bifurcación de la arteria a lo largo de la aorta y se extrae la mayor cantidad de sangre posible hasta que el corazón deje de bombear.

La sangre extraída se vierte en un tubo

de ensayo de cristal y se deja de 1 a 2 horas para que coagule totalmente.

Posteriormente estos tubos son introducidos dentro de otros mayores de plástico y se centrifugan a 2.500 rpm. durante 10 minutos.

El suero así separado se reparte en dos alícuotas que son congeladas inmediatamente y se mantienen de esta forma hasta que se efectúa el radioinmunoanálisis. Se hace varias alícuotas para el análisis de las diferentes hormonas y así evitar el tener que descongelar y congelar sucesivas veces una misma muestra, evitando así la desnaturalización de las hormonas.

METODO DE ESTIMULACION DEL SEPTUM

Se utilizan las mismas coordenadas estereotáxicas y los mismos electrodos usados en la destrucción electrolítica del septum. Las ratas son anestesiadas con eter y los electrodos se sitúan en el septum por medio de una aparato estereotáxico de la forma anterioremente descrita. Por me-

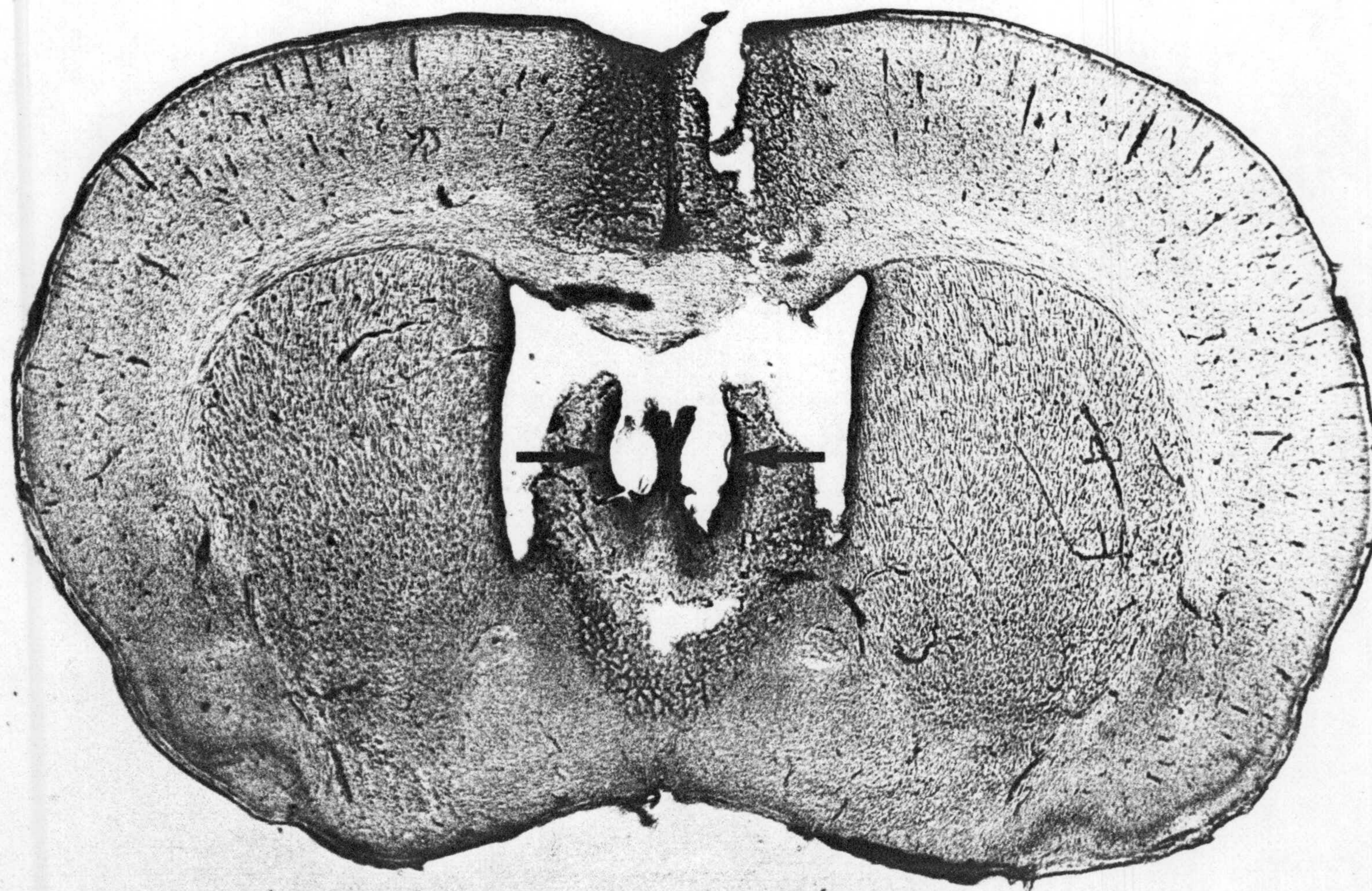
dio de un estimulador se hace pasar por los electrodos trenes de ondas cuadradas en periodos de 10 segundos con 10 segundos de intervalo entre ellos durante 20 minutos.

Los parámetros de la estimulación son los siguientes: 0,5 mA. de intensidad con una frecuencia de 55 Hz. siendo la duración del pulso de 5 mseg.

Inmediatamente después de la estimulación los animales son desangrados y después se lesiona electrolíticamente el septum para la posterior comprobación histológica de la posición de los electrodos.

OPERACION SIMULADA DE ESTIMULACION

Se siguen los mismos pasos que durante la estimulación, siendo la única diferencia con ésta, que no se hace pasar ninguna onda de estimulación, pero se mantiene al animal en las mismas condiciones y el mismo tiempo que en la estimulación.



SEPTUM LESIONADO (CORTE HISTOLOGICO)

HISTOLOGIA

Llegado el momento del análisis histológico los cerebros se toman de la solución de formol en la que habían sido depositados para su conservación. Se secciona la parte posterior del cerebro y también el cerebelo. Se coloca en un microtomo de congelación y una vez bien congelado se dan cortes de 30 micras de espesor, desde la zona inmediatamente anterior a la señal de la lesión, y hasta que ésta se pierde por su parte posterior. Los cortes son fijados sobre un porta con albúmina de huevo estabilizada con ácido fénico. A continuación se comienza la tinción siguiendo el método de Kluver-Barrera, en 1.953.

Para la realización de esta técnica se emplean las siguientes diluciones:

1.- Luxol fast blue 0,1 %. Se pesan -- 0,5 gr. de luxol "fast blue" y se disuelven en 500 ml. de alcohol al 95 %. Una vez disueltos, se añaden a la solución 2,5 ml. de ácido acético.

2.- Violeta de cresilo 0,1 %. Se pesan 0,5 gr. de violeta de cresilo y se disuelven en -- 500 ml. de agua destilada. Filtrar. Añadir 5 ml. - de ácido acético glacial.

3.- Carbonato de litio al 0,05 %.

4.- Alcohol al 70 %.

Procedimiento de tinción.

1.- Deshidratar en alcohol al 95 %.

2.- Dejar en solución de luxol toda la noche a 50 - 60° C.

3.-Aclarar en alcohol al 95 % y quitar el exceso de colorante.

4.- Aclarar en agua destilada.

5.- Comenzar la diferenciación con una rápida inmersión en solución de carbonato de litio.

6.- Continuar la diferenciación en alcohol al 70 % hasta que se pueda distinguir la sustancia gris de la blanca.

7.- Lavar en agua destilada.

8.- Terminar la diferenciación aclarando brevemente en la solución de carbonato de litio. Dar varios cambios en alcohol al 70 % hasta que el azul verdoso que ha tomado la sustancia blanca contraste netamente con la sustancia gris incolora.

9.- Aclarar rápidamente en agua destilada.

10.- Mantener la preparación 10 minutos en solución de cresil violeta, a un pH de 3,59. Esta disolución se filtra y se precalienta a 57 °C - justo antes de usar.

11.- Diferenciar varias veces en alcohol al 95 %.

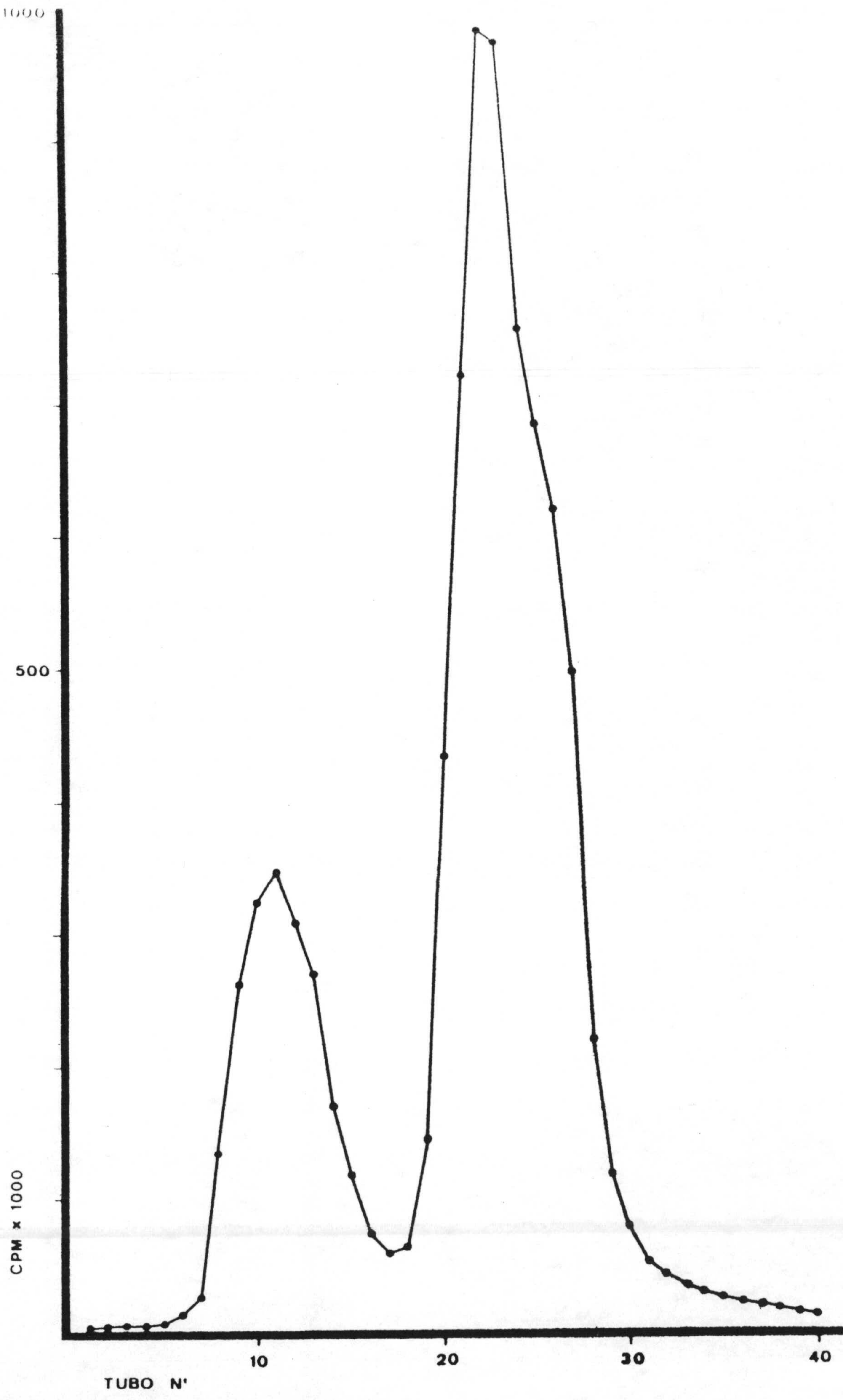
12.- Deshidratar en alcohol absoluto (dos recipientes).

13.- Limpiar en xilol (dos recipientes).

14.- Montar en Sintresin.

Al final de la tinción las fibras - mielínicas aparecen teñidas de azul, y los somas celulares de rosado violeta.

Finalmente las preparaciones son estudiadas con un macroscopio para la determinación de la localización y límites de la lesión electrolítica.



MARCAJE DE HORMONAS

(Fig. 1)

MARCAJE DE HORMONAS

El procedimiento del marcaje es igual tanto para LH como para FSH. Los reactivos utilizados son los siguientes:

- 125 Iodo, en forma de yoduro sódico con una actividad específica de aproximadamente 10 mC/ml.
- Tampon fosfosalino 0,5 M. pH 7,6.
- Cloramina-T. La disolución de cloramina-T se prepara justo antes de su uso en la proporción de 12 mg./10 ml. de tampon fosfosalino 0,05 M. pH 7,6.
- Metabisulfito sódico, que se prepara también antes de su uso disolviendo 15 mg. en 10 ml. de tampon fosfato 0,05 M. pH 7,6
- Hormona purificada de rata FSH o LH según corresponda en proporción 2 μ g/20 μ l.
- Solución Rinse, que se prepara disolviendo 1 g. de KI y 8 g. de sacarosa en 100 ml. de agua.

PROCEDIMIENTO

En un vial de 50 x 8 mm. se van echando

los diferentes reactivos:

- 25 μ l de tampon fosfato 0,5 M. pH 7,6.
- se añaden 10 μ l de 125 I equivalente a 1mC.
- se añaden 20 μ l de hormona purificada de rata, equivalente a 2 μ g de hormona y se agita.
- se añaden 10 μ l de cloramina-T, entonces se agita el vial a intervalos durante 60 segundos.
- después de los cuales se añaden 25 μ l de metabisulfito sódico y se agita.
- se añaden 100 μ l de solución Rinse.

La mezcla completa se aplica a una columna de sephadex G-75, el tubo de reacción se lava con tampon fosfato 0,01 M. pH 7,6 y el lavado se coloca en la columna.

Entonces se lava la columna haciendo pasar tampon fosfato 0,01 M. pH 7,6 y se recogen muestras de 0,5 cc. con un colector de fracciones automáticas LKB 7.000 Ultrarac, en tubos de 150 x 18 mm. que contienen 100 μ l de tampon 0,01 M. al 30 % de albumina.

RESULTADOS

De cada tubo se toma una muestra de 10 λ que se lleva al contador para efectuar la curva de radioactividad. (Fig. 1).

Se detectan dos picos de radioactividad; el primer pico empieza por el tubo 5 y acaba por el tubo 15-16. El segundo pico que contiene el 125 Iodo empieza por el tubo 17.

La hormona de rata está contenida en el primer pico generalmente la fracción alta de la rama descendente de este pico es la que contiene la hormona ligada menos dañada y más inmunoreactiva. Esta fracción es congelada y almacenada hasta su uso.

PREPARACION DE LA COLUMNA SEPHADEX

En un matraz quitasato se colocan 4 grs. de Sephadex G-75 y se le añaden 350 ml. de tampón fosfato 0,01 M. pH 7,6. Se pone a hervir al baño maría durante una hora, después de lo cual se conec-

ta el matraz quitasato a una bomba de vacío y se agita con un agitador magnético durante una hora con objeto de extraerle todo el aire posible.

Una vez hinchado el Sephadex se procede a llenar la columna. El Sephadex se va depositando en la columna de manera que se vaya sedimentando lentamente de forma continua y sin disrupciones ni burbujas de aire y manteniendo siempre el nivel del tampon por encima del nivel de Sephadex sedimentado.

La columna se llena hasta una altura aproximada de 15 cm., se lava con tampon fosfato 0,01 M. pH 7,6 y se deja goteando durante 12 horas con objeto de que se empaqueten las particulas de Sephadex, quedando así la columna lista -- para su uso.

VALORACION DEL PRIMER ANTICUERPO

El objeto de hacer la valoración del primer anticuerpo es el de conocer la concentración de éste para la cual se obtiene la maxima -

eficacia del radioinmunoanálisis, es decir, que haya un número adecuado de lugares de unión del anticuerpo para el cual el desplazamiento de la hormona marcada por la no marcada sea máximo.

PRIMER ANTICUERPO DE FSH

Se hacen disoluciones del anticuerpo de FSH (NIAMDD-ANTI-RAT FSH SERUM-10) a diferentes concentraciones de la siguiente forma:

Se toman 100 λ de anticuerpo disuelto en proporción 1/10 y se disuelven en 6,25 cc. de tampon EDTA fosfato, 3 % suero de conejo quedando la disolución 1/625 y de ésta, se hacen -- las demás disoluciones:

				<u>DISOLUCION</u>
- 100 λ ANTICUERPO	1/10	+ 6,25 cc. tampon	→	1/625
- 3 cc de DISOLUCION	1/625	+ 3 cc "	→	1/1250
- 3 cc "	1/1250	+ 3 cc "	→	1/2500
- 3 cc "	1/2500	+ 3 cc "	→	1/5000

Se disuelve la hormona standard de -

forma que dé una concentración de 100 mg/200 λ y la hormona marcada de manera que tenga una radioactividad de 20.000 cuentas por minuto por 100 λ .

Se hacen dos grupos, ambos por triplicado:

El primer grupo nos dará la afinidad del anticuerpo por la hormona marcada, a cada tubo se le añade:

- 500 λ de tampon fosfato 0,01 M. - al 1 % de albumina bovina.
- 200 λ del primer anticuerpo, tomando tres tubos para cada concentración de anticuerpo.
- 100 λ de hormona marcada.

El segundo grupo nos dará el desplazamiento de la hormona marcada por la hormona standard en el anticuerpo, lleva:

- 300 λ de tampon.
- 200 λ de anticuerpo, tomando tres -

tubos para cada concentración de anticuerpo.

- 100 λ de hormona marcada.

Todos estos tubos se agitan y se mantienen rotando 24 horas a temperatura ambiente y se le añaden:

- 200 λ del segundo anticuerpo.

Se agita y se rota 24 horas en la cámara fría, tras lo cual se centrifuga y se elimina el sobrenadante y se mide la radioactividad en cada tubo.

Con estos datos se construyen las dos curvas, representando en la ordenada el número de cuentas/minuto y en la abscisa la concentración de primer anticuerpo.

A partir de estas dos curvas, se construye una tercera curva que será el resultado de restar las dos anteriores; esta última curva tendrá un máximo que representa la concentración de primer anticuerpo, para lo cual el desplazamiento de la hormona marcada por la hormona no marcada,

será mayor.

PRIMER ANTICUERPO DE LH

Se actúa de igual forma haciendo las siguientes disoluciones del primer anticuerpo de LH (NIAMDD-ANTI-RAT LH-SERUM-55):

				<u>DISOLUCION</u>
- 200 λ ANTICUERPO	+ 2,5	cc. TAMPON	—————>	1/1250
- 1,25 cc 1/1250	+ 1,25	cc. "	—————>	1/2500
- 1,25 cc 1/2500	+ 1,25	cc. "	—————>	1/5000
- 1,25 cc 1/5000	+ 1,25	cc. "	—————>	1/10000
- 1,25 cc 1/10000	+ 0,625	cc. "	—————>	1/15000

Se disuelve la hormona standard para obtener una concentración de 25 mg./200 λ y la hormona marcada para una de 20.000 cuentas por minuto por 100 λ y se procede de igual forma que con el primer anticuerpo de FSH construyendo se las curvas de igual forma.

PRINCIPIO DE RADIOINMUNOANALISIS

El radioinmunoanálisis está basado en la competición entre la hormona ^{125}I y la hormona contenida en los standards o en las muestras que se van a analizar.

El anticuerpo usado tiene la misma afinidad por el standard que por la hormona de las muestras.

La hormona no marcada compite con la hormona marcada para un número limitado de lugares de unión disponibles en el anticuerpo, reduciendo la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo.

El nivel de radioactividad unida al anticuerpo es, por tanto, inversamente proporcional a la concentración de hormona en la muestra o standard.

DETERMINACION DE HORMONAS

Para la valoración de las hormonas go

nadotropicas LH y FSH, se utiliza la tecnica de - Radioinmunoanálisis, que consta en términos generales de tres fases fundamentales:

1.- Incubación de la hormona contenida en las muestras problema y standard, en presencia de la hormona marcada y del antisuero correspondiente.

2.- Separación de la hormona libre de la ligada al anticuerpo.

3.- Contaje de la radioactividad que contiene el complejo antígeno-anticuerpo y cálculo matemático de los valores de la hormona en las -- muestras problema, por interpolación de los valores de la radioactividad obtenida sobre los correspondientes de la curva standard.

PROCEDIMIENTO OPERATIVO

El procedimiento operativo se hace siguiendo los apartados sucesivos, haciendo cada -- punto de la experiencia por triplicado para obtener una mayor fiabilidad del radioinmunoensayo.

PREPARACION DE LA CURVA STANDARD

CURVA STANDARD PARA FSH

Se toma una alicuota de 100 λ de la preparaci3n standard de FSH (NIAMDD-RAT FSH-RP-1) y se diluye con 1,9 cc. de tampon fosfato 0,01 M. con 1 % de albumina bovina, de esta disoluci3n - que llamaremos A₁ hacemos las siguientes diluciones:

- 100 λ FSH-standard	+ 1,9 cc. TAMPON	— A ₁	1000	ng/200 λ
- 1 cc. A ₁	+ 1 cc "	— A ₂	500	ng/200 λ
- 1 cc. A ₂	+ 1 cc "	— A ₃	250	ng/200 λ
- 1 cc. A ₃	+ 1 cc "	— A ₄	125	ng/200 λ
- 1 cc. A ₄	+ 1 cc "	— A ₅	62,5	ng/200 λ
- 1 cc. A ₅	+ 1 cc "	— A ₆	31,25	ng/200 λ
- 1 cc. A ₆	+ 1 cc "	— A ₇	15,62	ng/200 λ
- 1 cc. A ₇	+ 1 cc "	— A ₈	7,8	ng/200 λ

CURVA STANDARD PARA LH

Se toman 20 λ de la LH standard -

(NIAMDD-RAT LH-RP-1) se diluyen con 4 cc. de albúmina bovina obteniéndose así la disolución A₁ de la que se obtienen las siguientes disoluciones:

-	20 λ	LH-standard	+	4	cc.	TAMPON	—	A ₁	100	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₁	+	1	cc	"	A ₂	55	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₂	+	1	cc	"	A ₃	25	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₃	+	1	cc	"	A ₄	12,5	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₄	+	1	cc	"	A ₅	6,25	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₅	+	1	cc	"	A ₆	3,12	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₆	+	1	cc	"	A ₇	1,56	ng/200 λ
-	1	cc.	A ₇	+	1	cc	"	A ₈	0,78	ng/200 λ

PREPARACION DEL PRIMER ANTICUERPO PARA FSH

Se toman 100 λ de anticuerpo y se disuelven en 12,5 cc. de tampon EDTA 3 % suero de conejo quedando disuelto en la proporción 1/1250.

PREPARACION DEL PRIMER ANTICUERPO PARA LH

Se disuelve en la proporción 1/5000, disolviendo 10 λ de anticuerpo 1/100 en 4,9 cc. -

de tampon EDTA 3 % suero de conejo.

PREPARACION DE LA HORMONA MARCADA FSH Y LH

Se disuelven en tampon fosfato 0,01 M 1 % de albumina bovina de forma que tenga una radioactividad de 20.000 cuentas por minuto por 100 λ .

PREPARACION DEL SEGUNDO ANTICUERPO

Se disuelven 0,75 cc. de anticuerpo - en 14,25 cc. de tampon fosfato 0,01 M para cada - 75 tubos.

REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO

El método de radioinmunoanálisis necesita los siguientes grupos de tubos:

- 1.- Fondo, conteniendo tampon fosfato y la solución de hormona marcada.

- 2.- Standard 0 (B_0), que contiene -
tampon fosfato, hormona marcada
y anticuerpo, estos tubos corres-
ponden a la máxima unión del an-
ticuerpo con la hormona marcada.
- 3.- Curva standard (A_1, \dots, A_8)
que contienen tampon fosfato, -
la solución standard correspon-
diente, el anticuerpo y la solu-
ción de hormona marcada.
- 4.- Sueros problema (X_1, \dots, X_n)
que contienen tampon fosfato, -
suero problema, anticuerpo y la
solución de hormona marcada.

INCUBACION

Una vez añadidos los reactivos, los tubos se agitan e incuban rotando 24 horas a temperatura ambiente para lograr el equilibrio de la reacción.

SEPARACION DE LA HORMONA LIBRE DE LA UNIDA AL AN-
TICUERPO

Una vez incubados, se añade a todos -
los tubos el segundo anticuerpo, que precipita la
hormona unida al anticuerpo.

Los tubos se agitan y se ponen a ro-
tar 24 horas en la cámara fría.

MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD

Después de la incubación, los tubos -
se centrifugan a 2.500 rpm. durante 30 minutos, -
tras lo cual se aspira el sobrenadante con una --
bomba de vacío, se tapan y se mide la radioactividad
con un contador gamma.

CALCULO DE RESULTADOS

Blanco-Fondo, es la fracción de hormona
marcada no ligada al anticuerpo que contamina
todos los tubos, su valor se le resta a cada uno

de los tubos de análisis.

B_0 -Standard 0, indica la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo en ausencia de hormona no marcada se le atribuye el 100 % de la unión y los restantes valores se expresan en % respecto a B_0 , según la expresión:

$$B/B_0 \times 100$$

CONSTRUCCION DE LA CURVA STANDARD

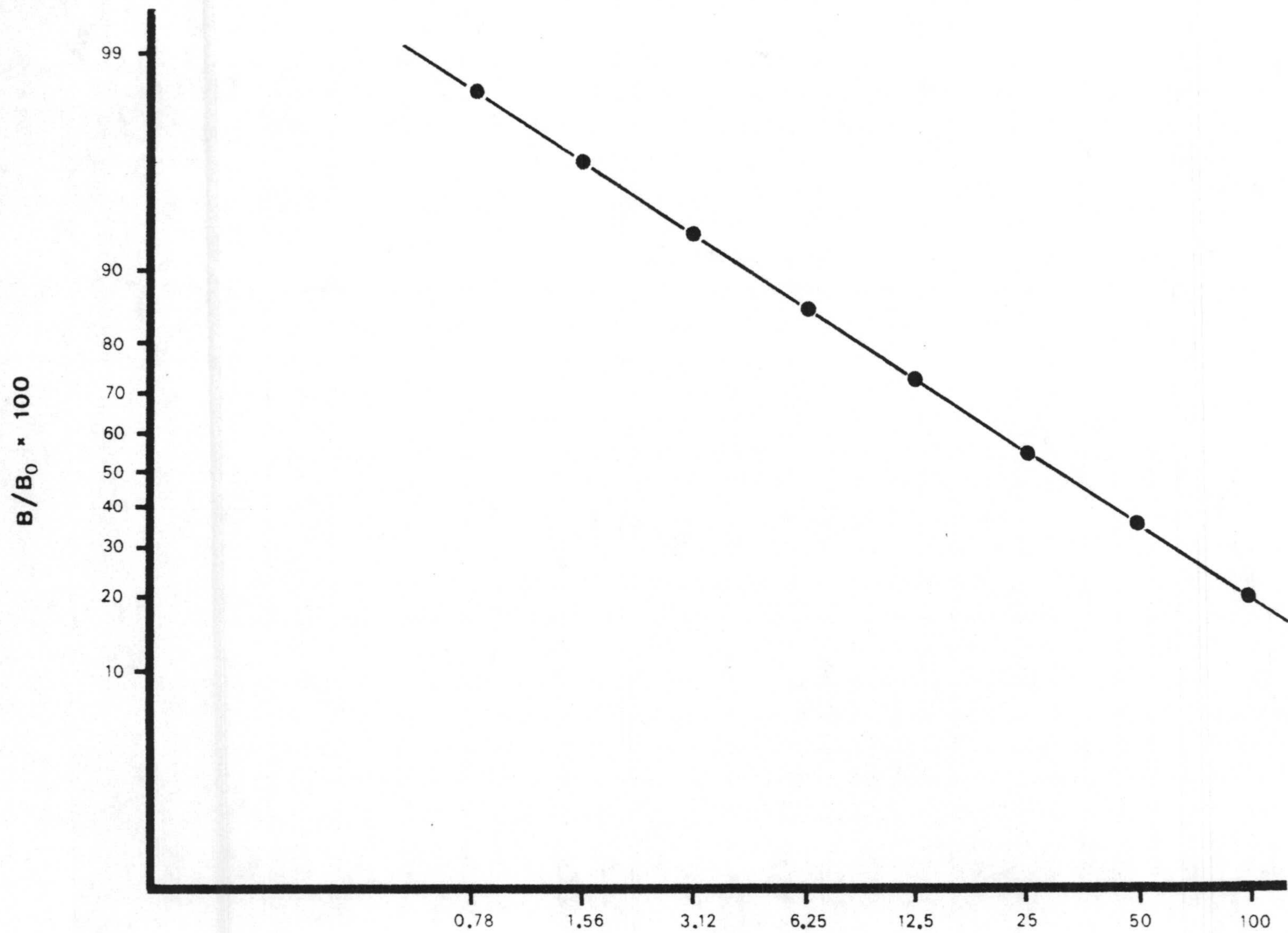
La curva standard se construye sobre papel logit-log , linearizándola según el método propuesto por Rodbard, Bridson y Rayford, en 1.969, representando el tanto por ciento de radioactividad de los tubos en ordenadas frente a la dosis de hormona en abcisas. (Fig. 2 y 3).

Una vez trazada la recta de valores de hormona, de los sueros problema se obtienen - por interpolación en la misma del porcentaje de radioactividad obtenida en cada tubo.

PROCOLO PARA LA EXPERIENCIA DE LH Y FSH

TUBO NUMERO	TAMPON	STANDARD O PROBLEMA	HORMONA MARCADA	ANTISUERO	ANTISUERO ANTIGAMMA-GLOBULINA
1	500 λ	Fondo	100 λ	EDTA 200 λ	200 λ
2	↓	B_0		↓	
3					
4	↓	200 λ A_1		↓	
5					
6	300 λ	↓		↓	
7					
8		200 λ A_2			
9					
10		↓			
11					
12		200 λ A_3			
13					
14		↓			
15					
16		200 λ A_4			
17					
18		↓			
19					
20		200 λ A_5			
21					
22		↓			
23					
24		200 λ A_6			
25					
26		↓			
27					
28		200 λ A_7			
29					
30		↓			
31					
32		200 λ X_1			
33					
34		↓			
35					
36		200 λ X_2			
37					
38		↓			
39					
40		200 λ X_3			
41					
42		↓			
43					
44		200 λ X_4			
45					
⋮	↓	⋮		↓	
⋮					
⋮		↓			
⋮					

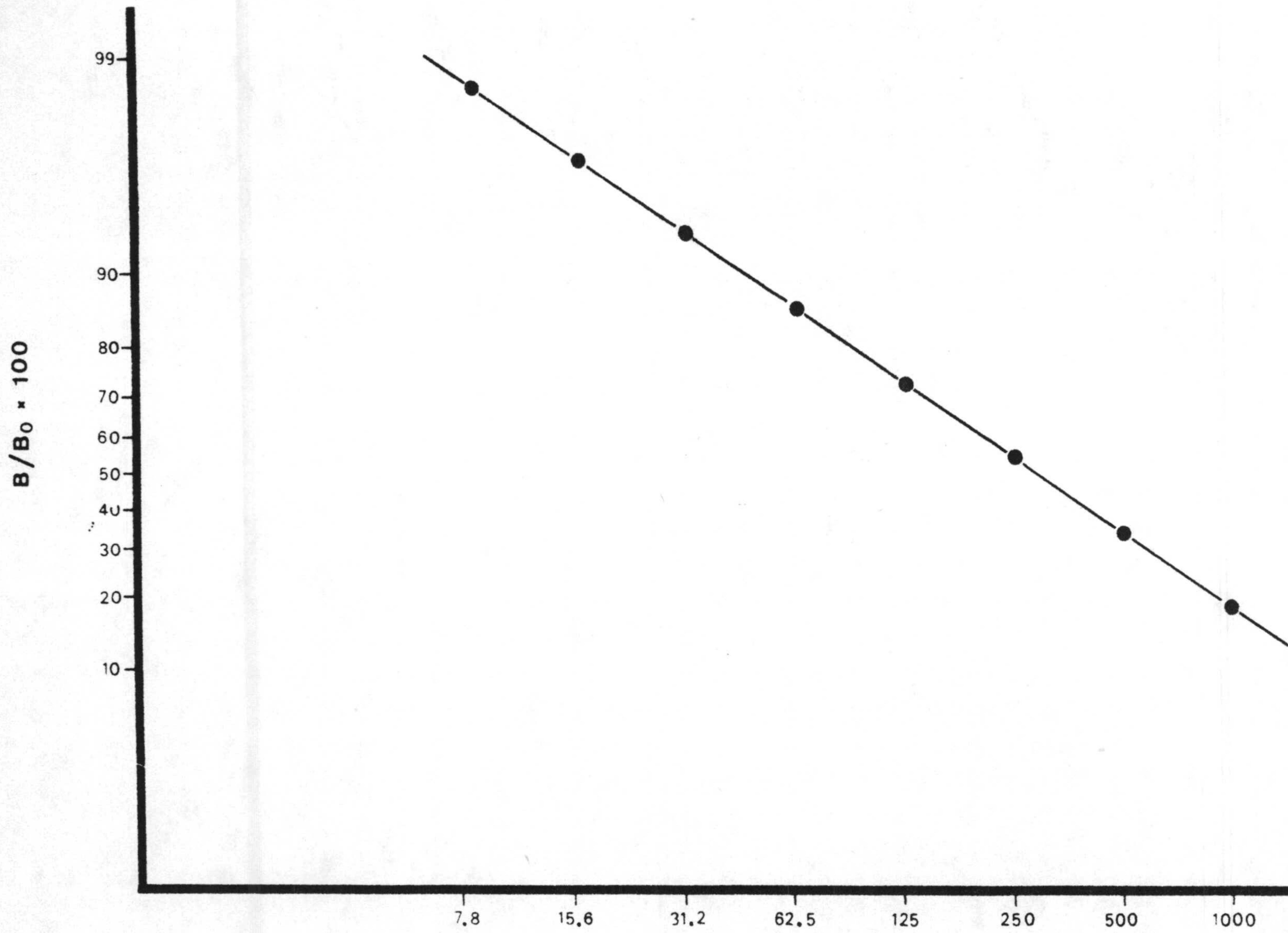
CURVA STANDARD DE LH



NG DE LH AÑADIDOS

(Fig. 2)

CURVA STANDARD DE FSH



NG DE FSH AÑADIDOS

(Fig. 3)

MARCAJE DE PROLACTINA

Se utilizan los siguientes reactivos:

- ^{125}I odo, en forma de yoduro sódico con una actividad específica de 10 mCi/ml.
- Tampón fosfato sódico 0,5 M. pH 7,6.
- Cloramina-T. La solución de cloramina-T se prepara justo antes de usarla en la proporción de 5 mg en 10 mililitros de tampón fosfato 0,05 M. pH 7,6.
- Metabisulfito sódico, que se prepara también antes de su uso disolviendo 24 mg. en 10 mililitros de tampón fosfato 0,05 M. pH 7,6.
- Prolactina de rata (NIADDK-rPRL-I-5) 2,5 μg en 25 μl . de tampón bicarbonato 0,01 M.
- Solución Rinse, se prepara disolviendo 1 gramo de KI y 8 gramos de sacarosa en 100 mililitros de agua destilada.

PROCEDIMIENTO

En un vial de cristal de 50 x 8 mm. -

se van echando los diferentes reactivos:

- 35 μ l de tampón fosfato 0,5 M. pH 7,6.
- se añaden 10 μ l de I^{125} equivalentes a 1 mCi.
- se añaden 25 μ l de prolactina purificada de rata equivalentes a 2,5 μ g. de hormona y se agita.
- se añaden 15 μ l de solución de cloramina-T y se agita durante 20 segundos.
- después de los cuales se añaden 50 μ l de metabisulfito sódico y se agita.
- se añaden 100 ml. de solución Rinse.

La mezcla se aplica a una columna de - sephadex G-50, el tubo de reacción se lava con solución Rinse y el lavado se coloca en la columna.

Entonces se lava la columna haciendo - pasar tampón borato 0,01 M. pH 8,6 y se hace pasar - un flujo de 3 gotas por minuto que se recogen en un colector de fracciones ajustado a 25 gotas (1 ml.) / tubo, las alicuotas contiene 0,5 ml de tampón fosfo salino 0,01 M con albumina 1 %.

RESULTADOS

De cada tubo se toma una muestra de 25 μ l y se lleva al contador para efectuar la -- curva de radioactividad.

Se obtienen dos picos de radioactividad, el primero en los tubos 4 - 6 que corresponden a la prolactina marcada y el segundo sobre el tubo 15 que corresponde al I^{125} libre. La hormona marcada se congela hasta su uso.

PREPARACION DE LA COLUMNA SEPHADEX

Se disuelven 4 gramos de Sephadex -- G-50 en tampon borato 0,01 M. pH 7,6 en un matraz quitasato y se pone al baño maria durante dos horas después de lo cual se conecta el matraz a una bomba de vacío y se agita con un agitador magnético durante una hora para extraer el aire disuelto.

La columna se llena de igual forma

que la utilizada para el marcaje de LH y FSH y se deja empaquetar durante 12 horas haciendo pasar - tampón borato 0,01 M. pH 8,6.

VALORACION DEL PRIMER ANTICUERPO DE PROLACTINA

Se hacen seis disoluciones sucesivas del anticuerpo para prolactina (NIADDK-ANTI-rPRL-5-8) de la siguiente forma:

Se toman 40 λ del anticuerpo disuelto 1/10 y se disuelven en 2,5 cc. de tampón EDTA - fosfato dando una solución 1/62,5 y de esta forma se van haciendo las demás soluciones:

					<u>DISOLUCION</u>
- 40 λ Anticuerpo	1/10	+ 2,5	cc. TAMPON		1/62,5
- 1 cc. disolución	1/62,5	+ 1	cc. "		1/125
- 1 cc. "	1/125	+ 1	cc. "		1/250
- 1 cc. "	1/250	+ 1	cc. "		1/500
- 1 cc. "	1/500	+ 1	cc. "		1/1000
- 1 cc. "	1/1000	+ 0,3	cc. "		1/1500

Se disuelve la prolactina standard -

para dar una concentración de 25 ng/200 λ y la hormona marcada de manera que dé una actividad de 20.000 cuentas por minuto en 10 λ .

Se opera de igual forma que en la valoración del primer anticuerpo de FSH y LH interpretándose del mismo modo los resultados.

RADIOINMUNOANALISIS DE PROLACTINA

CURVA STANDARD PARA PROLACTINA

Se toma una alícuota de 50 λ de la preparación standard de prolactina (NIADDK - rPRLrP-3) y se diluye con 1.950 λ de tampón fosfato 0,01 M. 1 % de albumina bovina y de ésta se hacen sucesivamente las siguientes disoluciones:

- 50 λ PRL-standard	+ 1950 λ TAMPON	- A ₁	50	ng/200
- 800 λ A ₁	+ 800 λ "	- A ₂	25	ng/200
- 800 λ A ₂	+ 800 λ "	- A ₃	12,5	ng/200
- 800 λ A ₃	+ 800 λ "	- A ₄	6,25	ng/200
- 800 λ A ₄	+ 800 λ "	- A ₅	3,12	ng/200
- 800 λ A ₅	+ 800 λ "	- A ₆	1,56	ng/200
- 800 λ A ₆	+ 800 λ "	- A ₇	0,78	ng/200
- 800 λ A ₇	+ 800 λ "	- A ₈	0,39	ng/200

PREPARACION DEL PRIMER ANTICUERPO PARA PROLACTINA

Se toma una alicuota de 100 λ de anticuerpo y se disuelven en 30 cc. de tampón fosfato EDTA quedando disuelta en la proporción 1/3000.

PREPARACION DE LA PROLACTINA MARCADA

Se disuelve en tampón fosfato 0,01 M. 1 % de albumina bovina de forma que tenga una actividad de 20.000 cuentas por minuto en 100 λ .

PREPARACION DEL SEGUNDO ANTICUERPO

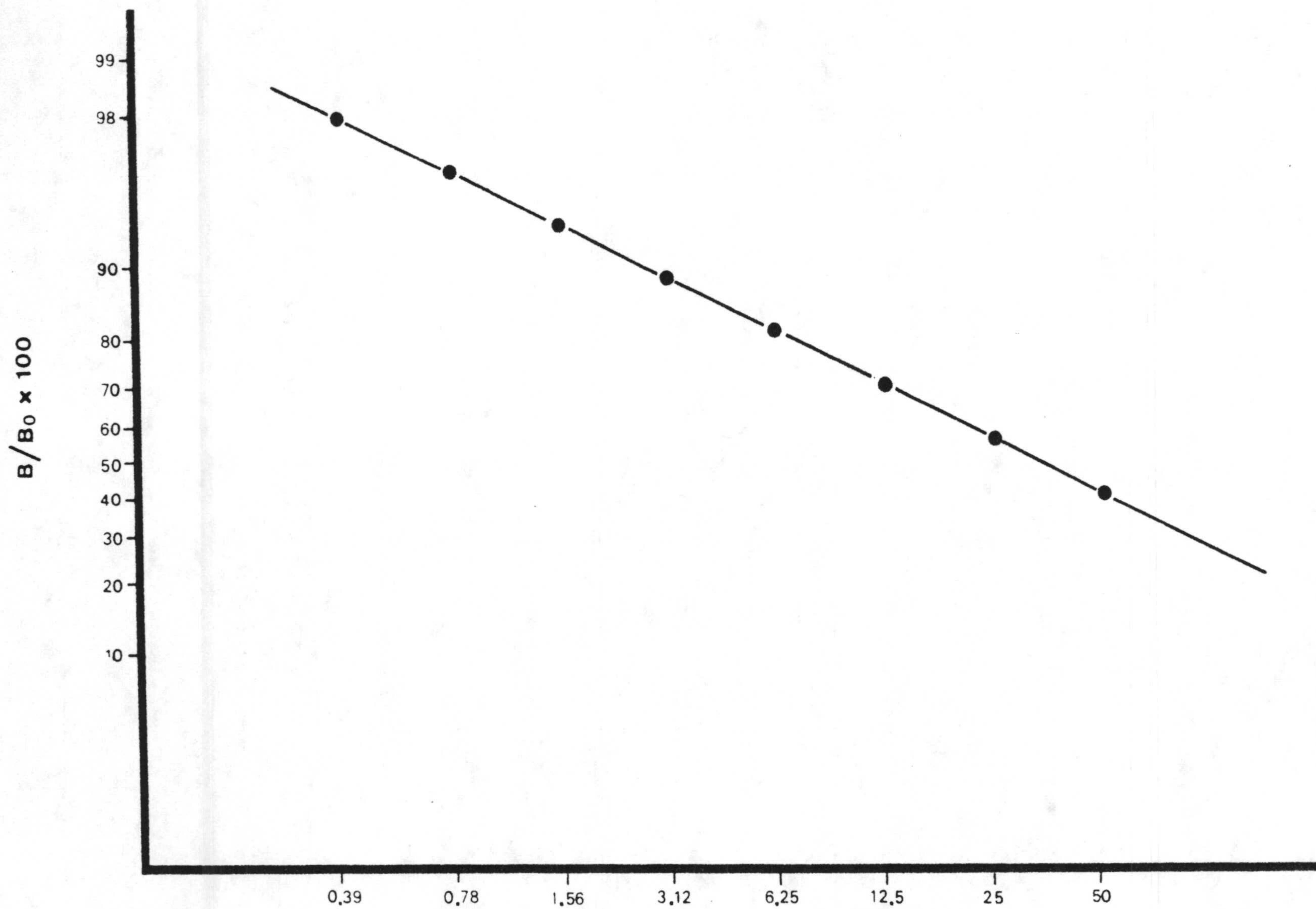
Se disuelven 1,5 cc. del segundo anticuerpo en 13,5 cc. de tampón fosfato 0,01 M. para cada 75 tubos.

El procedimiento operativo y el cálculo de resultados es igual que el utilizado en el radioinmunoanálisis de LH y FSH. (Fig. 4).

PROTOCOLO PARA LA EXPERIENCIA DE PROLACTINA

TUBO NUMERO	TAMPON	STANDARD o PROBLEMA	HORMONA MARCADA	ANTISUERO	ANTISUERO ANTIGAMMA- GLOBULINA
1	700 λ	A _T	100 λ		
2	↓		↓		
3					
4	300 λ	B ₀		EDTA + Ac 200 λ	200 λ
5	↓			↓	↓
6					
7	100 λ	200 λ A ₁			
8	↓	↓			
9					
10		200 λ A ₂			
11		↓			
12					
13		200 λ A ₃			
14		↓			
15					
16		200 λ A ₄			
17		↓			
18					
19		200 λ A ₅			
20		↓			
21					
22		200 λ A ₆			
23		↓			
24					
25		200 λ A ₇			
26		↓			
27					
28		200 λ A ₈			
29		↓			
30					
31		200 λ X ₁			
32		↓			
33					
34		200 λ X ₂			
35		↓			
36					
37		200 λ X ₃			
38		↓			
39					
40		200 λ X ₄			
41		↓			
42					
43		200 λ X ₅			
44		↓			
45					
⋮	↓	⋮	↓	↓	↓
⋮					
⋮					

CURVA STANDARD DE PROLACTINA



NG DE PROLACTINA AÑADIDOS

(Fig. 4)

RADIOINMUNOANALISIS DE TESTOSTERONA

Las medidas de los niveles de testosterona en suero se han hecho con Kits comerciales de la casa CEA SORIN referencia TESTOK-M.

Los reactivos utilizados en este kit son los siguientes:

Testosterona tritiada

Cada vial contiene una cantidad de -
testosterona tritiada suficiente para 100 tubos, -
en 0,5 ml. de etanol. Su radiactividad es de 0,35
 μ Ci por vial.

Se disuelve la disolución de etanol
en 10 ml. de tampón quedando en la proporción 1/20.

Testosterona standard

Cada vial contiene 400 ng. de hormona

en un mililitro de etanol, con esta disolución se constituye la curva standard de la siguiente forma:

- 0,1 ml. standard	+ 10 ml. tampon	A ₁ 4	ng/ml.
- 0,5 ml. solución A ₁	+ 0,5 ml. "	A ₂ 2	ng/ml.
- 0,5 ml. "	A ₂ + 0,5 ml. "	A ₃ 1	ng/ml.
- 0,5 ml. "	A ₃ + 0,5 ml. "	A ₄ 0,5	ng/ml.
- 0,5 ml. "	A ₄ + 0,5 ml. "	A ₅ 0,25	ng/ml.
- 0,5 ml. "	A ₅ + 0,5 ml. "	A ₆ 0,125	ng/ml.

ANTISUERO PARA TESTOSTERONA

El antisuero viene en forma de polvo - liofilizado con albumina bovina y conservantes, en -- cantidad suficiente para 100 tubos. Se reconstituye con 10 ml. de agua destilada.

TAMPON EDTA

Se disuelve en 200 ml. de agua destilada

da obteniéndose una disolución a pH 7,4.

CHARCOAL-DEXTRANO

Cada vial contiene 0,13 gramos de mezcla seca que se suspende en 60 ml. de tampón.

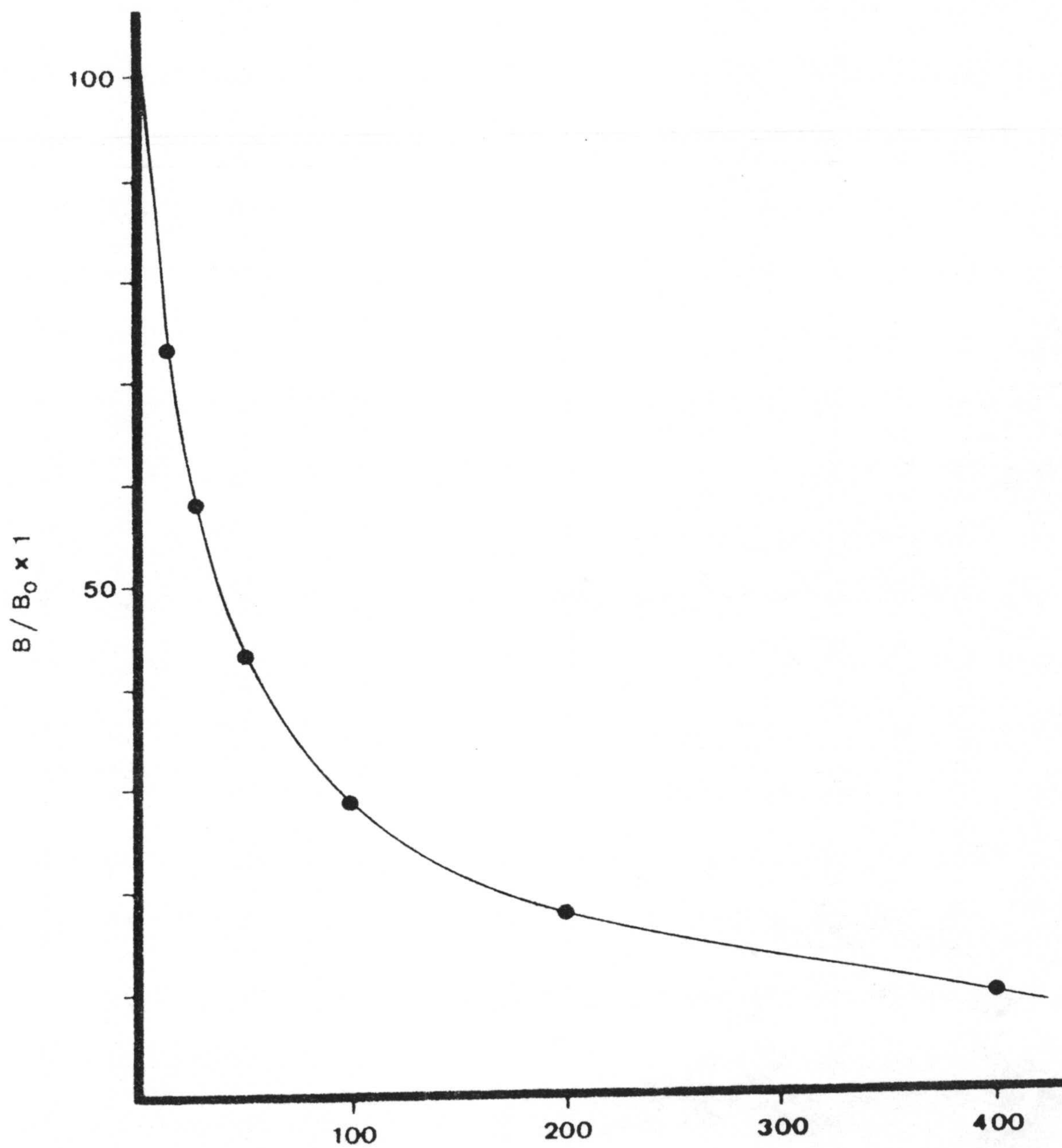
PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION

Las muestras de suero tienen que ser sometidas a una extracción preliminar al análisis. Se opera de la siguiente forma:

- Se toma 1 ml. de suero al que se añaden 3 ml. de eter etílico.
- los tubos se taponan y se agitan durante 2 minutos.
- se centrifugan cinco minutos a 2.000 rpm.
- se toman 0,5 ml. y se echan en los tubos usados para el análisis.
- se evapora el contenido de los tubos en un aparato de evaporación.

Se sigue el mismo procedimiento operativo, y los resultados son calculados de igual forma que en los radioinmunoanálisis anteriormente descritos, haciendose cada muestra por duplicado. (Fig. 5).

CURVA STANDARD DE TESTOSTERONA



PG DE TESTOSTERONA AÑADIDOS

(Fig. 5)

RESULTADOS

ESTUDIO ESTADISTICO

En este capítulo se presentan de forma resumida los métodos estadísticos que han sido - utilizados en el análisis de los resultados.

CALCULO DE LA MEDIA Y LA VARIANZA

Dada una muestra $x_1, x_2 \dots \dots \dots x_n$ de los valores de una variable x en n individuos tomados de una población normal la media y la varianza se calculan mediante las siguientes expresiones:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

TEST DE COMPARACION DE DOS MEDIAS. TEST DE COMPARACION DE DOS VARIANZAS.

Sea una variable que se estudia en dos poblaciones diferentes. Sea una muestra x_1, x_2, \dots, x_n de n valores de la primera población y sea otra y_1, y_2, \dots, y_m de m valores de la segunda población. Sean $\bar{x}, \bar{y}, s_x^2, s_y^2$ las medias y varianzas estimadas a partir de dichas muestras y calculadas como se ha indicado anteriormente. Se desea comprobar si el valor medio de la variable en la primera población es igual o no al valor medio en la segunda población.

El primer paso es ver si las varianzas son homogéneas (iguales) o no. Para ello la cantidad:

$$F_{\text{exp.}} = s_x^2 / s_y^2 \quad (\text{Poniendo en el numerador la varianza mayor})$$

se compara con una cantidad teórica F_{α} que se busca en las tablas de Snedecor con $(n-1, m-1)$ grados de libertad al α % de error (Tabla A.14 de la refe-

rencia II) en donde el error α es elegido en cada ocasión a conveniencia. Entonces:

Si $F_{\text{exp.}} \leq F_{\alpha}$ ambas varianzas son iguales

Si $F_{\text{exp.}} > F_{\alpha}$ ambas varianzas son distintas con α error.

Cuando las varianzas sean iguales. Calcular:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}} \quad \text{con } s^2 = \frac{(n-1)S_x^2 + (m-1)S_y^2}{n + m - 2}$$

cantidad que se compara con una cantidad teorica t_{α} buscada en la tabla de Student (Tabla A.4 de la referencia II) con $(n+m-2)$ grados de libertad y el error α deseado.

Cuando las varianzas sean distintas calcular entonces:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{S_x^2}{n} + \frac{S_y^2}{m}}}$$

cantidad que se compara con una teórica:

$$t_{\alpha} = \frac{t_x \frac{S_x^2}{n} + t_y \frac{S_y^2}{m}}{\frac{S_x^2}{n} + \frac{S_y^2}{m}}$$

en donde t_x y t_y se buscan en la misma tabla A.4 de Student con $(n-1)$ y $(m-1)$ grados de libertad respectivamente. En ambos casos:

Si $t_{\text{exp.}} \leq t_{\alpha}$ entonces las medias de ambas poblaciones son iguales.

Si $t_{\text{exp.}} > t_{\alpha}$ las medias son distintas con un error α .

Al último test se le denomina test de Cochran (1.967).

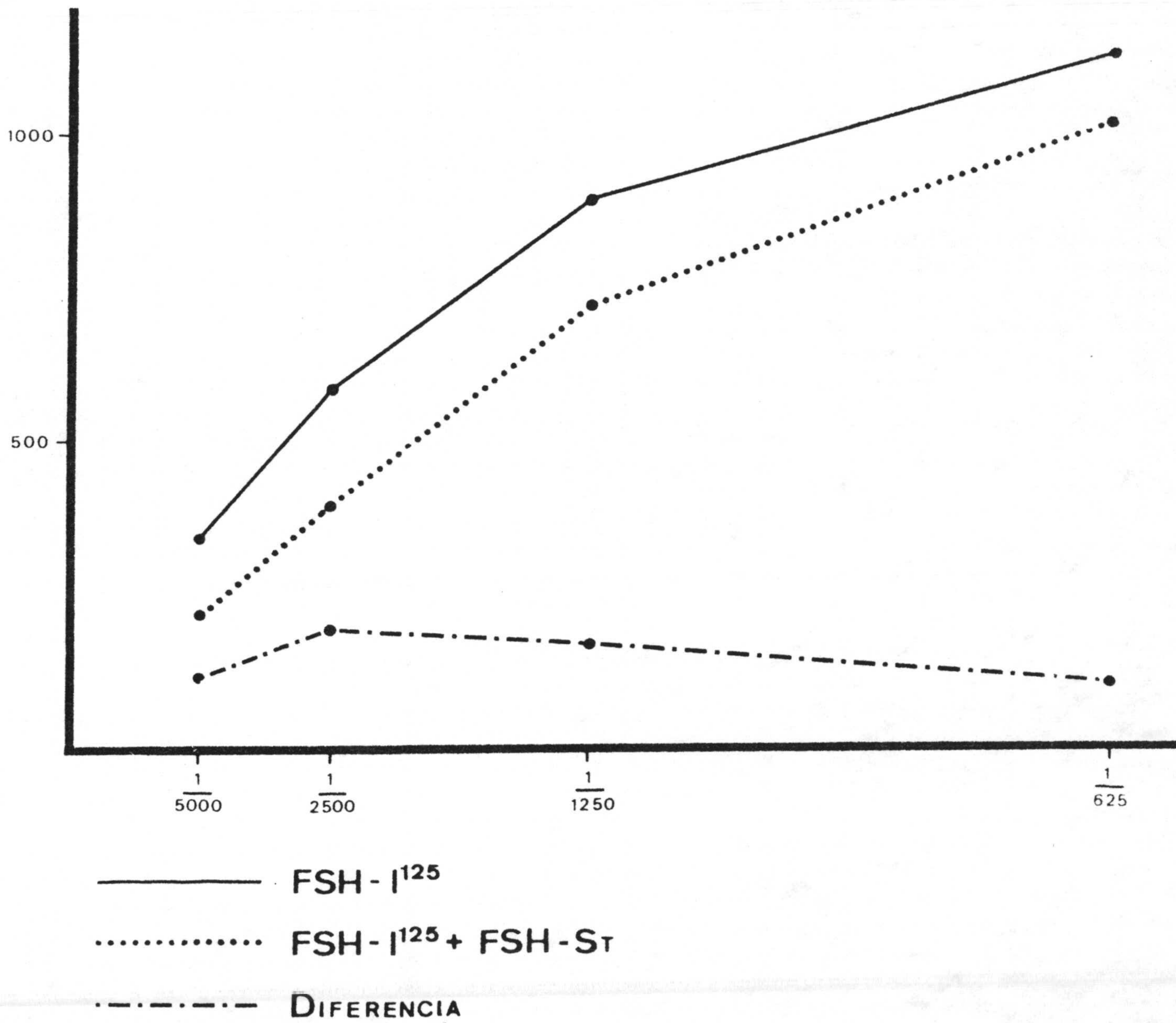
RESULTADOS DE LA VALORACION DEL PRIMER ANTICUERPO
PARA FSH

Se ha efectuado la valoración del primer anticuerpo para FSH según el sistema descrito en la sección de material y métodos, obteniendo se los siguientes resultados.

Dilución	c.p.m. sin hormona standard	c.p.m. con hormona standard	Diferencia
1/5000	342	220	122
1/2500	582	391	191
1/1250	892	717	175
1/625	1127	1011	116

Con estos datos se construye la gráfica de la Fig. nº 6 . Los resultados indican que la mayor efectividad del radioinmunoanálisis se obtienen utilizando una disolución de 1/2500 del primer anticuerpo para FSH (NIAMDD-ANTI-RAT FSH-SERUM-10).

VALORACION 1° ANTICUERPO DE FSH



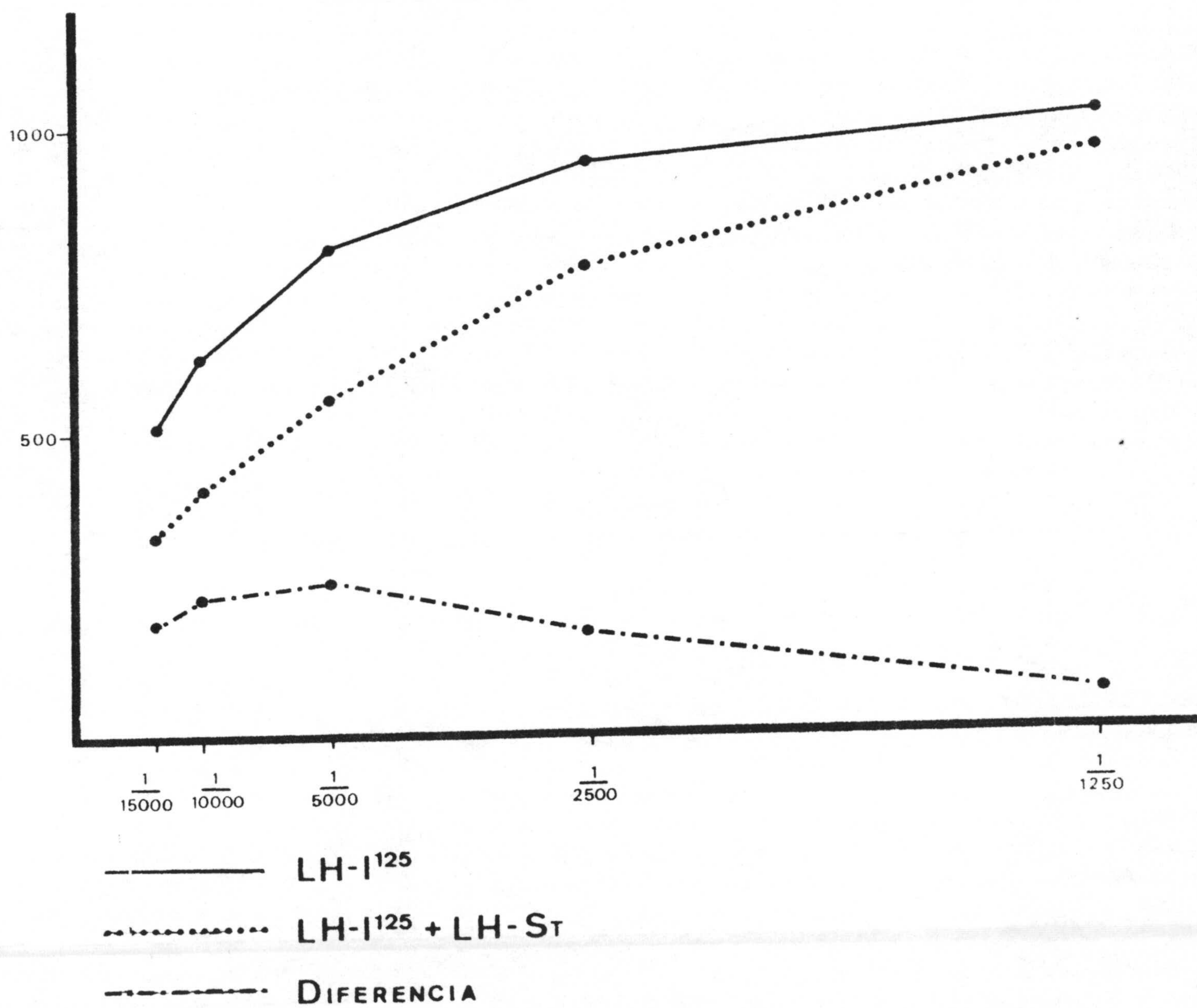
(Fig. 6)

RESULTADOS DE LA VALORACION DEL PRIMER ANTICUERPOPARA LH

Igualmente se ha procedido a valorar el - primer anticuerpo para LH, según el sistema y las concentraciones indicadas en la sección de material y métodos, obteniéndose los siguientes resultados:

Dilución	c.p.m. sin hormona standard	c.p.m. con hormona standard	Diferencia
1/15000	504	321	183
1/10000	627	401	226
1/5000	806	559	247
1/2500	942	772	170
1/1250	1018	956	62

Utilizando estos datos se construye la gráfica de la fig.n° 7 . De estos resultados se deduce - que la mayor efectividad del radioinmunoanálisis se - obtiene con una concentración de 1/5000 del primer anticuerpo para LH (NIAMDD-ANTI-RAT LH-SERUM S-5).

VALORACION $^{\circ}$ ANTICUERPO DE LH

(Fig. 7)

Fig 7

COEFICIENTE DE VARIACION

Una medida de la reproductividad del método viene dada por el coeficiente de variación, que indica el porcentaje de error asignable a una cierta medida.

$$C.V. = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Se calcula midiendo repetidas veces, en un mismo experimento, la cantidad de hormona contenida en un mismo plasma, y aplicando posteriormente la fórmula anterior.

Los coeficientes de variación obtenidos en los radioinmunoanálisis de cada una de las hormonas estudiadas son:

- Testosterona - 12 %
- LH - 13 %
- FSH - 9 %
- Prolactina - 17 %

T A B L A A

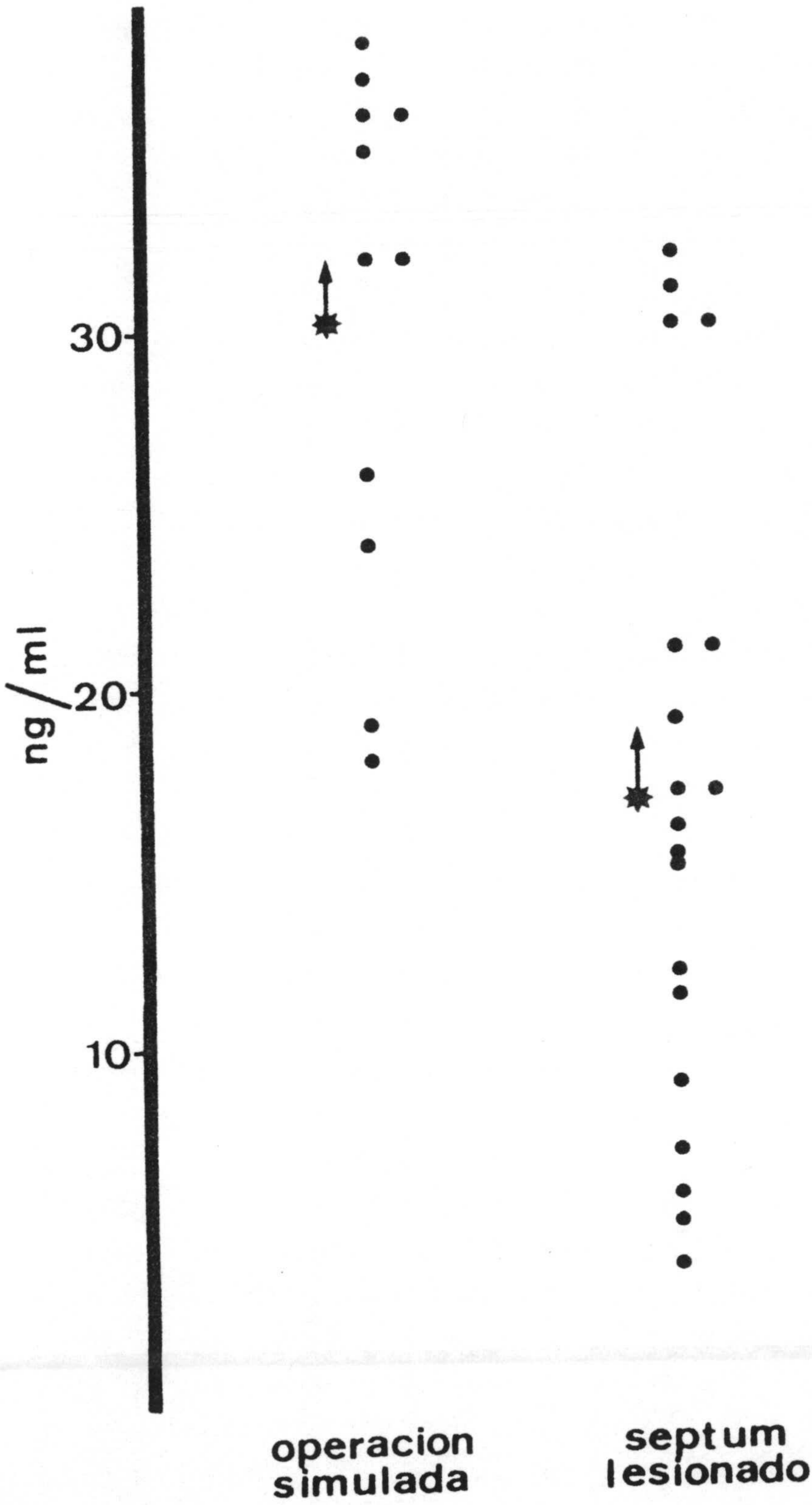
En esta tabla se muestran los valores de LH en suero, en ng/ml. en ratas macho con septum lesionado, o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.).

T A B L A A

LH	
OPERACION SIMULADA	SEPTUM LESIONADO
35	30
37	15,2
36	3,8
24	8,8
19	12
32	5,8
38	17
36	16
18	15
26	21
32	17
	30
	32
	7
	31
	5
	19
	11,4
	21
n = 11 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 30,27 \pm 2,08$	n = 19 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 16,37 \pm 2,01^*$

* p < 0,001

LH



$p < 0,001$

(Fig. 8)

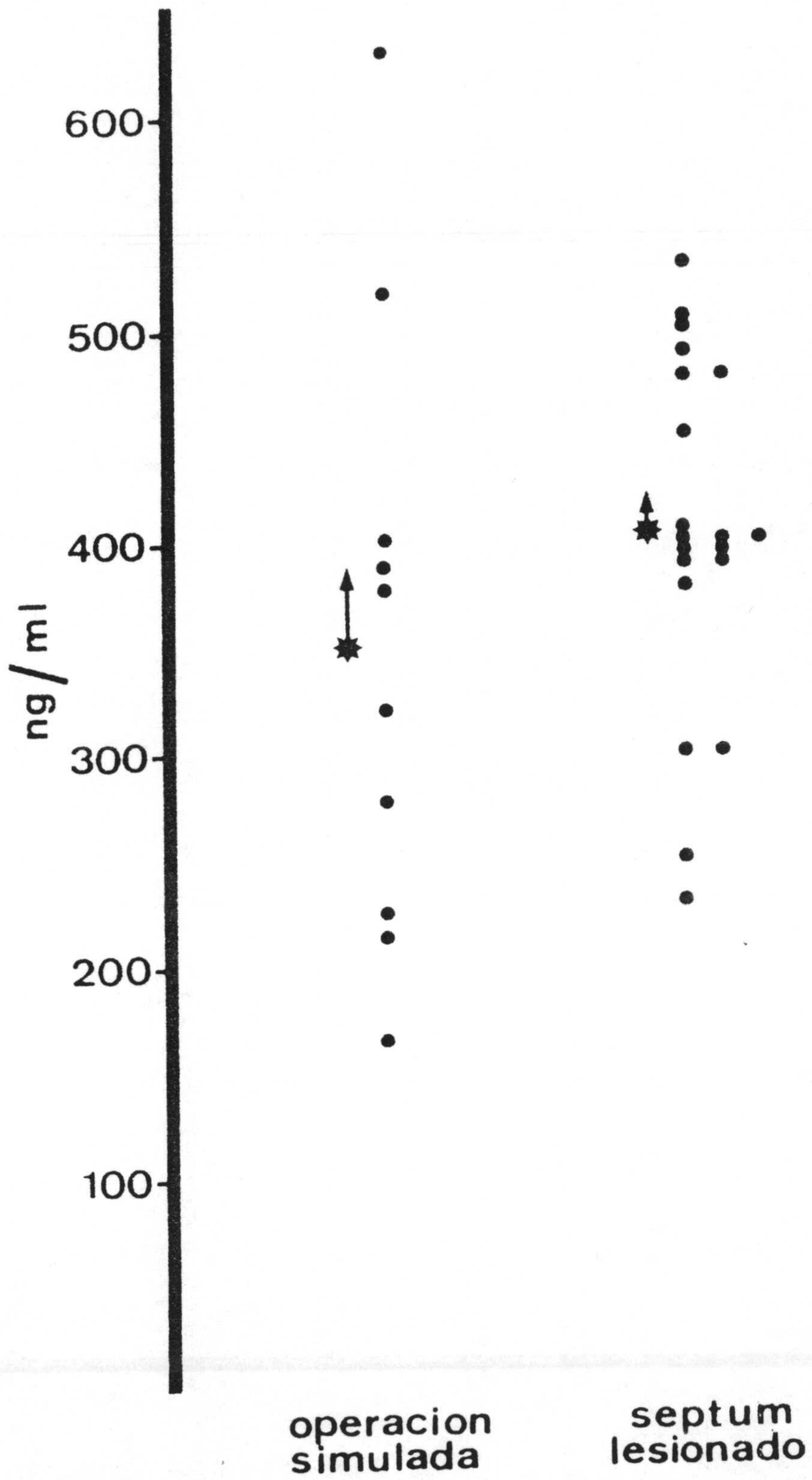
T A B L A B

En esta tabla se muestran los valores de FSH en suero expresados en ng/ml., en ratas macho con -- septum lesionado y con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y error standard (S.E.M.).

T A B L A B

FSH	
OPERACION SIMULADA	SEPTUM LESIONADO
515	405
380	390
630	480
280	530
400	230
165	250
390	400
320	395
215	400
220	300
	395
	300
	505
	480
	390
	450
	490
	380
	400
	500
n = 10 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 351,5 \pm 43$	n = 20 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 404 \pm 18$

FSH



n.s.

(Fig. 9)

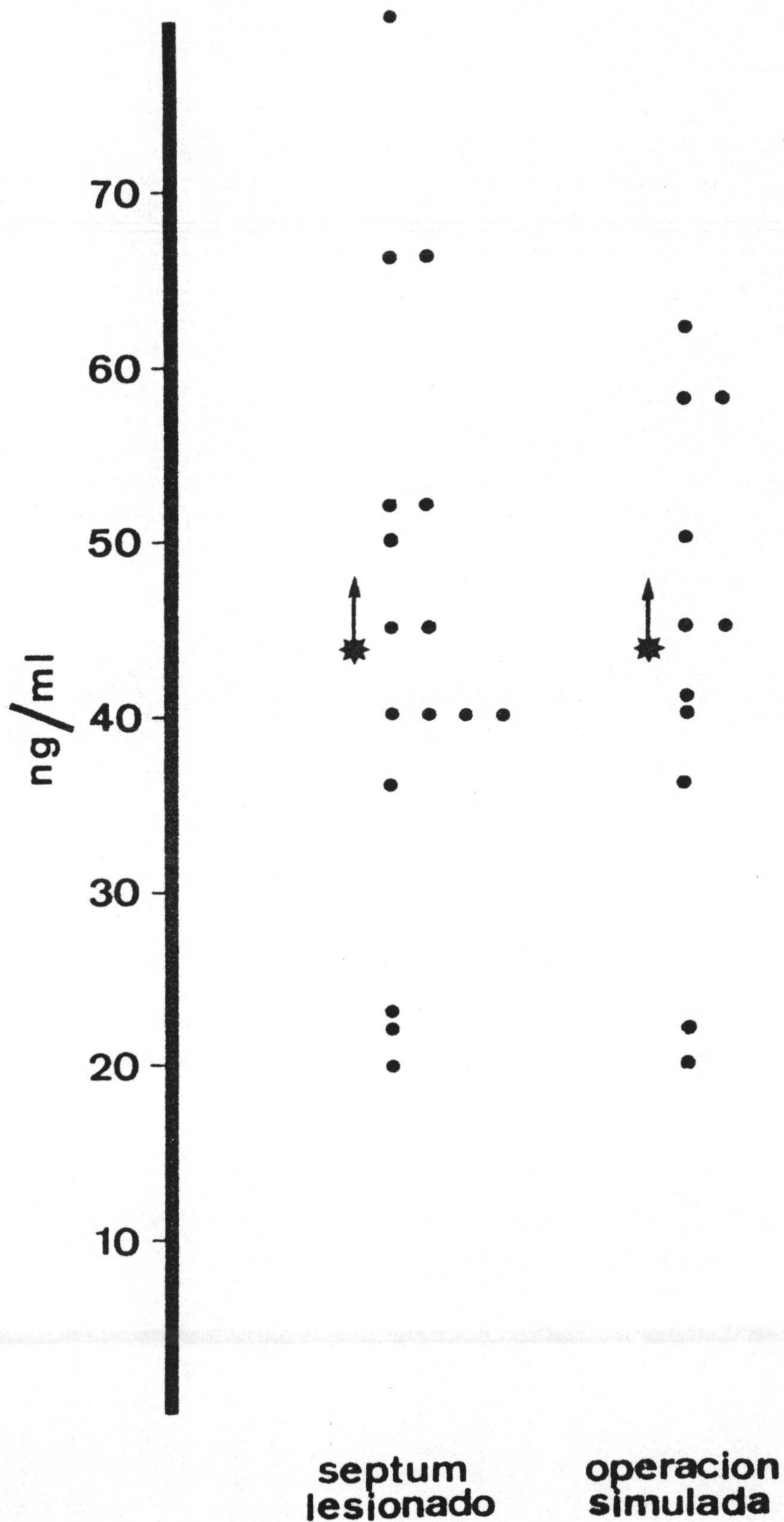
T A B L A C

En ella se muestran los valores de prolactina en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho con septum lesionado y con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.).

T A B L A C

PROLACTINA	
OPERACION SIMULADA	SEPTUM LESIONADO
58	28
41	45
45	52
58	40
22	52
36	20
50	45
40	40
20	66
62	23
45	50
	66
	40
	40
	22
	80
	36
n = 11	n = 17
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 43,3 \pm 4,1$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 43,8 \pm 3,9$

PROLACTINA



n. s

(Fig.10)

T A B L A D

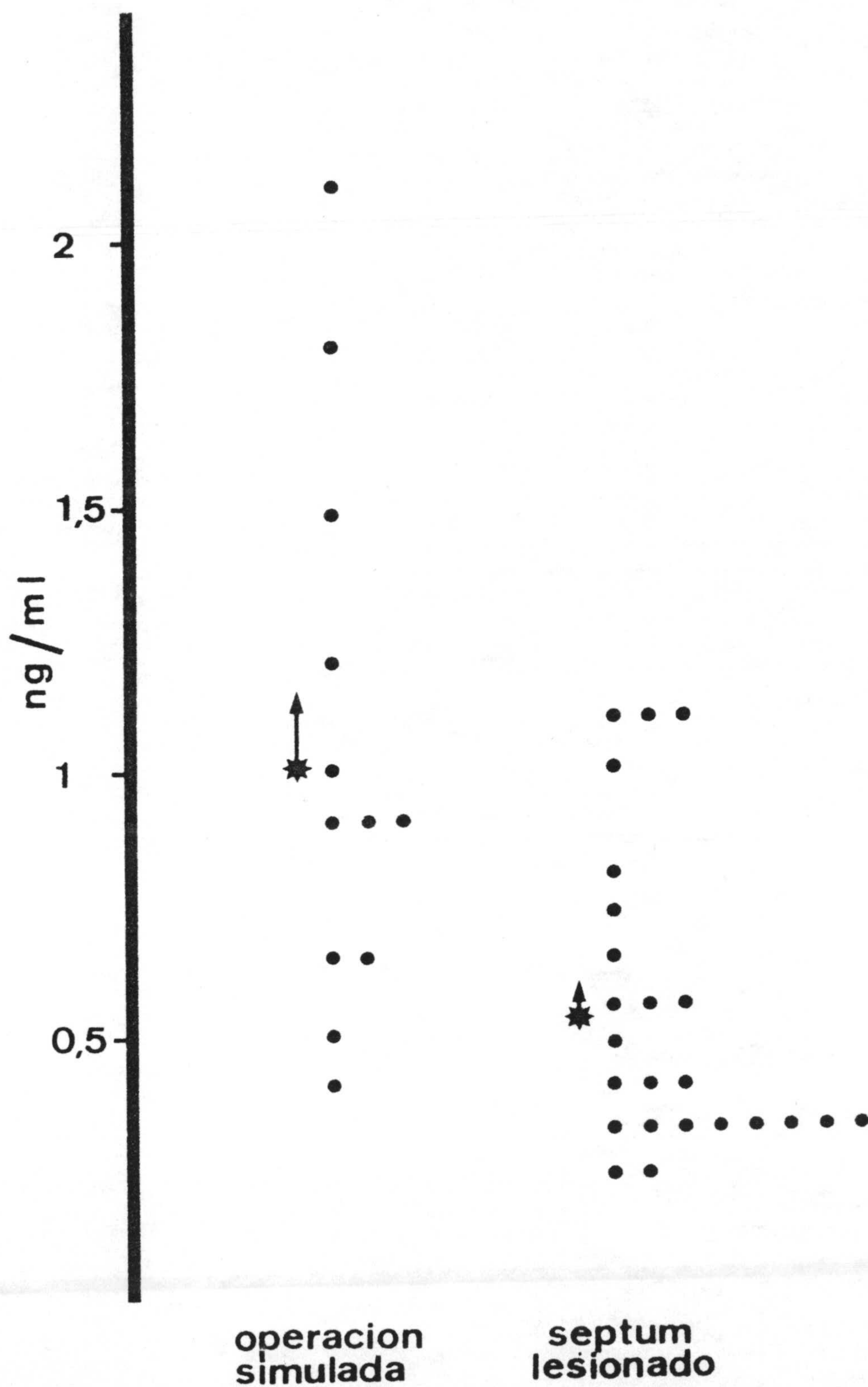
En esta tabla se muestran los valores de testosterona en suero expresados en ng/ml., en ratas macho con septum lesionado o con operación simulada con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.).

T A B L A D

TESTOSTERONA	
OPERACION SIMULADA	SEPTUM LESIONADO
0,80	1
1,2	0,48
1,48	0,32
0,80	0,32
0,50	0,56
0,80	0,72
0,64	0,32
0,40	0,32
1	1,1
2,1	0,56
1,8	0,40
0,64	0,80
	1,1
	0,24
	0,32
	0,32
	0,32
	0,56
	0,40
	0,64
	1,1
	0,24
	0,40
	0,32
n = 12	n = 24
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 1,01 \pm 0,146$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 0,535 \pm 0,057^*$

* p < 0,02

TESTOSTERONA



$p < 0,02$

(Fig. 11)

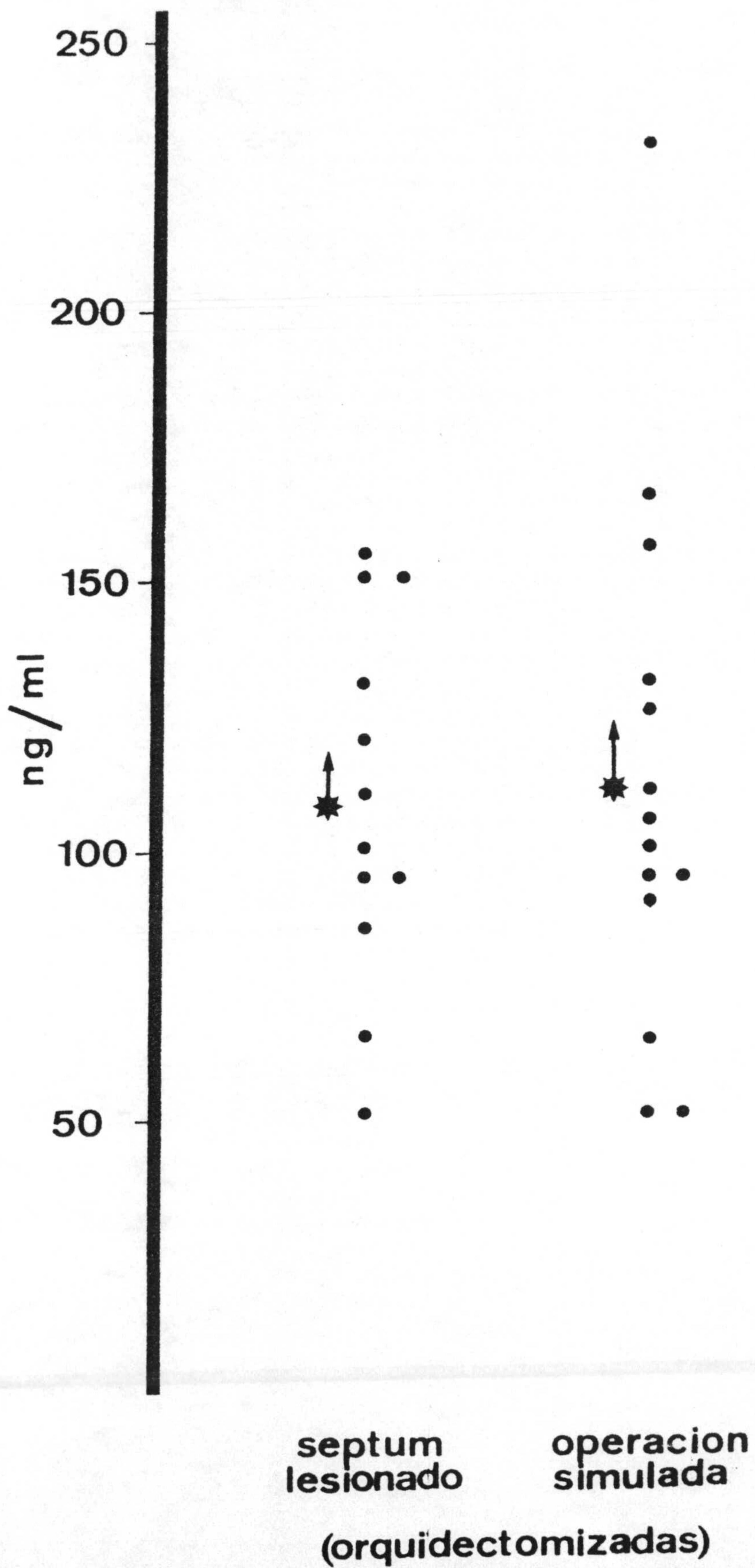
T A B L A E

En esta tabla se muestran los valores de LH en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho orquidectomizadas con septum lesionado o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.).

T A B L A E

LH	
ORQUIDECTOMIZADAS OPERACION SIMULADA	ORQUIDECTOMIZADAS SEPTUM LESIONADO
51,5	120
65	85
95	110
105	51,5
100	155
230	150
155	65
165	95
125	95
95	130
130	150
110	100
90	
50	
n = 14 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$ 111,8 \pm 12,3	n = 12 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$ 108,8 \pm 9,2

LH



(Fig. 12)

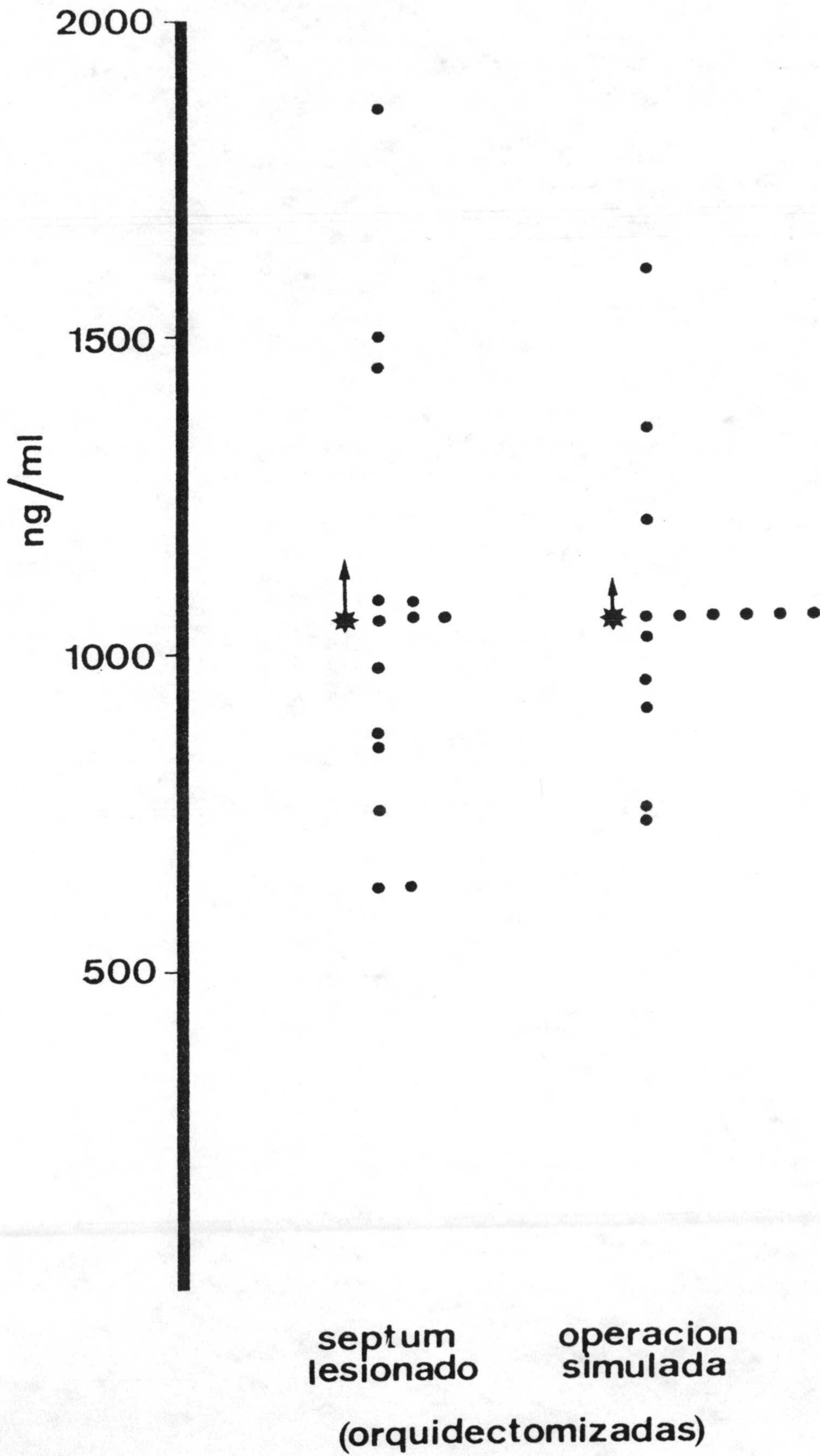
T A B L A F

En esta tabla se muestran los valores de FSH en suero, expresados en ng/ml. en ratas macho orquidectomizadas con septum lesionado o con operación simulada, con los valores medios (\bar{X}) y el error standard (SEM).

T A B L A F

FSH	
ORQUIDECTOMIZADAS OPERACION SIMULADA	ORQUIDECTOMIZADAS SEPTUM LESIONADO
1015	625
1050	1050
950	1450
750	750
1050	975
1050	875
900	850
1050	1050
1200	1850
1600	1050
1050	1075
1350	1500
725	1075
1050	625
n = 14	n = 14
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$
1056 \pm 57	1057 \pm 88

FSH



(Fig. 13)

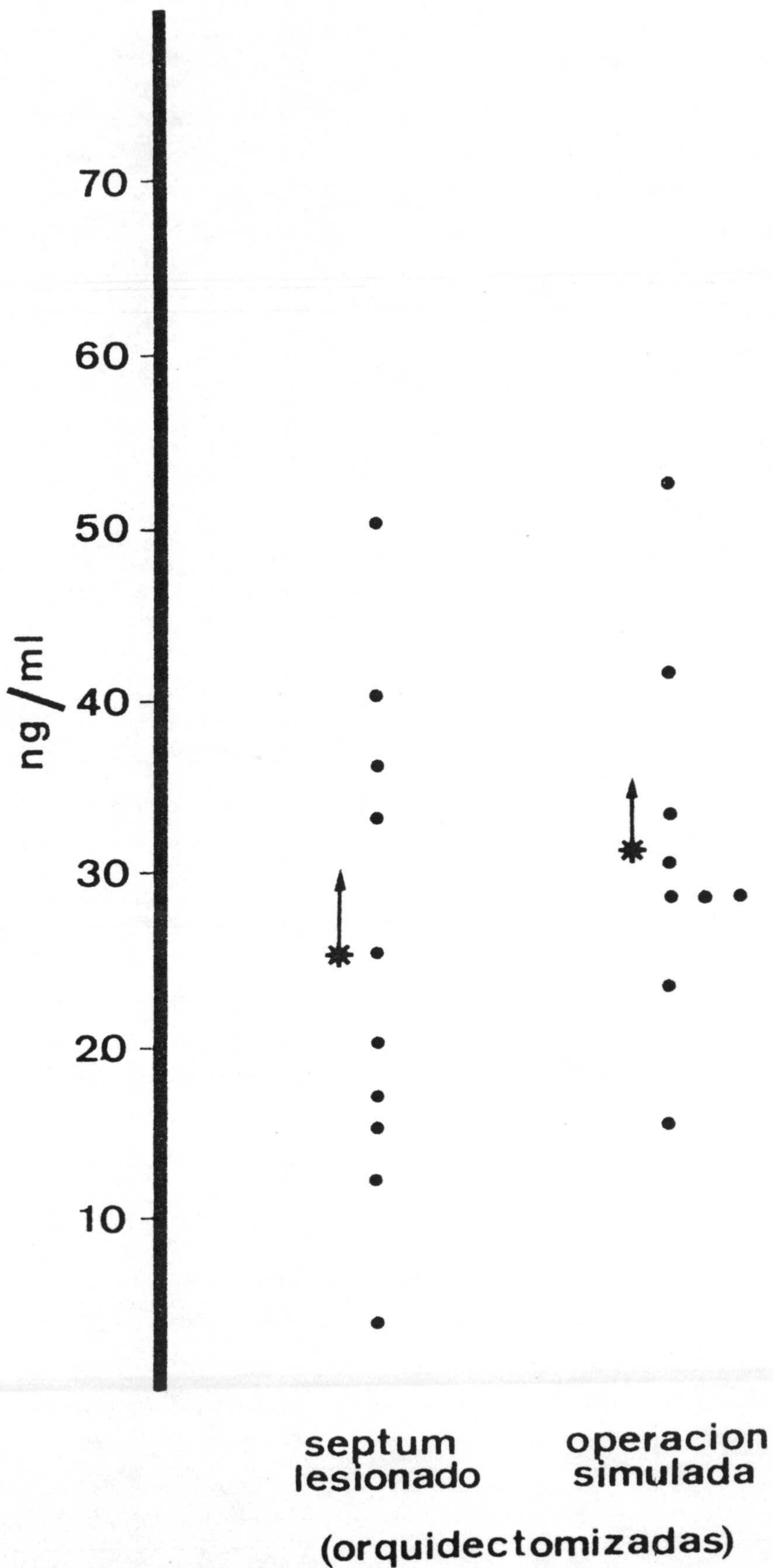
T A B L A G

En la que se muestran los valores de prolactina en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho orquidectomizadas con septum lesionado o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard -- (S.E.M.).

T A B L A G

PROLACTINA	
ORQUIDECTOMIZADAS OPERACION SIMULADA	ORQUIDECTOMIZADAS SEPTUM LESIONADO
40	33
17	41
15	28
36	15
3,7	30
50	28
20	23
12	28
25	52
33	
n = 10	n = 9
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 25,1 \pm 4,5$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 30,8 \pm 3,5$

PROLACTINA



(Fig. 14)

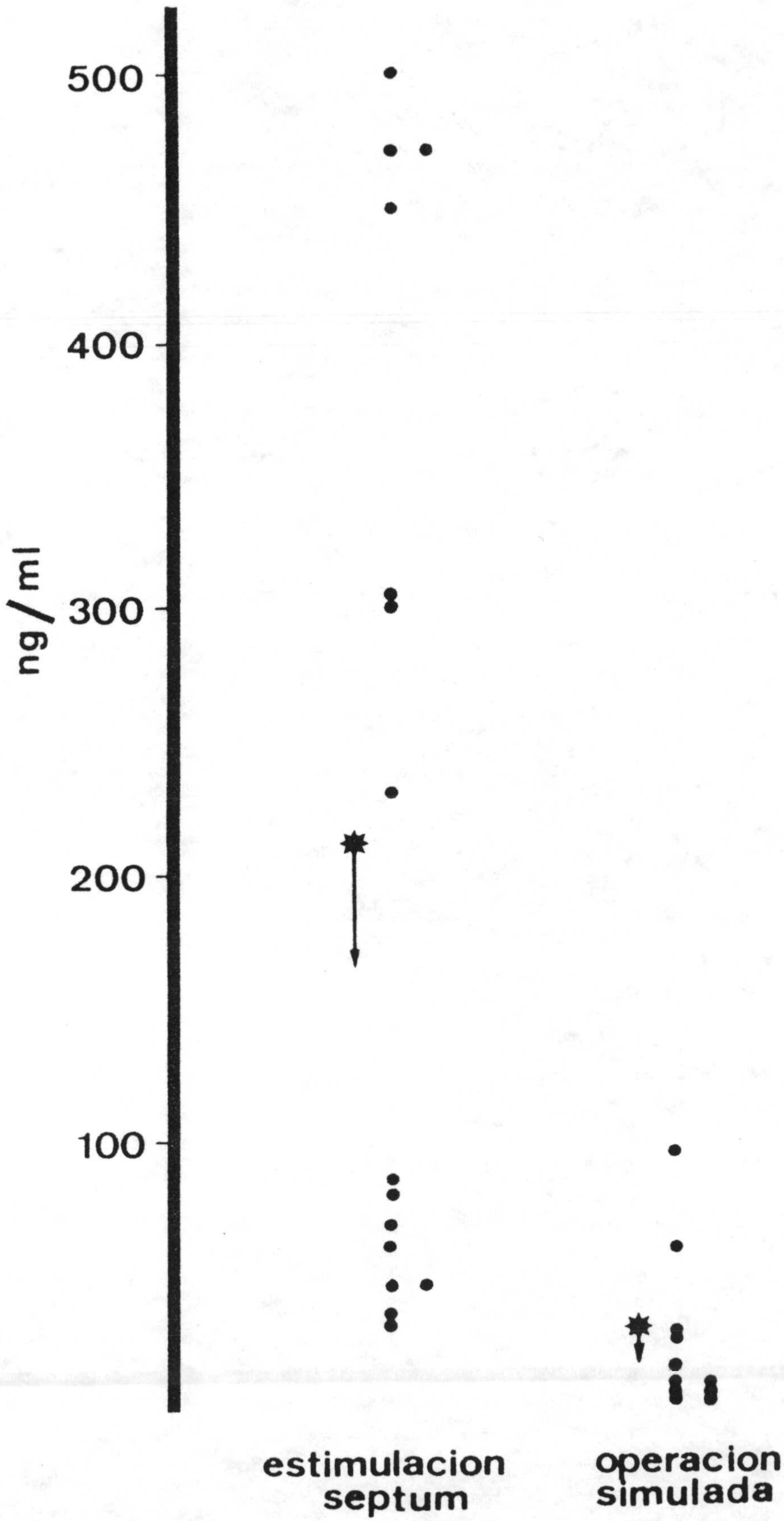
T A B L A H

En esta tabla se muestran los valores de LH en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho con estimulación de septum o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.)

T A B L A H

LH	
OPERACION SIMULADA	ESTIMULACION SEPTUM
27	230
8	300
14,5	470
3,5	450
5	85
8,5	470
60	60
95	67,5
1,5	45
1,5	80
25	45
	305
	34
	31
	500
n = 11	n = 15
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 29,6 \pm 11,5$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 211,5 \pm 46,4^*$

* $p < 0,01$



(Fig. 15)

T A B L A I

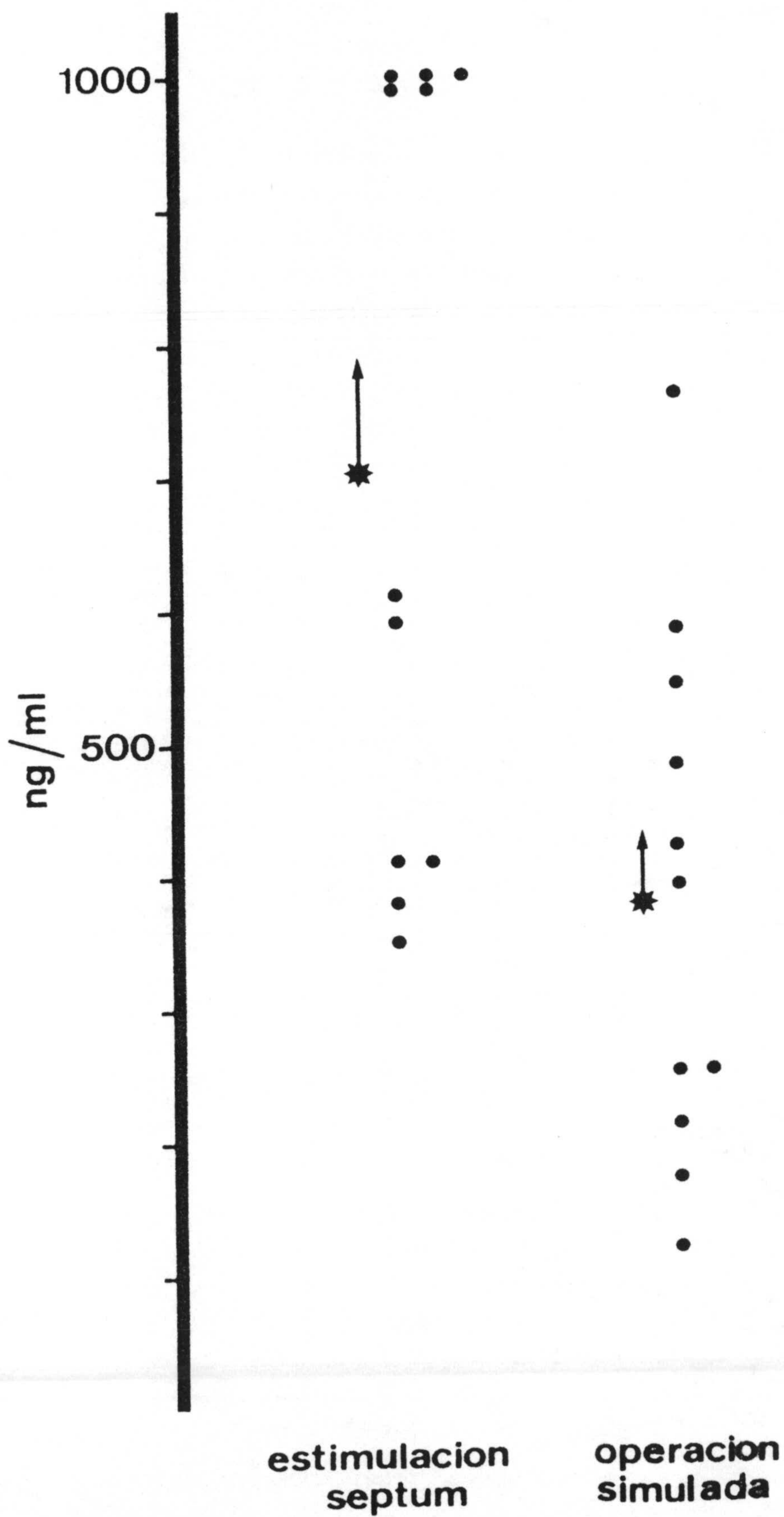
En esta tabla se muestran los valores de FSH en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho con estimulación de septum o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E.M.)

T A B L A I

FSH	
OPERACION SIMULADA	ESTIMULACION SEPTUM
580	990
760	1000
250	350
115	410
170	410
420	590
390	1000
250	990
480	1000
540	380
210	620
n = 11 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$ 378,6 \pm 57	n = 11 $\bar{x} \pm \text{S.E.M.} =$ 703,6 \pm 83,7*

* p < 0,01

FSH



(Fig. 16)

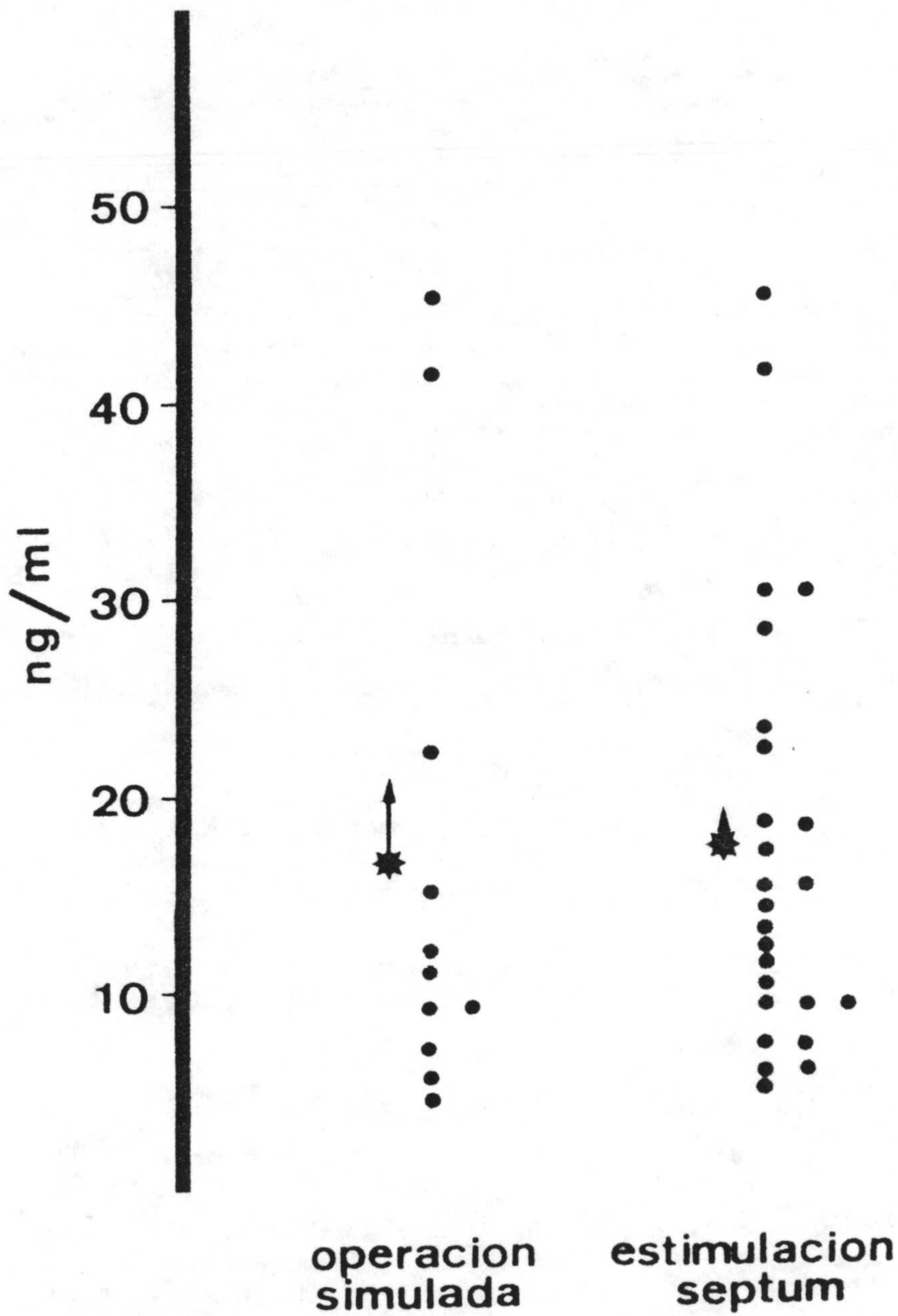
T A B L A J

En esta tabla se muestran los valores de prolactina en suero, expresados en ng/ml., en ratas macho con estimulación de septum o con operación simulada, con los valores medios (\bar{x}) y el error standard (S.E. M.).

T A B L A J

PROLACTINA	
OPERACION SIMULADA	ESTIMULACION SEPTUM
4,5	28
12	30
7	18
9	9
41	15
22	13
45	9
15	14
9	6
11	23
5,8	41
	45
	30
	20
	18
	22
	17
	12
	15
	10
	7
	6
	9
	11
	20
	5
	7
n = 11	n = 27
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 16,4 \pm 4,1$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 17 \pm 2$

PROLACTINA



n. s.

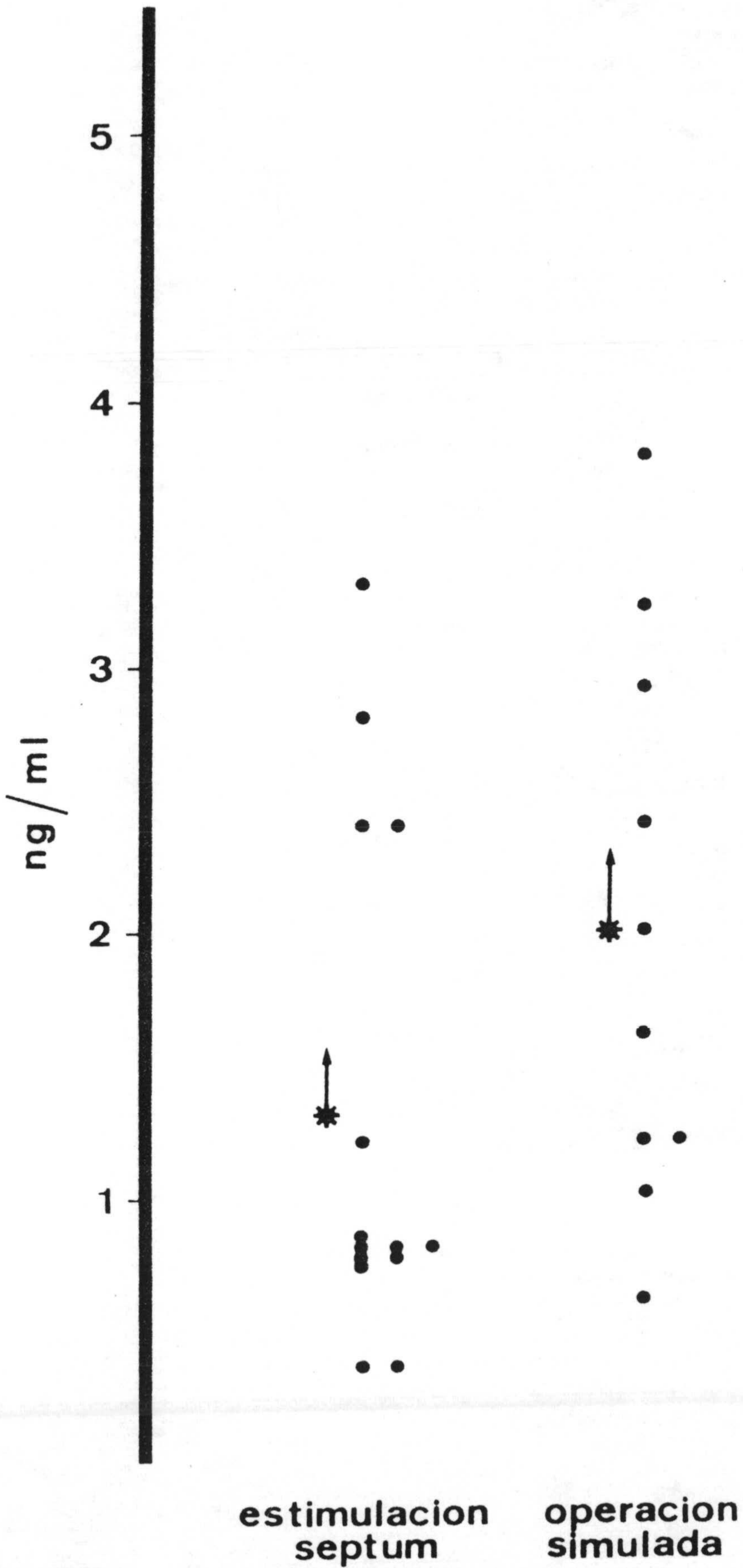
(Fig. 17)

T A B L A K

En esta tabla se muestran los valores de testosterona en suero, expresados en ng/ml. en ratas macho - con estimulación de septum o con operación simulada, con los valores medios (\bar{X}) y el error standard (S.E.M.).

T A B L A K

TESTOSTERONA	
OPERACION SIMULADA	ESTIMULACION SEPTUM
1,2	0,36
1,6	0,76
1	1,2
1,2	3,3
3,8	2,8
2	2,4
3,2	0,8
2,4	0,8
2,9	0,76
0,6	0,8
	0,36
	2,4
	0,84
	0,72
n = 10	n = 14
$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 1,99 \pm 0,31$	$\bar{x} \pm \text{S.E.M.} = 1,3 \pm 0,24$



n. s.

(Fig. 18)

DISCUSSION

Numerosos experimentos han demostrado que el eje hipotalamo-hipofisis forma la unidad básica responsable de la regulación de la función gonadal. El hipotalamo regula la producción y secreción de gonadotropinas de la hipófisis. Sin embargo, se han aportado un gran número de evidencias que apoyan el concepto de que hay áreas extrahipotálamicas que ejercen una influencia reguladora sobre el eje hipotalamo-hipófisis a través de sus conexiones con el hipotalamo (Kawakami y Col., 1.973; Konda, 1975; Rabi, 1.981).

Se han hecho muchos estudios de la influencia del sistema limbico sobre la función gonadotrófica de la hipófisis (Teresawa y Kawakami, 1.973; Konda, 1.975; Velasco y Taleisnik, 1.969), la mayoría de ellos sobre hembras, existiendo poca información sobre la problemas de --

los mecanismos de control de las gonadotropinas en el cerebro del macho, debido probablemente a la falta de efectos fácilmente reconocibles relacionados con cambios en la secreción de gonadotropinas en el macho.

El septum pellucidum ocupa una posición neuroanatómica importante en virtud de sus conexiones con el hipocampo (Segal y Landis, 1.974), el hipotalamo (Nauta, 1.958) y la amígdala (Bar Sella y Critchlow, 1.966). El septum puede también servir como área integradora de los impulsos del hipocampo, amígdala e hipotalamo que influyen en el control normal de la función neuroendocrina.

El resultado de nuestros experimentos indica que tras la lesión electrolítica del septum en ratas macho se produce una disminución significativa ($P < 0,001$) de los niveles de LH en suero siendo estos valores de $30,27 \pm 2,08$ - ng/ml ($\bar{x} \pm$ SEM), en los animales controles a los

que se les ha practicado la operación simulada, y de $16,37 \pm 2,01$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en las ratas con el septum lesionado (Fig. 8). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Teresawa y Kawakami en 1.973, tras la extirpación mecánica del septum y por Bekhtereva, en 1.974, tras la lesión electrolítica del septum y la porción dorsal del hipocampo, ambos en ratas hembras. Aunque estos autores describieron también una disminución de los niveles de FSH en suero en hembras, que no hemos encontrado en machos cuatro días después de la lesión. Siendo estos valores de FSH de $351,5 \pm 43$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en los animales controles a los que se les ha practicado la operación simulada y de 404 ± 18 ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en las ratas con el septum lesionado (Fig. 9).

Por el contrario, Nance y Col., en 1.974, encontraron que la lesión del septum no afectaba el patron de liberación de gonadotropinas ni en el macho ni en la hembra aunque sí afectaba al comportamiento sexual y que por lo tanto la liberación de LH y el comportamiento se

xual son procesos de regulación independiente (Harlan y Gorski, 1.977).

En nuestros resultados se observa una disminución significativa ($P < 0,02$) - en los niveles de testosterona de los animales con septum lesionado ($0,535 \pm 0,057$ ng/ml. -- $(\bar{x} \pm \text{SEM})$) en relación con los animales controles a los que se les ha practicado la operación simulada, ($1,01 \pm 0,146$ ng/ml. $(\bar{x} \pm \text{SEM})$) (Fig. 11)). Estos resultados indican que la bajada de los niveles de LH en suero en las ratas con el septum lesionado no es debido a una acción de retroalimentación negativa de la testosterona (Sherins y Loriaux, 1.973; Sewart-Bentley y Col., 1.974) sino que se debe a un efecto directo de la destrucción del septum.

Esta bajada en los niveles de testosterona que se observa en los animales con el septum destruido puede ser producida por el descenso de los niveles de LH (que como se sabe es el principal estímulo para la producción de tes

tosterona en las células de Leydig).

El papel que el septum puede ejercer en el control de la secreción de gonadotropinas es desconocido y conflictivo, se ha visto que la amígdala envía fibras eferentes al área del núcleo olfatorio, tracto de la banda diagonal de Brocca, tuberculo olfatorio y núcleo septal por medio de la vía amígdalofugal ventral - (Nauta, 1.961; Koikegami, 1.963).

La estimulación de la amígdala induce la ovulación y aumenta los niveles de LH - en suero (Bunn y Evett, 1.957; Everett, 1.964 Velasco y Taleisnik, 1.969; Kawakami y Col., - 1.970) y eleva la actividad eléctrica en el septum medial así como en el núcleo arcuato, sugiriendo un camino neural común (Halasz y Pupp, - 1.965; Halasz y Gorski, 1.967; Tejasen y Everett 1.967; Sawyer, 1.972).

Estos datos podría sugerir que la

influencia producida por la destrucción del septum sobre la secreción de hormonas hipofisarias fuese debida a la interrupción de neuronas o interneuronas que pasan a través del septum en ruta hacia el hipotalamo y que son necesarias para la secreción de LH (Clough y Rodrigues-Sierra, - 1.981).

La secreción de gonadotropinas de la hipófisis está controlada por la acción de retroalimentación de los esteroides gonadales sobre la propia hipófisis (Docke y Dorner, 1.965; Pirlsek y Meites, 1.966; Weick y Davidson, 1.970; -- Arimura y Schally, 1.971) y sobre el hipotalamo (Palka y Col., 1.966; Motta y Col., 1.968) aunque también se ha indicado la implicación de estructuras extrahipotálamicas. En hembras la sección del techo del área preóptica medial impide el aumento de los niveles de gonadotropinas en suero, que se produce tras la inyección de estradiol, indicando que hay estructuras superiores a este área que son indispensables para la acción de retroalimentación positiva del estradiol (Kawakami y Col., -

1.978; Kawakami y Teresawa, 1.972).

Tras la inyección de $17 - \beta$ -estradiol, se observa un aumento importante de la actividad eléctrica en el septum lateral, y los estrógenos marcados se unen selectivamente a las células del septum (Pfaff, 1.968). Mientras que la implantación de estradiol en el septum lateral induce un aumento de LH en suero, siendo el septum junto con los núcleos basales de la stria terminalis los que juegan el papel principal como lugares de acción del estradiol para la manifestación del efecto de retroalimentación estimuladora sobre LH (Kawakami y Col., 1.978).

Tras la inyección de testosterona tritiada en ratas macho castradas, se encuentra una gran densidad de células unidas a la hormona marcada en el septum, aunque una parte significativa de esta testosterona ha sido transformada en estradiol u otro metabolito por conversión periférica (McEwen, 1.976; Lie-

berbug y McEwen, 1.975).

Se han encontrado receptores para estradiol en toda el área septal, estos receptores se encuentran en la membrana celular de las neuronas. Por autorradiografía se ha observado que no hay captación de estradiol en el núcleo de la célula, al contrario de otras zonas donde existen receptores nucleares de estradiol (Jennes y Col., 1.982).

Estos datos sugieren que en hembras la influencia de la lesión del septum sobre los niveles de gonadotropinas en suero podría ser debida a la destrucción de neuronas propias del septum que comunican con el hipotálamo y que estarían directamente envueltas en la retroalimentación del estradiol sobre las células del septum (Clough y Rodrigues-Sierra, 1.981).

En ratas orquidectomizadas la lesión electrolítica del septum no afecta a la e-

levación de los niveles de LH y FSH en suero que se produce tras la castración. Los valores de LH obtenidos son de $111,8 \pm 12,3$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) - en animales con operación simulada, y de $108,8 \pm 9,2$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en ratas con el septum destruido (Fig. 12). Los valores de FSH son de 1.056 ± 57 ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en el grupo con operación simulada y de 1.057 ± 88 ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en de septum lesionado (Fig. 13).

La testosterona puede ejercer un efecto de retroalimentación positiva a nivel del hipotálamo o de la propia hipófisis en ratas macho (Debeljuk y Col., 1.974; Kalra y Col., 1.973) pero no hay datos sobre un posible efecto de retroalimentación positiva de la testosterona a nivel del sistema límbico similar al encontrado en hembras con el estradiol (Kawakami y Col., 1.978), por lo que no podemos comparar el funcionamiento del septum en ambos sexos respecto a su papel de centro integrador de los estímulos de retroalimentación positiva del estradiol que se produce en la hembra durante la ovulación espontánea. Es posible

que la subida de gonadotropinas producida como consecuencia de la orquidectomía sea tan alta que no pueda ser regulada por la presencia o ausencia de un septum funcional ya que la falta de una retroalimentación negativa, debida a la ausencia de testosterona, sobre las gonadotropinas a otros niveles (hipotalamo, hipófisis) dispararía la subida de LH y FSH escapando al control que sobre ellas pudiera ejercer el septum.

La estimulación eléctrica del septum en ratas macho produce un aumento significativo - ($p < 0,01$) en los niveles de LH en suero que varía de $29,6 \pm 11,5$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en las ratas controles con estimulación simulada a $211,5 \pm 46,4$ - ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en los animales con estimulación del septum (Fig. 15). También se produce un amento, aunque menor, de FSH en suero ($p < 0,01$) siendo los valores de $378,6 \pm 57$ ng/ml ($\bar{X} \pm$ SEM) para las ratas con estimulación simulada y de $703,6 \pm 83,7$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) para las ratas con el septum estimulado (Fig. 16).

Aunque en la bibliografía no hemos encontrado referencias respecto a los efectos de estimulación del septum sobre los niveles de gonadotropinas en ratas macho, los resultados obtenidos en nuestros experimentos son comparables a los observados en hembras por otros autores. La estimulación eléctrica o electroquímica del septum induce la ovulación en ratas hembras normales (Everett y Col., 1.962; Teresawa y Sawyer, 1.969; Kawakami y Col., 1.970) y en ratas con la ovulación espontánea bloqueada con anestesia de pentobarbital (Gorski y Barraclough, 1.963; Everett, 1.964) y produce un aumento gradual y prolongado de LH y otro más retardado de FSH sugiriendo que el complejo septal participa en la liberación cíclica de gonadotropinas en la hembra (Clemens y Col., 1.971). La estimulación eléctrica del septum eleva además la actividad eléctrica en el núcleo arcuato y área preóptica medial (Kawakami y Col., 1.973), siendo el núcleo arcuato la estructura principal que regula la liberación episódica del GnRH en la circulación portahipofisaria (Barry y Col., 1.975; Zimmerman y Antunes, 1.976).

Tras la estimulación eléctrica del septum no hemos encontrado variación en los niveles de testosterona en suero siendo de $2,26 \pm 0,38$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en ratas control con estimulación simulada, y de $1,99 \pm 0,31$ ng/ml. ($\bar{x} \pm$ SEM) en animales con estimulación del septum. - (Fig.18).

Al estimular el septum encontramos una elevación en los niveles de FSH en suero. Sin embargo tras la lesión electrolítica no hemos hallado variación en estos niveles.

La FSH está controlada por la inhibición producida en las células de Sertoli que mantiene reprimida su secreción (Setchell Y Jacks , 1.974; Baker y Col., 1.976), siendo este efecto superior al que se produce como consecuencia de la destrucción del septum. Al estimular el septum se activan los mecanismos de control positivo que éste ejerce sobre la hipófisis, aumentando la secreción de ambas hormonas.

Diferentes estudios han confirmado la existencia de una gran población de cuerpos de células nerviosas que contienen GnRH en el septum del cerdo de Guinea (Silverman y Krey, 1.978), del hamster (Jennes y Stumpf, 1.980) y de la rata (Jennes y Col., 1.982; Barry, 1.979). En cultivos de células septales se ha encontrado un número muy alto de neuronas que contienen GnRH (11 %) después de catorce días de cultivo "in vitro" (Jirikowski y Col., 1.981).

Según Krey y Silverman, en 1.978, el papel de estas neuronas que proyectan a otras regiones diferentes de la eminencia media no es conocido, pero no son obligatorias para la regulación de la secreción de gonadotropinas, pues la interrupción de estas vías no tiene efecto sobre la liberación de ellas. Estas neuronas podrían actuar sobre la regulación del

comportamiento sexual.

Es posible que el estradiol pueda actuar sobre el septum para estimular la actividad de las células que contienen GnRH y producir de esta forma la liberación de LH de la hipófisis en ratas hembras (Clough y Rodrigues-Sierra, 1.981).

El septum puede influir en la regulación de la secreción de gonadotropinas, o bien a través de neuronas procedentes de otros núcleos que pasan por él en vía hacia el hipotálamo, o mediante neuronas del propio septum productoras de GnRH o bien aumentando la actividad eléctrica de los centros productores de GnRH en el hipotálamo. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos no se contradicen con ninguna de las teorías expuestas.

Se podría concluir que el septum pellucidum funciona como un centro integrador de la información nerviosa endocrina que regula los mecanismos de liberación de gonadotropinas.

En nuestros resultados no hemos observado ninguna variación en los niveles de prolactina en suero entre los animales control a los que se les ha practicado la operación simulada ($43,3 \pm 4,1$ ng/ml.; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) y las ratas con el septum lesionado ($43,8 \pm 3,9$ ng/ml. $\bar{x} \pm \text{SEM}$). (Fig. 10).

Tampoco hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de prolactina en suero tras la orquidectomía entre los animales control con operación simulada ($25,1 \pm 4,5$ ng/ml.; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) y las ratas con el septum lesionado ($30,8 \pm 5,8$ ng/ml.; $\bar{x} \pm \text{SEM}$) (Fig. 14).

Tras la estimulación eléctrica del septum tampoco se observa diferencia en los niveles de prolactina en suero entre el grupo control con estimulación simulada ($16,4 \pm 4,1$ ng/ml. $\bar{x} \pm$ SEM) y el grupo con el septum estimulado (17 ± 2 ng/ml.; $\bar{x} \pm$ SEM) . (Fig. 17).

Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por otros autores también en ratas macho. Brown y Col., 1.974; Seggie y Brown, 1.976 y Brown y Col., 1.977, vieron que tras la lesión del septum no se observaban ninguna variación en los niveles basales de prolactina en suero. Aunque en respuesta al stress las ratas con el septum lesionado mostraban un aumento o disminución de los niveles de prolactina dependiendo del tipo de stress (Seggie y Brown, 1.976; Brown y Col., 1.977). Ante un stress mínimo la lesión del septum atenúa la respuesta de la prolactina (Seggie y Brown, 1.974).

En ratas hembras la ablación del septum tiene un efecto de disminución de los ni-

veles de prolactina en suero, aunque estos niveles aumentaban el día del estrus (Teresawa y Kawakami, 1.973).

La lesión del septum parece pues que produce una alteración de algun mecanismo de respuesta al stress, más que producir una alteración en un mecanismo regulador de la secreción de prolactina (Seggie y Uhlir, 1.979).

CONCLUSIONES

1°.- La lesión electrolítica del septum pellucidum en ratas macho induce una disminución significativa de los niveles de LH y de testosterona en suero sin modificar los niveles de FSH y prolactina.

2°.- La disminución de los niveles de testosterona en suero encontrada tras la lesión electrolítica del septum es probablemente consecuencia de la bajada de los niveles de LH.

3°A.-La lesión electrolítica del septum no afecta a la subida de los niveles de LH y FSH que se produce tras la orquidectomía.

3°B.-La lesión electrolítica del septum no afecta a los niveles de prolactina en suero en ratas orquidectomizadas.

4°.- La estimulación eléctrica del septum pellucidum en ratas macho induce un aumento de los -

niveles de LH y FSH en suero, sin afectar a los de prolactina ni a los de testosterona.

5°.- El septum pellucidum parece ejercer una función de control positivo sobre la liberación de LH y FSH de la hipófisis en ratas macho.

6°.- El septum pellucidum no influye sobre la regulación de los niveles basales de prolactina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABRAHAM G.E., ODELL W.D., SWERDLOFF R.S. Y HOPPER K. (1.972).- Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, Progesterone , 17-hydroxy-progesterone and estradiol-17 during the menstrual cycle. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 34, 312-318.
- 2.- ADU-FADIL S., DEVANE G.W., SILER T.M. Y YEN S.S.C. (1.976).- Effects of oral contraceptive steroids on pituitary prolactin secretion. Contraception 13, 79-85.
- 3.- AHREN K., FUXE K., HAMBERGER L. Y HOKFELT - T. (1.971).- Turnover changes in the tuberoinfundibular dopamine neurons during the ovarian cycle of the rat. Endocrinology 88 , - 1.415-1.423.

- 4.- ALOJ S.M., EDELHOCH H. AND INCHAM K.C. -
(1.973).- The rates of dissociation and
reassociation of the subunits of human -
chorionic gonadotropin. Arch. Biochem. -
Biophys 159, 497-512.
- 5.- ANDERSON L.D. Y HOOVER D.J. (1.981).- In
traovarias control mechanisms, channing C.
P. y Segal S. (Eds). Plenum New York. -
343-387.
- 6.- ARAGONA C. Y FRIESEN H.G. (1.975).- Speci-
fic prolactin binding sites in the prosta
te and testis of rats. Endocrinology 97,
677-686.
- 7.- ARIMURA A. Y SCHALLY AV. (1.971).- Augmen
tation of pituitary responsiveness to LH-
releasing hormone (LH-RH) by estrogen. -
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, 290-300.
- 8.- ARMSTRONG D.T. AND PAPKOFF H. (1.976).-
Stimulation of aromatization of exogenous
and endogenous androgens in ovaries of hi

pophysectomized rats in vivo follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 99, 1.144-1.157.

- 9.- ASHWELL G. AND MORELL A.G. (1.974).- The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv.Enzymol.* 41, 99-109).
- 10.- AUBERT M.L., GRUMBACH S.L. Y ASPLAN S.L.- (1.975).- The ontogenesis of human fetal hormones. *Journal of Clinical Investigation* 56, 155-164.
- 11.- AUBERT M.L., SIZONENKO P.C. Y FAUMER L.- (1.976).- A longitudinal study of prolactin secretion during puberty in girls. *International Congress of Endocrinology.* - Hamburg, 46-50.
- 12.- BAKER B.L., PIERCE J.G. AND CORNEL J.S.- (1.972).- The utility of antiserums to the subunits of TSH and LH for immunochemi

cal staining of the rat hypophysis. *Ann-J-Anat.* 35, 251-254.

13.- BAKER B.L., ESKIN T.A. Y AUBUST L.N. (1.973)
Direct action of synthetic progestins on -
the hypophysis. *Endocrinology* 92, 965-972.

13(bis).- BAKER H.W.G., BREMMER W.J., BURGER H.G.
DEKRETSER D.M., DULMANTIS A., EDDIE L.W., -
HUDSON B., KEOG E.S., LEE V.W.K. Y RENNIE -
G.C.(1.976).- Testicular control of follicle
stimulating hormone secretion. *Rec.Progr. -
Horm.Res* 32, 429-472.

14.- BAKER R.J., SHANI J., AMIT T., BARZILAI D.-
(1.977).- Specific binding of prolactin to
seminal vesicle, prostate and testicular ho-
mogenates of immature, mature and aged rats.
J.Endocr. 74, 163-169.

15.- BARRACLOUGH C.A. (1.981).- In: *Neurosteroidal
regulators in reproductive biology and medi-
cine.* Fujii T. y Channing C.P. (Eds). Per-
gamon Oxford, 254-272.

16.- BARRY J.(1.979).- *Immunohistochemistry of lu*

teinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 60, 179-221.

- 17.- BARRY J., GIROP C. Y DUBOIS M.P. (1.975).- Topography of LRF elaborating neurons in primates. *Bull. Assoc. Anat.* 59, 103-110.
- 18.- BARSELLA M. Y CRITCHLOW V. (1.966).- Delayed puberty following electrical stimulation of the amygdala in female rats. *Am. J. Physiol.* 211, 1.103-1.107.
- 19.- BEKHTEREVA E.P. (1.974).- The effect of destruction of the septum and of the dorsal hippocampus on gonadotropic function of the hypophysis and catecholamine level in hypothalamus of the rat. *Problendokr* 20/6, 48-51.
- 20.- BEN-JONATHAN N., OLIVER C., WEINER H.J., MICAL R.S. Y PORTER J.C. (1.977).- Dopamine in hipofhysial portal plasma of the rat during the estrus cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100, 452-470.
- 21.- BEN-JONATHAN N., NEILL M.A., ARBOGAST L.A., PETERS LL. Y HOEFER M.T. (1.980).- Dopamine

in hypophysial portal blood: Relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rat. *Endocrinology* 106, 690-695.

- 22.- BISHOP W.H., NOREDDIN A. AND RYAN R.J. - (1.976).- Pituitary luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Peptide Hormones*. University Park Press. Baltimore, - 273-281.
- 23.- BOGDANOVE E.M., CAMPBELL G.T., BLAIR E.D., MULA M.E., MILLER A.E. AND GROSSMAN G.H. - (1.974).- Gonad-pituitary feedback involves qualitative change: androgens alter the type of FSH secreted by the rat pituitary. *Endocrinology* 95, 219-227.
- 24.- BOHNET H.G., FRIESEN H.G. (1.976).- Effect of prolactin and growth hormone on prolactin and LH receptors in the dwarf mouse. *J.Reprod. Fert.* 48, 307-313.
- 25.- BOYAR R., FINKELSTEIN J., ROFFWARG H., KAPEN S., WEITZMAN E. AND HELLMAN L. (1.972).

Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with puberty. N.Enol.J. Med 287, 582-593.

- 26.- BOYD A.E., SPENCER E., JACKSON I.M.D. - REICHLIN S. (1.976).- Prolactin-releasing factor (PRF) in porcine hypothalamic extract distinct from TRH. Endocrinology 99, 861-871.
- 27.- BREMMER W.J. AND PAULSEN C.A. (1.974).- Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39, 811-820.
- 28.- BROWN G.M., UHLIR I.V., SEGGIE J., SCHALLY A.V. Y KASTIN A.J. (1.974).- Effect of septal lesions on plasma levels of MSH, corticosterone, GH and prolactin before and after exposure to novel environment: role of MSH in the septal syndrome. Endocrinology 94/2, 583-587.

- 29.- BROWN G.M., SEGGIE J. Y FELDMAN J. (1.977).
Effect of psychosocial stimuli and limbic -
lesions on prolactin at rest and following
stress. Clin.Endocr. 6, 295-415.
- 30.- BUNN J.P. Y EVERETT J.W. (1.957).- Ovulation
in persistent-estrous rats after electrical
stimulation of the brain. Proc.Soc.Exp.Biol.
and Med. 961 , 369-371.
- 31.- BURGUS R. AND GUILLEMIN R. (1.970).- Hypotha
lamic releasing factors. Ann.Rev.Biochem. 39
499-526.
- 32.- CATT K.J., DUFAU M.S. AND TSURUHARA T. (1.972)
Radioligand-receptor assay of luteinizing hor
mone and chorionic gonadotropin. J.Clin.Endo-
crinol. Metab. 34, 123-127.
- 33.- CATT K.J. AND DUFAU M.L. (1.973).- Spare gona
dotropin receptors in rat testis. Nature (New
Biol) 244, 219-228.

- 34.- CATT K.J., DUFAU M.L. AND TSURUHARA T. -
(1.973).- Absence of intrinsic biological
activity in LH and HCG subunits. J.Clin.
Endocrinol.Metab. 36, 73-81.
- 35.- CATT K.J. AND DUFAU M.L. (1.976).- Basic -
concepts of the mechanism of action of pep
tile hormones. Biol. Reprod. 14, 1-6.
- 36.- CHANNING C.P. AND KAMMERMAN S. (1.974).-
Binding of gonadotropin to ovarian cells.
Biol. Reprod. 10, 179-185.
- 37.- CHANNING C.P. AND LEOWITZ-RIGBY F. (1.975)
Methods for assessing hormone-mediated -
differentiation of ovarian cells in cultu
re and in short-term incubations. Methods
Enzymol. 39, 183-192.
- 38.- CHANNING C.P. Y TSAFRIRI A. (1.977).- Me-
chanism of action of luteinizing hormone -
and follicle-stimulating hormone on the o-
vary in vitro. Metabolism. 26, 413-468.

- 39.- CHARREAU E.H., ATTRAMADAL A., TORTESEN P.A.,
PURVIS K., CALANDRA R., HANSSON V. (1.977).-
Prolactin binding in rat testis: specific re-
ceptors in interstitial cells. Mol. Cell. En-
docrinol. 6, 303-309.
- 40.- CHEN C.L., MINAGUCHI H. Y MEITES J. (1.967).
Effects of transplanted pituitary tumors on
host pituitary prolactin secretion. 32435 -
Proceedings of the society for Experimental
Biology and Medicine 126, 317-320.
- 41.- CHEN H.C., HODGEN G.D., MATSUURA S., LIN L.J.,
GROSS E., REICHERT Jr. L.E., BIRKEN S., CAN-
FIELD R.E. AND ROSS G.T. (1.976).- Evidence -
for a gonadotropin from nonpregnante subjects
that mas physical, immunological and biologi-
cal similarities to human chorionic gonadotro-
pin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2.885 -
2.896).
- 42.- CHRONISTER R.B., SIKES R.W. AND WHITE L.E. Jr.
(1.976).- The septo-hippocampal system: signi-
ficance of the subiculum. In: The Septal Nuclei

(J.F. De France Ed.), 115-132. Plenum Press.
New York.

- 43.- CLEMENS J.A. Y MEITES J. (1.968).- Inhibition by hypothalamic prolactin implants of prolactin secretion, mammary growth and luteal function. *Endocrinology* 82, 878-881.
- 44.- CLEMENS J.A., SHAAR C.J., KLEBER J.W. Y TANDY W.A. (1.971).- Areas of the brain stimulatory to LH and FSH secretion. *Endocrinology* 88, - 180-184.
- 45.- CLOUGH R.W. Y RODRIGUEZ-SIERRA J.F. (1.981).- Intrinsic neurons of the septal area arc involved in reproductive development of the female rat. *Neuroendocrinology* 33, 363-371.
- 46.- COCHRAN W.G. (1.967).- Comparison the two samples. In: "Statistical Methods". The Iowa States University Press, 153-157.
- 47.- COLE E.N., GOLDBERGER M.P. Y GRIFFITHS K. (1.976) Prolactin in human breast tumours. *J.Endocr.* 69, 49-57.

- 48.- COOKE B.A., JANSZEN F.H.A., CLOTSCHER W.F.,
AND VAN DER MOLEN H.J. (1.975).- Effect of
protein-synthesis inhibitors on testosterone
production in rat testis interstitial.
Biochem. J. 154, 212-217.
- 49.- COOKE B.A., LINDH M.L. AND JANSZEN F.H.A. -
(1.976).- Correlation of protein kinase ac-
tivation and testosterone production after
stimulation of leydig cells with luteinizing
hormone. Biochem. J. 160, 439-444.
- 50.- CORBIN A. AND STORY J.C. (1.967).- "Internal"
feedback mechanism: response of pituitary FSH
and of stalk-median eminence follicle stimu-
lating hormone-releasing factor to median -
eminence implants of FSH. Endocrinology 80 ,
1.006-1.012.
- 51.- COWAN W.M., RAISMAN G. Y POWELL T.P. (1.965).
The connexions of the amygdala. J.Neurol. Neu-
rosurg. Psychiat. 28, 137-151.
- 52.- COWIE A.T. Y FORSYTH I.A. (1.975).- Biology -
of prolactin. Pharmacol. Therap 1 , 437-446.

- 53.- CRAGG B.G. (1.965).- Afferent connexions of the allocortex. J. Anat. Lond. 99, 339-357.
- 54.- CRAGG B.G. AND HAMLYN L.H. (1.959).- Histo-logic connections and electrical and autonomic responses evoked by stimulation of the dorsal fornix in the rabbit. Exp. Neurol. 1 187-213.
- 55.- CRICHTON D.B., SCHNEIDER H.P.G. AND McCANN S.M. (1.970).- Localization of LH-releasing factor in the hypothalamus and neurohypophysis as determined by in vitro assay. Endocrinology 87, 323-329.
- 56.- CRONIN M., ROBERTS J.M., WEINER R.I. (1.978) Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. Endocrinology 103, - 302-308.
- 57.- CULBERSON J.L. AND BACH L.M.N. (1.973).- Limbic projections to the ventromedial hypotha-

lamus of the opossum. Exp. Neurol. 41 , -
683-689.

- 58.- DAANE T.A. AND PARLOW A.F. (1.971).- Serum FSH and LH in constant light induced persistent estrus: short-term and long-term studies. Endocrinology 88, 964-968.
- 59.- DAITZ H.M. Y POWELL T.P.S. (1.954).- Studies of the connections of the fornix system. J.Neurol. Neurosurg. and Psychiat. 17 75-82.
- 60.- DANNIES P.S. Y TASHJIAN A.H. (1.976).- Release and synthesis of prolactin by rat pituitary cell strains are regulated independently by thyrotropin-releasing hormone. - Nature 261, 707-710.
- 61.- DAVID M.A., FRASCHINI F. AND MARTINI L. -- (1.966).- Control of LH secretion: role of a "short" feedback mechanism. Endocrinology 78, 55-60.

- 62.- DAVIDSON J.M., DAMASSA D.A., SMITH E.R. Y
CHEUNG C. (1.976).- Feedback control of -
gonadotrophin secretion in the rat. Regu-
latory mechanism of male reproductive phi-
siology (Ed) Spilman C.H. Etal., 151-168,
Amsterdam: Excerpta Medica.
- 63.- DEBELJUK L., VILCHEZ-MARTINEZ J.A., ARIMU
RA A. Y SCHALLY A.V. (1.974).- Effect of
gonadal steroids on the response to LH-RH
in intact and castrated male rats. Endo-
crinology 94, 1.519-1.524.
- 64.- DE FRANCE J.F., KITAI S.T. AND SHIMONO T.
(1.973).- Electrophysiological analysis -
of the hippocampal-septal projections I
response and topographical characteristics.
Exp. Brain Res. 17, 447-462.
- 65.- DeVITO J.L. AND WHITE L.E. Jr. (1.966).-
Projections from the fornix to the hippo-
campal formation in the squirrel monkey.
J.Comp. Neurol. 127, 389-398.

- 66.- DHARIWAL A.P.S., NALLAR R., BATT M. AND -
McCANN S.M. (1.965).- Separation of folli-
cle-stimulating hormone-releasing factor -
from luteinizing hormone-releasing factor.
Endocrinology 76, 290-294.
- 67.- DOCKE F. Y DORNER G. (1.965).- The mecha-
nism of the induction of ovulation by oes-
trogens. J.Endocrinol. 33, 491-502.
- 68.- DORRINGTON J.H. AND ARMSTRONG D.T. (1.975)
Follicle stimulating hormone stimulates es-
tradiol-17 β synthesis in cultured Sertoli
cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 --
2.677-2.683.
- 69.- DOUGLAS W.W. AND POISNER A.M. (1.964).- The
role of calcium in the release of vasopre-
sin from the neurohipophysis. J.Physiol. -
London, 172, 1-18.
- 70.- DUFAU M.L., CATT K.J. AND TSURUHARA T. --
(1.971).- Retention of in vitro biological
activities by desialylated human luteini-

zing hormone and chorionic gonadotropin.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 44, 1.022-
1.028.

- 71.- DUFAU M.L. AND CATT K.J. (1.976).- Gona-
dal receptors for LH and HCG. In: Feers.
Tr. E. F. and E.G. Basset (Eds.) Cell mem-
brane receptors for viruses antigens and
antibodies, polypeptide hormones and small
molecules. Ravens. Press. New York, 1.976
135-141.
- 72.- DUFAU M.L., TSURUHARA T., HORNER K., PO-
DESTA E. AND CATT K.J. (1.977).- Evidence
for the intermediate action of cyclic AMP
and protein kinase in the steroidogenic -
action of gonadotropin in isolated leydig
cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 --
3.419-3.426.
- 73.- EDMONDS M., MOLITCH M., PIERCE J.G. AND -
ODELL W.D. (1.975).- Secretion of alpha -
subunits of luteinizing hormone (LH) by -
the anterior pituitary. J.Clin. Endocri-
nol. Metab. 41, 551-562.

- 74.- EHARA Y., SILER T., VANDEN BERG G., SINHA Y.N. Y YEN S.S.C. (1.973).- Circulating - prolactin levels during the menstrual cycle: episodic release an diurnal variation. Am. J. Obstet. Gynecol. 117, 962-973.
- 75.- EHARA Y., YEN S.S.C. Y SILER T.M. (1.975). Serum prolactin levels during puberty. Am. J. Obstet. Gynecol. 121, 995-1.002.
- 76.- EHARA Y., SILER T.M. Y YEN S.S.C. (1.976). Effects of large doses of estrogen on prolactin and growth hormone release. Am. J. Obstet. Gynecol. 125, 455-461.
- 77.- ELLIS S. (1.961).- Observations on stability of sheep pituitary LH and FSH. In: Human Pituitary Gonadotropins. Edited by A. Albert. Springfield ILL: Thomas. 378-386.
- 78.- ERDHEIM J. Y STUME E. (1.909).- Uber die - schwangerschaftsueran-derung der hypofpyse. Beitrage zua Pathologischen Anatomie, 46 1-32.

- 79.- ERICKSON G.R. AND RYAN K.J. (1.976).- Stimulation of testosterone production in isolated - rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP.PGE₂ and PGE₂ . Endocrinology 99, 452-471.
- 80.- EVANS H.M., SIMPSON M.E. AND PENCHARZ R.I. - (1.937).- An anterior pituitary gonadotropic fraction (ICSH) specifically stimulating the interstitial tissue of testis and ovary. -- Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol. 5 , 229-240.
- 81.- EVANS G.A., ROSENFELD M.G. (1.976).- Cell-free synthesis of a prolactin precursor directed by mRNA from cultured rat pituitary cells. J. Biol. Chem. 251, 2.842-2.847.
- 82.- EVERETT J.W. (1.964).- Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. Physiological Review 44, 373 - 431.
- 83.- EVERETT J.W. Y SAWYER C.H. (1.949).- A neu-

ral timing factor in the mechanism by which progesterone advances ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology* 45, 581-595.

- 84.- FALCK B. (1.965).- Site of production of oestrogen in mouse ovary as studied in microtransplants. *Acta. Physiol. Scand.* 47, Suppl. 163, 94-103.
- 85.- FARQUHAR M.G., SKUTELSKY E.H. Y HOPKINS C.R. (1.975).- Structure and function of the anterior pituitary and dispersed pituitary cells. In: Tixia-Vidal A. y M.G. Farquhar (Eds.): *Ultrastructure in Biological Systems Vol. 7. The anterior pituitary.* Academic Press New York, 83-92.
- 86.- FAWCETT C.P. AND McCANN S.M. (1.971).- Purification and properties of a gonadotropin releasing factor. *Proc. Intern. Union Physiol. Sci.* 8, 172-185.
- 87.- FEVOLD H.L., HISAW F.L. AND LEONARD S.L. -

- (1.931).- The gonad stimulating and luteinizing hormones of the anterior lobe of the hypophysis. *Am.J.Physiol* 97, 291-301.
- 88.- FORSYTH I.A. Y MYRES R.P. (1.971).- Human prolactin: evidence obtained by the bioassay of human plasma. *J.Endocr.* 51, 157-168.
- 89.- FORSYTH I.A., BESSER G.M., EDWARDS C.R.W., - FRANCIS L. Y MYRES R.P. (1.971).- Plasma prolactin activity in inappropriate lactation. *British Medical Journal* III, 225-227.
- 90.- FRANTZ A.G. (1.976).- Prolactin growth hormone and human placental lactogen. In: Parson J.A. (Ed) *Peptide Hormones*. University Park Press Baltimore, 199-232.
- 91.- FRANTZ A.G. Y KLEINBERG D.L. (1.970).- Prolactin evidence that it is separate from growth hormone in human blood. *Science* 170, 745-747.

- 92.- FRANTZ A.G., KLEINBERG D.L. Y NOEL G.L.
(1.972).- Studies on prolactin in man. -
Rec.Prog.Horm.Res, 28, 527-536.
- 93.- FRIESEN H., GUYDA H. Y HARDY J. (1.970).
Biosynthesis of human growth hormone and
prolactin. J.Clin.Endocrinol.Metab. 31 ,
611-620.
- 94.- FRIESEN H., GUYDA G., HWANG P, TYSON J.E.
BARBEAU A.J. (1.972).- Functional evaluat
tion of prolactin secretion: A guide to
therapy. J.Clin.Invest. 51, 706-709.
- 95.- FRITZ I.B. (1.973).- Selected topics on -
the biochemistry of spermatogenesis. Curr.
Top.Cell.Regul. 7, 129-133.
- 96.- GAUTVIK K.M. Y KRIZ M. (1.976).- Effects
of prostaglandis on prolactin and growth
hormone synthesis and secretion in cultur
ed rat pituitary cells. Endocrinology .
98, 344-351.

- 97.- GAY V.L., MIDGLEY A.R. AND NISWENDER G.P.
(1.970).- Patterns of gonadotrophin secretion-associated with ovulation. Federation Proc. 29, 1.880-1.887.
- 98.- GAZAREK F., TALAS M., FINGEROVA H. KRIVAL
Z. (1.975).- Prolactin in the blood serum during physiological and pathological gravidity. Cesk. Gynecol. 40, 39-40.
- 99.- GORSKI R.A. Y BARRACLOUGH C.A. (1.963).-
Effect of low dosages of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. Endocrinology 73, 210-216.
- 100.- GRANDISON L., GUIDOTTI A. (1.979).- γ aminobutyric acid receptor function in rat - anterior pituitary: Evidence for control of prolactin release. Endocrinology 105, 754-759.
- 101.- GRAY C.J. (1.967).- Molecular weight of hu

- man follicle-stimulating hormone. *Nature*, -
216, 1.112-1.113.
- 102.- GROSSMAN S.P. (1.976).- Behavioral functions of the septum: a re-analysis. In: *The septal nuclei* (J.F. DeFrance Ed.), 361-422. Plenum Press New York.
- 103.- GUILLERY R.W. (1.957).- Degeneration in the hypothalamic connexions of the albino rat. - *J.Anat.Lond.* 91 (1), 91-115.
- 104.- GUYDA H.J. Y FRIESEN G.H. (1.973).- Serum prolactin levels in humans from birth to adult life. *Pediat. Res.* 7, 534-540.
- 105.- HAGEN C. AND McNEILLY A.S. (1.975).- Changes in circulating levels of LH, FSH, LH β - and α -subunit after gonadotropin-releasing hormone, and FSH LH β - and α -subunit after thyrotropin-releasing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 41, 466-472.

- 106.- HALASZ B. Y PUPP L. (1.965).- Hormone secretion of the anterior pituitary gland after - physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology* 77, 553-556.
- 107.- HALASZ B. Y GORSKI R.A. (1.967).- Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 80, 608-622.
- 108.- HANSSON V., PURVIS K., CALANDRA R., RITZEN M. FRENCH F.S. (1.976).- Hormonal regulation of spermatogenesis. *Vitam.Horm.* 34, 187-197.
- 109.- HARADA Y. (1.976).- Pituitary role in growth of metastasizing MRMT-1 mammary carcinoma in rats. *Cancer Res.* 36, 18-22.
- 110.- HARKMARK W., KOHLER C.H. AND SREBRO B. (1.978) Afferent connections from the hippocampus to the septum telencephali in the rat as studied

by a retrograde transport of horseradish -
peroxidase. Israel J.Med.Sci. 14, 894-895.

111.- HARLAN R. Y GORSKI R. (1.977).- Temporal -
correlations between luteinizing hormone -
(LH) and prolactin (PRL) release and lordo
sis behavior in rats. Fedn. Proc. 36, 313-
319.

112.- HARRINGTON F.E. Y BEX F.J. (1.970).- Ovula
tion in the rat as a result of synergism -
between follicle stimulating hormone and -
luteinizing hormone. Endocrinologica Japoni
ca 17, 387-395.

113.- HAUSLER A., WILDT L., MARSHALL G., PLANT T.M.
BELCHETZ P.E. Y KNOBIL E. (1.979).- Neuroen-
docrine control of gonadotropin secretion. -
Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 38 , -
1.107-1.112.

- 114.- HILLIARD J., SCARAMUZZI R.J., PANG C.N.,
PENARDI R. AND SAWYER C.H. (1.974).- Testosterone secretion by rabbit ovary in -
vitro. Endocrinology 94, 267-272.
- 115.- HOHLWEG W. Y JUNKMANN K. (1.932).- Die -
hormonal-nervose regulierung der funktion
des hypophysen vorderlappens. Klinische -
Wochenschrift 1, 321-323.
- 116.- HOKFELT T. Y FUXE K. (1.972).- Effects of
prolactin and ergot alkaloids on the tubero-
infundibular dopamine (DA) neurons. -
Neuroendocrinology 9, 100-112.
- 117.- IGARISHI M. Y McCANN S.M. (1.964).- A hipoth-
alamic follicle-stimulating hormone-release
sing factor. Endocrinology 74, 446-452.
- 118.- IGARASHI H., YOKOTA N., EHARA Y., MAYUZUMI
R., HIRANO T., MATSUMOTO S. AND YAMASAKY M.
(1.968).- Clinical effects with partially
purified beef hypothalamic FSH-releasing -
factor. Am. J. Obstet. Gynecol. 100, 867-

870.

- 119.- JAFFE R.B., YUEN B.H., KEYE W.R. Jr. Y MID
GLE Y A.R. Jr. (1.973).- Physiologic and pa
thologic profiles of circulating human pro
lactin. Am. J. Obstet. Gynecol. 117, 757-
763.
- 120.- JENNES L. Y STUMPF W.E. (1.980).- LHRH-sys
tems in the brain of golden hamster. Cell.
Tissue. Res. 209, 239-256.
- 121.- JENNES L., BECKMAN W.C., STUMPF W.E. Y -
GRZANNA R. (1.982).- Anatomical relation-
ships of serotoniner_gic and noradrenalin_{er}
gic projections with the GnRH-system in -
septum and hypothalamus. Exp. Brain. Res.
46, 331-338.
- 122.- JIRIKOWSKI G., REISERT I. Y PILGRIM C.H.
(1.981).- Neuropeptides in dissociated --
cultures of hypothalamus and septum: quan
titation of immunoreactive neurons. Neuro
science, 6/10, 1.953-1.960.

- 123.- JUTISZ M. (1.970).- Purification and chemistry of gonadotropin releasing factors
In: The human testis, Edited by E. Rosenberg and C.A. Paulsen. New York: Plenum.
207-228.
- 123 (bis).-JUTISZ M. AND TERTRIN-CLARY C. --
(1.974).- Luteinizing hormone and chorionic gonadotropin structure and activity.
Curr. Top. Exp. Endocrinol. 2, 195-203.
- 124.- KALRA S.P., AJIKA K., KRULICH L., FAWCETT C.P., QUIJADA M. AND McCANN S.M. (1.971).
Effects of hypothalamic and preoptic electrochemical stimulation on gonadotropin -
and prolactin release in proestrous rats.
Endocrinology 88, 1.150-1.158.
- 125.- KALRA P.S., KRULICH L., QUIJADA M. KALRA S.P., FAWCETT C.P. AND McCANN S.M. (1.971)
Feedback effects of gonadal steroids on gonadotropins and prolactin in the rat. -
In: Hormonal steroids. Edited by V.H.T. -

James and L.Martini. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, 708-715.

- 126.- KALRA P.S., FAWCETT C.P. KRULICH L. Y McCANN S.M. (1.973).- The effect of gonadal steroids on plasma gonadotropins and prolactin in the rat. *Endocrinology* 92, 1.256-1.268.
- 127.- KASTIN A.J., SCHALLY A.V., GUAL C., MIDGLEY A.R., BOWERS C.Y. Y DIAZ INFANTE. (1.969).- Stimulation of LH release in men and women by LH-releasing hormone purified from porcine hypothalami. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29, 1.046-1.050.
- 128.- KASTIN A.J., SCHALLY A.V., GUAL C., MIDGLEY A.R., ARIMURA A., MILLER M.C. Y CABEZA A. (1.971).- Administration of LH-releasing hormone of human origin to man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 32, 287-289.

- 129.- KATO Y., NAKAI Y., IMURA H., CHIHARA K. y OHGO S. (1.974).- Effect of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) on plasma prolactin levels in man. J.Clin. Endocrinol. Metab. 38 , 695-703.
- 130.- KAWAGUCHI K. (1.975).- Human growth hormone and prolactin during pregnancy. Folia Endocrinol. JPN. 51, 548-555.
- 131.- KAWAKAMI M., TERESAWA E. E IBUKI T. (1.970). Changes in multiple unit activity of the - brain during the estrous cycle. Neuroendocrinology 6, 30-48.
- 132.- KAWAKAMI M. Y TERESAWA E. (1.972).- Acute - effect of neural deafferentation on timing of gonadotropin secretion before proestrus in the female rat. Endocrinol. JPN. 19 , - 449-456.
- 133.- KAWAKAMI M., KIMURA F. Y HIGUCHI T. (1.973). Effects on electrical stimulation of the - brain on gonadotropin secretion in male -

rats. Endocrinol. Japon 20/5, 447-454.

134.- KAWAKAMI M., TERESAWA E., KIMURA F., WA
KABAYASHI K. (1.973).- Modulating effect
of limbic structures on gonadotropin re
lease. Neuroendocrinology (Basel) 12 ,
1-16.

135.- KAWAKAMI M., YOSHIOKA E., KONDA N., ARI
TA J. Y VISESSUVAN S. (1.978).- Data on
the sites of stimulatory feedback action
of gonadal steroids indispensable for -
luteinizing hormone release in the rat.
Endocrinology 102, 791-798.

136.- KIMURA H. Y MacLEOD R.M. (1.975).- Dopa-
mine receptors and the regulation of pro
lactin secretion. Program of 57-TH annual
meeting of the endocrine society. New -
York (Abstract n°87).

137.- KLUVER H. Y BARRERA E.J. (1.953).- A me-
thod for the combined staining of cells
and fibers in the nervous system. J. Neu

ropathol. Exp. Neurol. 12, 400-405.

- 138.- KNOBIL E. (1.974).- On the control of gonadotrophin secretion in the rhesus monkey. Recent. Progress in hormone. Research 30, 1-36.
- 139.- KNOBIL E. (1.980).- The neuroendocrine control of the menstrual cycle. In: Recent progress in hormone research. Vol. 36, 53 - 88.
- 140.- KOBAYASHI T., KOBAYASHI T., KIGANA T., MIZUNO M., AMENOMORI Y., WATANABE T. AND ICHIKAWA H. (1.967).- Follicle-stimulating hormone-releasing factor (FSH-RF) and luteinizing hormone-releasing factor (LH-RF) in rat hypothalamic extract. Endocrinol. Japon 14, 101-106.
- 141.- KOCH Y., GOLDHABER G., FIREMAN I., ZOR U., SHANI J. Y TAL T. (1.977).- Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the

rat to thyrotropin-releasing hormone. Endocrinology 100, 1.476-1.493.

- 142.- KOIKEGAMI H. (1.963).- Amygdala and other related limbic structures; experimental - studies on the anatomy and function. Acta Mec. Biol. 10, 161-277.
- 143.- KOKUBU T., SAWANO S., SHIRAKI M., YAMASAKI M., ISHIZUKA Y. (1.975).- Extraction and - partial purification of prolactin-release stimulating factor in bovine hypothalami. Endocrinol. JPN, 22, 213-217.
- 144.- KONDA N. (1.975).- Electrophysiological studies of the forebrain limbic inhibitory systems in relation to gonadotropin regulation. Folia Endocrinol. JAP. 51/6, 524-545.
- 145.- KONIG J.F.R. Y KLIPPER R.A. (1.967).- The - rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. R. E.Krieger Publishing. Co. Inc. New York.

- 146.- KRAICER J. (1.975).- Mechanisms involved in the release of adeno^hypophyseal hormones. - In: Tixier-Vidal A. and M.G. Farquhar (Eds.) Ultrastructure in Biological Systems. Vol. 7 The Anterior Pituitary. Academic Press. New York, 1.975, 21-53.
- 147.- KREY L.C. Y SILVERMAN A.J. (1.978).- The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain II. Projection to the median eminence and the regulation of gonadotropin secretion. Brain Research, 157, 247-255.
- 148.- LA BRIE F., LEMAY A., LEMAIRE S. POIRIER G., BOUCHER R., BARDEN N. DE LEAN A. AND GAUTHIER M. (1.971).- Cyclic AMP and control of pituitary protein synthesis and release. Proc. Intern. Congr. Physiol. Sci. 25TH Munich, 331-348.
- 149.- LA BRIE F., FERLAND L., DROVIN J. (1.976).- Mechanism of control of LH and FSH secretion. -

In: Da Paz (Ed.) Recent advances in human reproduction amsterdam. Excerta medica, - 370, 127-133.

- 150.- LA BRIE F., BORGEAT P., DROVIN J., BEAULIEU M., LAGACÉ L., FERLAN L., RAYMOND V. (1.979). Mechanism of action of hypothalamic hormones in the adenohypophysis. Annu. Rev. Physiol. 41, 555-569.
- 151.- LACHELIN G.C.L., LEBLANC H. Y YEN S.S.C. - (1.977).- The inhibitory effect of dopamine agonist on LH release in women. J.Clin.Endocrinol. Metab. 44, 728-732.
- 152.- LAMBERTS S.W.J., McLEOD R.M. (1.978).- Studies on the mechanism of the gaba-mediated inhibition of prolactin secretion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158, 10-17.
- 153.- LANDFELD T.D., McWILLIANMS D.R. AND BOIME I. (1.976).- The isolation of mRNA encoding -

the alpha subunit of human chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 72 381-396.

- 154.- LARSSON-COHN V., JOHANSSON E.D.B., WIDE L., Y GEMZELL (1.972).- Effects of continuous - daily administration of 0,1 mg. of norethindrone on the plasma levels of progesterone and on the urinary excretion of luteinizing hormone and total oestrogens. *Acta Endocrinologica* 71, 551-556.
- 155.- LASLEY B.L., WANG C.F. AND YEN S.S.C. (1.975) The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophs. *J.Clin. Ednocrinol. Metab.* 41, 820-831.
- 156.- LEE C.Y. (1.976).- The porcine ovarian follicle: III development of chorionic gonadotropin receptors associated with increase in adenyl cyclase activity during follicle maturation. *Endocrinology* 99, 42-51.
- 157.- LEE P.A., JAFFE R.B., MIDGLEY A.R. KOBEN F.,

- NISWENDER G.D. (1.972).- Regulation of human gonadotrophing. VIII - supression of - serum LH and FSH in adult males following - exogens testosterone administratium. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 35, 633-641.
- 158.- LEE C.Y. AND RYAN R.J. (1.972).- Luteinizing hormone receptors specific binding of human luteinizing hormone to homogenates - of luteinizing rat ovaries. Proc. Natl. - Acad. Sci. USA 69, 3.520-3.532.
- 159.- LEE C.Y., COULAM C.B., JIANG N.S. AND RYAN R.J. (1.973).- Receptors for human luteinizing hormone in human corpora luteal tissue. J.Clin. Endocrinol. Metab. 36, 148-150.
- 160.- LEE P.A., XENAKIS T., WINER T. Y MATSENBAUG H. (1.976).- Puberty girls: correlation of serum levels of gonadotropins, prolactin, - androgens, estrogens, and progestins with - physical changes. J.Clin. Endocrinol. Metab. 43, 775-783.

- 161.- LEWIS P.R. AND SHUTE C.C.D. (1.967).- The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* 90, 521-540.
- 162.- LEWIS V.J., SINGH N.P. Y SERVERY B.K. - (1.971).- Human prolactin: Isolation and some properties. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 44, 1.169-1.186.
- 163.- LEYENDECKER G., WARDLAW S. Y NOCKE W. -- (1.972).- Experimental studies on the endocrine regulation during the pre-ovulatory phase of the human menstrual cycle. *Acta - Endocrinologica* 71, 160-178.
- 164.- LI C.H. AND STARMAN B. (1.964).- Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone. *Nature* 202, 291-292.
- 165.- LIBERTUN C., ARAKELIAN M.C., LARREA G.A. - FOGLIA V.G. (1.979).- Inhibition of prolac-

tin release by GABA in female and male -
rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161, --
28-33.

166.- LIEBERBUG I. Y McEWEN B.S. (1.975).- Es-
tradiol-17 β : A metabolite of testosteroo
ne recovered in cell nuclei from limbic -
are as of neonatal rat barins. Brain Res.
85, 165-170.

167.- LIU W.K. AND WARD D.N. (1.975).- The puri-
fication and chemistry of pituitary glyco-
protein hormones. Pharmacol. Therab. Biol.
I, 45-53.

168.- LOCATELLI V., COCCHI D., FRIGERIU C., BETTI
R., KROSGAARD-LARSEN P., RACAGNI G., MULLER
E.E. (1.979).- Dual γ -aminobutyric acid -
control of prolactin secretion in the rat.
Endocrinology 105, 778-781.

169.- LUCIEN ET BEAU (1.933).- La delimitation ana-
timique du septum lucidum chez l'homme. Comp
tes rendus de L'Association des Anatomistes,
419-423.

- 170.- MACDONALD G.J. AND GREEP R.O. (1.972).- -
Ability of luteinizing hormone (LH) to -
acutely increase serum progesterone levels
during the secretory phase of the rhesus-
menstrual cycle. Fertil Stezil 23 , 466-
472.
- 171.- MACLEOD R.M., SMITH M.C. y DE WITT G.W. -
(1.966).- Hormonal properties of trans -
planted pituitary tumors and their rela -
tion to the pituitary gland. Endocrinology
79 , 1.149-1.156.
- 172.- MACLEOD R.M., KIMURAH Y LOGIN I., (1.976).-
Inhibition of prolactin secretion by dopamine
and piribedit (ET-495) In pecele A. and E.E.
Muller (EDS) Growth hormone and related pepti
des Elsevier New York 1.976 , 443-453.
- 173.- MARTINI L., FRASCHINI F. AND MOTTA M., (1.968)
.- Neural control of anterior pituitary func
tions. Recent Progr. Hormone Res. 24 439-484.
- 174.- MAUVER R.A., STONE R. Y GORSKI J. (1.976).-
Cell-Free synthesis of a large translation

product of prolactin messenger RNA. J. -
Biol. Chem 251 , 2.801-2.807.

- 175.- MAUVER R.A., GORSKI J. y MCKEEN D.J. -
(1.977).- Partial amino acid sequence -
of preprolactin. Biochem J. 16 189-191.
- 176.- MCCANN S.M., (1.971).- Mechanism of action
of hypothalamic-hypophyseal stimulating and
inhibiting hormones. In : Frontiers in neu
roendocrinology. Edted by L.Martini and
W.F. Ganong. New York : Oxford 209-223.
- 177.- MCCANN S.M., (1.974).- Régulation of the
secretion of follicle stimulating hormone
(FSH) and luteinizing hormone (LH). In :
Handbook of physiology Vol. IV (ED) Knobil
E.T. y Sawyer. W.H. , 489-517. Baltimore:
Williams and Wilkins.
- 178.- MACCANN S.M., TALEISNIK S., AND FRIEDMAN
H.M. (1.960).- LH- Releasing activity in
hypothalamic extracts. Proc.Soc. Exptl.

Biol.Med. 104 432-434.

- 179.- MacCANN S.M., AND PORTER J.G. (1.969)
.- Hypothalamic pituitary stimulating
and inhibiting hormones. *Physiol. Rev.*
49 240-284.
- 180.- MacCANN S.M., KALRA P.S., SCHNEIDER H.
P. G., WATSON J. T., WAKABAYASHI K., -
FAWCETT C.P. AND KRULICH L., (1.972).-
Studies on the feedback actions of -
gonadal steroids on gonadotropin and -
prolactin secretion : Effects. sites,-
sites and mechanism of action. In: *Steroid hormones and brain functions*, edi-
ted by C.H. Sawyer and R.A. Gorski.
311-323.
- 181.- MacEWEN B.S., (1.976).- Steroid receptors
in neuroendocrine tissues: topography sub-
cellular distribution and functional in-
plications In: Naftolin F., K Ryans and
I.J. Davies (EPS) *subcellular mechanisms
in reproductive neuroendocrinology*, Else-
vier, Amsterdam 1.976 277-304.

- 182.- MacNATTY K.P., SAWERS R., MacNEILLY AS.
(1.974).- A posible role for prolactin
in control of steroid secretion by the
human Graafian follicle. Nature 250, -
653-655.
- 183.- MacNATTY K.P. AND SAWERS R.S. , (1.975)
.- Relationship between the endocrine
environment within the graafian follicle
and the subsequent rate of progesterone
secretion by human granulosa cells, in
vitro, J. Endocrinol 66,391-400.
- 184.- MacNATTY K.P., BENNIE J.G., HUNTER W.M.
Y MacNEILLY A.S. (1.975).- The effects -
of antibodies to human gonadotrophins -
on the viability and rate of progesterone
secretion by human granulosa cells -
in tissue culture, In: Physiological -
effects of immunity against reproductive
hormones, Ed. Edwards R.G. y Johnson M.H.
41-66, Cambridge. Cambridge University -
Press.

- 185.- MacNATTY K.P., BAIRD D.T., BOLTON A.,
CHAMBERS P., CORKER C.S., AND MacLEAN
H. (1.976).- Concentration of oestro-
gens and androgens in human ovarian -
venous plasma and follicular fluid -
throughout the menstrual cycle. J. En
docrinol 71 77-79.
- 186.- MacNEILLY A.S. Y CHARD T. (1.974).-
Circulating levels of prolactin during
the menstrual cycle. Clin. Endocrinol
83 711-721.
- 187.- MacNEILLY A.S. , EVANS G.E. , STURDY J.
Y CHARD T. (1.974).- Short-Term varia-
tion in blood levels of prolactin, luteii
nizing hormone and follicle stimulatins
hormone in normal women throughout the -
day. Journal of endocrinology 61 301-302.
- 188.- MEANS A.R., FAKUNDING J.L. , HUCKINS C.,
TINDALL D., AND VITALE R. (1.976).- Fo-
llicle-Stimulating hormone. The Sertoli

cell and spermatogenesis. Rec. Prog.
Horm. Res. 32 477-480.

189.- MEIBACH R.C. AND SIEGEL A. (1.977).-
Efferent connections of the septum -
area in the rat : an analysis utilizing
retrograde and anterograde transport
methods. Brain Research 119 1-26.

190.- MEITES J., LU K.H., WUTTKE W. , VELSCH
C.W. , NAGASAWA Y QUADAI S.K. (1.972)
.- Recent studies on functions and -
control of prolactin secretion in rats.
Rec. Prog. Horm. Res. 28 471-482.

191.- MELLGRAN S.J. A SREBRO B. (1.973).-
Changes in acetylcholinesterase and -
distribution of degenerating fibers in
the hippocampal region after septal -
lesions in the rat. Brain Research 52
19-36

192.- MENA F. , MAIWEH Y GROSVENOR (1.968)

.- Effect of ectopic pituitary upon -
prolactin concentration by the in situ
pituitary of the lactating rat. Endocri-
nology 83 1.359-1.362.

193.- MENDELSON C., DUFAU M.L. AND CATT K.J.
(1.975).- Gonadotropin binding and sti-
mulation of cyclic AMP and testosterone
production in isolated Leydig cells. J.
Biol Chem. 250 8.818-8.827.

194.- MIDGLEY A.R., (1.973).- Autoradiographic
analysis of gonadotropin binding to rat
ovarian sections. Adv. Exp. Biol. Med.
36 365-370.

195.- MIDGLEY A.R. Y JAFFE R.T. (1.968).- -
Regulation of human gonadotrophins IV -
correlation of serum concentrations of
follicle stimulating and luteinizing -
hormones during the menstrual cycle.
Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism 28 1.699-1.712.

- 196.- MADGLEY A.R. AND JAFFE R.B. (1.971).-
Regulation of human gonadotropins X.
episodic fluctuations of LH during the
menstrual cycle. J. Clin.Endocrinol.
Metab. 33 962-969.
- 197.- MILLS T.M. (1.975).- Effects of luteini
zing hormones and cyclic adenosine 3'-5'
-mono-phosphate on steroidogenesis in -
the ovarian follicle of the rabbit.
Endocrinology 96 440-447.
- 198.- MISHELL D., NAKAMURA R.M., CROSIGNANI -
P.G., STONE S., KHARMA K. Y NAGAYA Y. -
(1.971).- Serum gonadotropin and steroids
patterns during the normal menstrual cy-
cle. American Journal of Obstetrics -
and Gynecology 111 60-65.
- 199.- MOCHIZUKI M., MORIKAWA H. KAWAGUCHI K.
TOJO S. (1.976).- Growth hormone, pro-
lactin and chorionic somatomammotropin
in normal and molar pregnancy. J.Clin.
Endocrinol.Metab. 43 614-621.

- 200.- MONROE S., JAFFE R. y MIDGLEY A.R. -
(1.972).- Regulation of human gonadotropins XII Increase in serum gonadotropins in response to oestradiol. -
Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism 34 342-347.
- 201.- MOORE C.R. AND PRICE D. (1.932).- -
Gonad hormone functions and the reci-
procal influence between gonads and -
hypophysis, with its bearing on sex -
hormone antagonism. Am. J. Anat. 50
13-71.
- 202.- MORIARTY G.C. (1.976).- Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein
hormones. J. Histochem. Cytochem. 24
846-851.
- 203.- MOSKO S., LYNCH G. AND COTMAN C.W. -
(1.973).- The distribution of septal -
projections to the hippocampus of the-
rat. J.Comp. Neurol 152 163-174.

- 204.- MOTTA M. , FRASCHINI F. , GIULIANI G.
Y MARTINI L. (1.968).- The central -
nervous system, estrogen and puberty
Endocrinology 83 1.101-1.109.
- 205.- MOYLE W.R., BAHL O.P. , AND MARZ L. -
(1.975).- Role of the carbohydrate of
human corionic gonadotropin in the -
mechanism of hormone action. J. Biol.
Chem 25 9.163-9.174.
- 206.- NAKAI Y., PLANT T.M., HESS D.L. , _
KEOGH E.J. Y KNOBIL E. (1.978).- On the
sites of the negative and positive -
feedback actions of estradiol in the -
control of gonadotropin secretion in the
rhesus monkey. Endocrinology 102/4
1.008-1.014.
- 207.- NALLAR R., ANTUNES-RODRIGUEZ J. Y MacCANN
S.M., (1.966).- Effects of progesterone
on the level of plasma luteinizing hormo
ne (LH) in normal female rats. Endocrino
logy 79 (907-911).

- 208.- NANCE D. , SHRYNE J. Y GORSKI R. (1.974).-
Septal lesions: effects on lordosis -
behaviour and pattern of gonadotropin re-
lease. Hormones and Behaviour 5 73-81.
- 209.- NAUTA W.J.H. (1.956).- An experimental -
study of the fornix system in the rat. J.
Comp. Neur. 104(2) 247-271.
- 210.- NAUTA W.J.H. (1.958).- Hippocampal projections
and related neural pathways to the midbrain
in the cat. Brain 81 319-340.
- 211.- NAUTA W.J.H. (1.960).- Limbic system and -
hypothalamus: anatomical aspects. Physiol.
Rev. 40 (suppl. 4) 102-104.
- 212.- NAUTA W.J.H. (1.961).- Fibre degeneration
following lesions of the amygdaloid complex
in the monkey. J.Anat. 95 515-531.
- 213.- NAUTA W.J.H. Y KUYPERS M.G.J.M. (1.958).-
Some ascending pathways in the brain stem -
reticular formation. In : H.H. Jasper et Al.

(Editors) reticular formation of the -
 brain. Henry Ford Hospital Internatio -
 nal symposium little, Brown an company.
 Boston CH. 1 3-30.

- 214.- NEILL J.D., JOHANSSON E.D.B., DATTA J.K.
 Y KNOBIL E. (1.967).- Relationship be -
 tween the plasma levels of luteinizing hor -
 mone and progesterone during the normal
 menstrual cycle. Journal of Clinical Endocri -
 nology and Metaolism. 27 1.167-1.173.
- 215.- NICOLL C.S. Y BERN H.A. (1.971).- In: -
 Wolsternholme G.E.W. Knighe J. (Eds) Cibe
 Foundation symposium on lactogenic Hormo -
 nes. London, Churchill Livingstone
 299-334.
- 216.- NILLIUS S. Y WIDEL. (1.970).- Effects of
 oestrogen on serum levels of LH and FSH.
 Acta Endocrinologica 65 583-594.
- 217.- NILLIUS S. Y WIDE L. (1.971).- Induction
 of a mid-cycle peak of LH in young women by

exogenous destraladiol-17 β . Journal of -
Obstetrics and Gynaecology of the british
Commonwealth 78 822-827.

- 218.- NOKIN J., VEKEMAN N., L'HERMITE M. Y ROBYN
C. (1.972).- Circadian periodicity of serum
prolactin concentration in man. British Medical
Journal III 561-562.
- 219.- NORTHRUP B.E., HUMER W.C., BERGLAND R.M. -
(1.975).- Changes in human pituitary prolact
tin cells in association with breast cancer.
Surg. Forum 26 479-480.
- 220.- ODELL W.D., AND MOYER D.L. (1.971).- Physiolog
y of reproduction. St. Louis : Mosby.
- 221.- PALKA Y.S., RAMIREZ V.D. Y SAWYER C.H. (1.966)
.- Distribution and biological effects of -
tritiated estradiol implanted in the hypothal
amic-hypophysial region of female rats.
Endocrinology 78 487-492.
- 222.- PAPKOFF H. (1.965).- Some biological propert
ies of a potent follicle-stimulating hormone

preparation. Acta Endocrinol. 48 439-445.

223.- PAPKOFF H. AND SAMY T.S.A. (1.967).- Iso-
lation and partial characterization of -
polypeptide chains of ovine interstitial-
cell-stimulating hormone. Biochem. Biophys.
Acta 147 175-177.

224.- PAPKOFF H., GOPODAROWICZ D. AND LI C.H.,
(1.967).- Purification and properties of -
ovine follicle-stimulating. Hormone. Arch.
Biochem Biophys. 120 434-439.

225.- PAPKOFF H. AND EKBLAD M. (1.970).- Ovine
follicle-stimulating hormone: preparation
and characterization of its subunits. Bio-
chem. Biophys. Res. Commun 40 614-621.

226.- PAPKOFF H., SAIRAM M.R., FARMER S.W. AND
LI C.H. (1.973).- Studies on the structure
and function of interstitial cell-stimula-
ting hormone. Recent. prog. Horm. Res. 29
563-568.

- 227.- PARKER D.C., ROSSMAN L.G. Y VANDERLAAN -
E.F. (1.973).- Sleep-related nyctohemeral
and briefly episodic variation in human
plasma prolactin concentrations. J.Clin.
Endocrinol. Metab. 36 1.119-1.124.
- 228.- PARKER D.C., ROSSMAN L.G. Y VANDERLAAN -
E.F. (1.974).- Relation of sleep-entrained
human prolactin release to REM no REM cy-
cles. J.Clin.Endocrinol. Metab. 38 646-651.
- 229.- PASS K.A. Y ONDO J.G. (1.977).- The effects
of γ -amino-butyric acid on prolactin and
gonadotropin secretion in unanesthetized rat.
Endocrinology 100 1.437-1.442.
- 230.- PATURET G. (1.964).- Traite' D'anatomie hu-
maine tome IV : systéme nerveux. Masson et
cie. Paris 402-404.
- 231.- PECKHAM W.D. AND KNOBIL E. (1.976).- The -
effects of ovariectomy estrogen replacement
and neuraminidase treatment on the properties
of the adenohipophyseal glycoprotein hormones
of the rhesus monkey. Endocrinology 98 1.054-
1.062.

- 232.- PFAFF D.W. (1.968).- Autoradiographie - localization of radioactivity in rat brain after injection of tritiated sex hormones. Science N.Y. 161 1.355-1.356.
- 233.-PHIFER R.F., MIDGLEY A.R. AND SPICER S.S. (1.973).- Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone are present in the same cell-type in the human pars distalis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 125-134.
- 234.- PIACSEK B.E. Y MEITES J. (1.966).- Effects of castration and gonadal hormones on hypothalamic content of luteinizing hormone releasing factor (LRF). Endocrinology 79 - 432-440.
- 235.- PIERCE J.G., LIAD T.H., HOWARD S.H., SHOME B. Y CORNELL J.S. (1.971).- Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. Recent. Prog. Horm. Res. 23 165-173.

- 236.- PODESTA E., DUFAU M.L. AND CATT K.J. -
(1.976).- Adenosine 3⁺ 5⁺ monophosphate-
dependent protein kinase of Leydig cells:
Properties and relationship to gonadotro-
pin action upon cyclic AMP and steroidoge-
nesis. *Febs Lett* 70 212-218.
- 237.- POSNER B.I., KELLEY P.A., SHIU R.P.C. -
Y FRIESEN M.G. (1.974).- Studies of insu-
lin, Growth hormone and prolactin binding:
tissue distribution, species variation -
and characterization. *Endocrinology* 95 -
521-524.
- 238.- POTER J.C., KAMBERI I.A., Y GRAZIA Y.R. -
(1.971).- Pituitary blood flow and portal
vessels. In: Ganong W.F. Martini L. (Eds)
Frontiers in neuroendocrinology. London
O.U.P. 145-147.
- 239.- POWELL E.W. (1.973).- Limbic projections to
the thalamus. *Exp. Brain Res.* 17 394-401.

- 240.- POWELL E.W., AKAGI K. AND HATTON J.B. -
(1.974).- Subcortical projections of -
the cingulate gyrus in cat. J. Hirnforsch.
15 269-278.
- 241.- POWELL E.W. AND ROBINSON P.F. (1.975).-
Cinguloseptal projections in the squirrel
monkey. Brain Research. 96 310-316.
- 242.- PRENTICE L.G. AND RYAN R.J. (1.975).- LH
and its subunits in human pituitary, serum
and urine. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40
303-306.
- 243.- PURVIS K., CLAUSEN O.P.F., OLSEN A., HAUG E.
AND HANSSON V. (1.979).- Prolactin and leydig
cell responsiveness to LH/HCG in the rat.
Arch. Andrology 64 (219-226.
- 244.- QUIJADA M., KRULICH L., FAWCET C.P., SUNDBERG
D.K. AND MacCANN S.M. (1.971).- Localization
of TSH-Releasing factor (TRF). LH-RH and FSH-
RF in rat hypothalamus (abstract.) Federation
proc. 30 197-201.

- 245.- RABII J. (1.981).- Influence of the extrahypothalamic brain on luteinizing hormone release in the ovariectomized. Estrogen-treated rat. Biol. Reprod 24/4 9766-770.
- 246.- RACAGNI G., APUD J.A., LOCATELLI V., COCCHI D., NISTICO G., DIGIORIGIO R.M., MULLER E.E. (1.979).- GABA of CNS origin in the rat - anterior pituitary inhibits prolactin secretion. Nature 281 575-578.
- 247.- RAISMAN G. (1.966).- The connexions of the septum. Brain 89 317-348.
- 248.- RAISMAN G., COWAN W.M. & POWELL T.P. (1.966) .- An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. Brain 89 83-108.
- 249.- RAMIREZ V.D. AND MacCANN S.M. (1.963).- Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. Endocrinology 72 452-464.

- 250.- RAMIREZ V.D. AND MacCANN S.M. (1.965).-
Inhibitory effect of testosterone on -
luteinizing hormone secretion in immature
re and adult rats. Endocrinology 78 -
412-417.
- 251.- RAMON Y CAJAL S. (1.911).- Histologie du
système nerveux de L'homme et des verté-
brés.Paris.
- 252.- RICHARDS J.S. Y WILLIAMS J.J. (1.976).-
Luteal cell receptor contens for prolact
tin (PRL) and luteinizing hormone (LH);
regulation by LH and PRL. Endocrinology
99 1.571-1.574
- 253.- RIFKIND A.B., KULIN H.E. AND ROSS G.T.
(1.967).- Follicle-stimulating hormone --
(LH) in the urine of prepubertal children
J. Clin.Invest. 46 1.925-1.931.
- 254.- ROBYN C., AND L'HERMITE M. (1.977).- Prol
actin levels during the menstrual cycle.
J.Clin. Endocrinol. Metab. 44 989-993.

- 255.- RODBARD D., BRIDSON W. Y RAYFORD P.L. -
(1.969).-Rapid calculation of radioimmunoassay results. J. Lab. Clin. Med. 7 , 4 ,
5 , 770-777.
- 256.- RODGERS C.H., (1.975).- Neuroendocrine -
Mechanism responsible for gonadotropins-
release. J. Reprod. Med. 14 1-18.
- 257.- ROMEIS B. (1.940).- III Gestalt, Grosse
und gewicht der menschlichen hypophyse.
In: Handbuch der microskopischen anatome
des menschen. vol 3. (Ed) V. Mollen-
dorff, W. Berli: Julius Springer 35-48.
- 258.- ROSS G.T., CARGILLE C.M., LIPSETT M.B. -
RAYFORD P.L., MARSHALL J. R. , STROTT C.A.
Y RODBARD D. (1.970).- Pituitary and gona-
dal hormones in women during spontaneous
and induced ovulatory cycle. Recent Pro -
gress in Hormone Research. 26 1-48.
- 259.- RYAN R.J., JIANG N.S. AND HANOLON S. (1.970)
.- Some physical and hydro-dynamic properties

of human FSH and LH. Redent. Progr. -
Hormone Res. 26 105- 130.

- 260.- SANTEN R.J., PAULSEN C.A. (1.973).- Hypo-
gonadotrophic eunuchoidism: II-gonadal -
respondiveness to exogenous gonadotrophins.
Journal of clinical Endocrinology and -
Metabolism. 36 55-63.
- 261.- SASSIN J.F., FRANTZ A.G., WEITZMAN E.D. -
Y KAPEN S.(1.972).- Human Prolactin: 24-hour
pattern with increased release during -
sleep. Science.177 1.209-1.214.
- 262.- SAWYER C.H. (1.972).- Functions of the amygdala related to the feedback actions of gonadal steroid hormones. In: Eleftheriou neurobiology of the amygdala. 745-762 (Plenum Press, New York).
- 263.- SAXENA B.B., AND RATHNAM P. (1.971).- Chemical and immunological characteristics of -
the subunits of human pituitary FSH and LH.

In: Structure-activity relationships of protein and Polypeptide Hormones. Part. I. Edited by M. Margoulies and F.C. Greenwood. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation Excerpta Med. Found. Intern. Congr. ser. 241, 1971 122.131.

- 264.- SCHALLY A.V., SAITO T., ARIMURA A., MULLER E.E. BOWERS C.Y., AND WHITE W.F. (1.966)
.- Purification of follicle-stimulating hormones-releasing factor (FSH-RF) from bovine hypothalamus. Endocrinology. 79 1.087-1.094.
- 265.- SCHALLY A.V., ARIMURA A., BOWERS C.Y., KASTIN A.J. SAWARND S. AND REDDING T.W. (1.968).- Hypothalamic neuro-hormones - regulating anterior pituitary function. Recent. Progr. Hormone Res. 24 497-581.
- 266.- 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. - (1.971).- Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of

luteinizing and follicle-stimulating hormones. Science. 173 1.036-1.037.

- 267.- SCHENKER J.G., BEN - DAVID M., POLISMUK W. L. (1.975).- Prolactin in normal pregnancy: Relationship of maternal, fetal and amniotic fluid levels. Am J. Obstet. Gynecol. 123 834-838.
- 268.- SCHNEIDE H.P.G., CRIGHTON D.B., AND MacCANN S.M. (1.969).- Suprachiasmatic LH-releasing factor. Neuroendocrinology. 5 271-280.
- 269.- SEGAL M., AND LANDIS S. (1.974).- Afferents to the hippocampus of the rat studies with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. Brain Research 78 1-15.
- 270.- SEGGIE J. AND BROWN G.M. (1.974).- Program and abstracts, society for neuroscience, - 4 TH . Annual Meeting. 419 (Abstract 622).
- 271.- SEGGIE J. Y BROWN G.M. (1.976).- Twenty-four-hour resting prolactin levels in male rats: the effect of septal lesions and -

- order of sacrifice. Endocrinology 98 -
1.516-1.522.
- 272.- SEGGIE J. Y UHLIR I. (1.979).- Parallel
changes in behavior and plasma levels -
of hormones in septal rats. Psychoneuroen-
docrinology. 4 135-144.
- 273.- SETCHELL B.P. Y JACKS F. (1.974).- Inhibin-
like activity in rete testis fluid. J. En-
docrinol. 62 675-676.
- 274.- SHAW R.W. (1.975).- Oestrogen modulation -
of gonadotropin release. Proceedings of -
the Royal Society of Medicine 68 73-75.
- 275.- SHENAI R. Y WALLIS M. (1.975).- Effects -
of insulin and human chorionic somatomam-
motrophin on prolactin biosynthesis in vi
tro. J. Endocri. 67 54-55.
- 276.- SHERINS R.J., LORIAUX D.L. (1.973).- Stu-
dies on the role of sex steroids in the -
feed- back control of FSH secretion in -
men. Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism. 36 886-893.

- 277.- SHERIUS R.J., BULLOCK L., GAY V.L., -
UANK-PERTULA T. AND BARDIN C.N. (1.971).-
Plasma LH and FSH levels in androgen in-
sensitive pseudo herma-phroditic rat :
responses to steroid administration. Endo
crinology. 88 763-770.
- 278.- SILER T.M., MORGENSTERN L.L. Y GREENWOOD
F.C. (1.972).- The release of prolactin
and other peptide hormones from human -
anterior pituitary tissue culture. In:
Wolstenholme G.E.W. y J. Knight (Ed.) -
Lactogenic Hormones. Churchill. Livingstone
Edinburgh and London. 1.972 207-222.
- 279.- SILVERMAN A.J. Y KREYL.C. (1.978).- The -
luteinizing hormone-releasing hormone -
(LH-RH) neuronal networks of the guinea -
pig brain I. intra-and extra-hypothalamic
projections. Brain Research.157 233-246.
- 280.- SIMMONS H.J. AND POWELL E.W. (1.972).-
Septomammillary projections in the squirrel
monkey. Acta Anat. (Basel). 82 159-178.

- 281.- SINHA Y. Y TUCKER H. (1.968).- Pituitary prolactin content and mammary development after chronic administration of prolactin. Proceedings of the society for experimental Biology and medicine. 128 84-88.
- 282.- SMITH P.E. AND ENGLE E.T. (1.927).- Experimental evidence regarding the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the central system. Am. J. Anat. 40 159-217.
- 283.- STEINBERGER E. (1.971).- Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physio. Rev. 51 1-9.
- 284.- STEINBERGER E. (1.975).- Hormonal regulation of the seminiferous tubule function. In : French F.S., V. Hansson E.M. Ritzen and S.N. Nayfeh (Eds). Current topics in Molecular Endocrinology. Hormonal regulation of spermatogenesis. Plenum Press. - New York. 1.975 337-362.

- 285.- STEPHAN H. AND ANDY O.J. (1.962).- The septum (A comparative study on its size in insectivores and primates). J. Hirnforsch. 5 229-244.
- 286.- STEWART BENTLEY M., ODEL W. Y HORTON R. (1.974).- The feed-back control of luteinizing hormone in normal men. Journal of clinical Endocrinology and Metabolism 38 545-553.
- 287.- STRICKER R.P. Y GRUETER R. (1.928).- Action lobe anterior de l'hipophysis sur la montée laipeuse. Compt Red. Soc. Biol. 99 1.978-1.986.
- 288.- SWANSON L.W. AND COWAN W.M (1.976).- Autoradiographic studies of the development and connections of the septal area in de rat. In: The septal Nuclei (J.F.R. France Ed.). Plenum Press. New York. 37-64.
- 289.- SWANSON L.W. AND COWAN W.M. (1.977).- An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocam

- pal formation in the rat. J. Comp. Neurol.
172 49-84.
- 290.- SZABO M. Y FROHMAN L.A. (1.976).- Dissociat
tion of prolactin-releasing activity from
thyrotropin-releasing hormone in porcine -
stalk median eminence. Endocrinology. 98
1.451-1.459.
- 291.- TEJASEN T. Y EVERETT J.W. (1.967).- Surgii
cal analysis of the preoptico-tuberal pathway
controlling ovulatory release of gonadotrophins
in the rat. Endocrinology 81 1.387-1.396.
- 292.- TERASAWA E. Y SAWYER C.H. (1.969).- Electri-
cal and electrochemical stimulation of the -
hypothalamo-adenohypophyseal system with staini
less steel electrode. Endocrinology 84 918-925.
- 293.- TERASAWA E. Y KAWAKAMI M. (1.973).- Effects
of limbic forebrain ablation on pituitary gonaa
dal function in the female rat. Endocrinol.
Japon 20/3 277-290.
- 294.- TSURUHARA T. , DUFAU M.L., HICKMAN J. AND CATT

- K.J. (1.972).- Biological properties of HCG after removal of terminal sialic acid and galactose residues. *Endocrinology*. 91 296-301.
- 295.- TURKINGTON R.W., UNDERWOOD L.E. Y WYK J.J. (1.971).- Elevated serum prolactin levels after pituitary-stalk section in man. *N. Engl. J. Med.* 285 707-714.
- 296.- TYSOM J.E., HWANG P. GUVDA H. Y FRIESEN H. G. (1.972).- Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am.J.Obste.Gynecol.* 113 14-23.
- 297.- VAITUKAITIS J.L., ROSS G.T., BRAUNSTEIN G.D. AND RAYFORD P.L. (1.976).- Gonadotropins and their subunits: Basic and clinical studies. *Recent. Prog. Horm. Res.* 32 289-294.
- 298.- VALE W., GRANT G. Y GUILLEMIN R. (1.973).- Chemistry of the hypothalamic releasing factors studies on structure-function relationships. In: Ganong. W.F. Martini L. (Eds). *Frontier in neuroendocrinology*. London O.U.P. 375-413.

- 299.- VALENSTEIN E.S. Y NAUTA W.J.H. (1.959).-
A comparison of the distribution of the
fornix system in the rat, Guinea pig, cat
and monkey. J. Comp. Neurol. 113 337-363.
- 300.- VANDALEM J.L., PIRENS G., CLOSSET J. AND
HENNEN G. (1.975).- Selective radioimmuno
assays for human luteinizing hormone (hLH)
and human chorionic gonadotropin (hCG).
Arch. int Physio Biochim. 83 753-759.
- 301.- VANDE-WIELE R.L., BOGUMIL J., DYRENFURTH I.
RERIN M., JEWELEWICZ R., WARREN M., RIZKA-
LLAM T. Y MIKHAIL G. (1.970).- Mechanisms
regulating the menstrual cycle in women.
Recent. Progres in hormone Research 26
63-95.
- 302.- VAN HALL E.V. , VAITUKAITIS G.T., HICKMAN J.
W. AND ASHWELL G. (1.971).- Effects of pro
gressive desialylation on the rate of disa
pearance of immunoreactive HCG from plasma
in rats. Endocrinology 89 11-23.

- 303.- VAN MAANEN J.H. Y SMELIK P.G. (1.968).-
Induction of pseudopregnancy in rats -
following local depletion of monoamines
in median eminence of the hypothalamus.
Neuroendocrinology 3, 177-186.
- 304.- VELASCO M.E. Y TALEISNIK S. (1.969).- Re
lease of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. Endocrinology 84, 132-139.
- 305.- VIJAYAN E. Y McCANN S.M. (1.978).- The -
effect of intraventricular injection of -
 γ -aminobutyric acid (GABA) on prolactin
and gonadotropin release in conscious fe
male rats. Brain Res. 155, 35-42.
- 306.- WANG C.F., LASLEY B.L., LEIN A. AND YEN
S.S.C. (1.976).- The functional changes
of the pituitary gonadotrophs during the
menstrual cycle. J.Clin. Endocrinol. Me-
tab 42, 718-726.

- 307.- WARD D.N. AND ARNOTT M.S. (1.965).- Gel filtration of proteins with particular reference to the glycoprotein LH. Anal - Biochem. 12, 296-302.
- 308.- WARD D.N., FUFINO M. AND LAMKIN W.M. - (1.966).- Evidence for two carbohydrate moieties in ovine LH. Federation Proc. 25, 384-392.
- 309.- WARD D.N., ADAMS-MAYNE M., RAY N., BALK D.E., COFFEY J. AND SHOWALTER M. (1.967) Comparative studies of luteinizing hormone from beef, pork and sheep pituitaries I. purification and properties. Gen. Comp. Endocrinol. 8, 44-53.
- 310.- WATANABE S., AND McCANN S.M. (1.968).- Localization on follicle-stimulating hormone-releasing factor in the hypothalamus and neurohypophysis as determined by in vitro assay. Endocrinology 82, 664-673.

- 311.- WATSON J.T., WAKABAYASHI K., KRULICH L., ILLNER P., FAWCETT C.P. AND McCANN S.M. (1.970).- Effect of pituitary extract - on the gonadotropin and prolactin response to crude rat hypothalamic extract in vivo in male rats. *Physiologist*. 13, 335-342.
- 312.- WEICK R.F. Y DAVIDSON J.M. (1.970).- Localization of the stimulatory feedback effect of estrogen on ovulation in the rat. *Endocrinology* 87, 693-700.
- 313.- WEISENBERG L.S., DE NICOLA A.F., ARAKELIAN M.D., LIBERTUN C. (1.979).- Effect of median eminence lesions on ³H estradiol binding in the anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 105, 1.152-1.164.
- 314.- WINTER J.S.D., FAIMAN C., HOBSON W.C., PRASAD A.V. AND REYES F.I. (1.975).- Pituitary-gonadal relations in infancy I

patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee. J.Clin.Endocrinol. - Metab. 40, 545-549.

- 315.- WISE A.J., GROSS M.A. Y SCHALCH D.S. -- (1.973).- Quantitative relations hips of the pituitary-gonadal axis in postmenopausal women. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 81, 23-36.
- 316.- YAMAMOTO K., KASAI K., IEIRI T. (1.975).- Control of pituitary functions of synthesis and release of prolactin and growth hormone by gonadal steroids in female and male rats. Jpn. J. Physiol. 229, 1.102-1.109.
- 317.- YEN S.S.C. Y TSAI C.C. (1.971).- The biphasic pattern in the feedback action of ethinyl estradiol on the release of FSH and LH. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 33, 882-887.

- 318.- YEN S.S.C. Y TSAI C.C. (1.972).- Acute gonadotropin release induced by exogenous oestradiol during the mid-follicular phase of the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 34, 298-305.
- 319.- YEN S.S.C., EHARA Y. Y SILER T.M. (1.974). Augmentation of prolactin secretion by estrogen in hypogonadal women. *Journal of Clinical Investigation* 53, 652-655.
- 320.- ZEILMAKER G.H. (1.966).- The biphasic effect of progesterone on ovulation in the rat. *Acta Endocrinologica* 51, 461-468.
- 321.- ZELEZNIK A.J., MIDGLEY A.R. Jr. Y REICHERT L.E. Jr. (1.974).- Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95, 818-825.

322.- ZIMMERMAN E.A., DEFENDINI R. Y FRANTZ A.G.
(1.974).- Prolactin and growth hormone in
patients with pituitary adenomas: A correla
tive study of hormone in tumor and plasma
by immunoperoxidase technique and radioinmu
noassay. J.Clin. Endocrinol. Metab. 38, -
577-583.

323.- ZIMMERMAN E.A. Y ANTUNES J.L. (1.976).- Or
ganization of the hypothalamic pituitary -
system. Current concepts from immunohisto-
chemicals studies. J.Histochem. Cytochem.
24, 807-815.

CARRERAS EGAÑA, Alfonso

Influencia del Septum Pellucidum sobre la secreción de
Gonadotropinas y prolactinas en ratas macho / Alfonso Ca-
rreras Egaña. - Granada: Universidad, Facultad de Cien-
cias, 1.983

S.

262 h.: graf.; 29 curs. - Bibliografía: 186

E.

- Tesis Univ. Granada.

N.º

I. Univ. Granada, ed.

591.14::599.32(043)

R. 55.407

2.º Ejemp.