

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudios fisiológicos y clínicos con un nuevo análogo del LH-
RH : el D-TRP6-LH-RH**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carlos Jaramillo Jaramillo

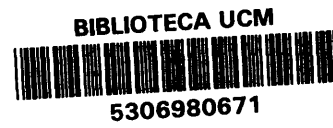
DIRECTOR:

José Botella Llusía

Madrid, 2015

DE 616.4:616.8
JAR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TA 1666

TESIS DOCTORAL

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y CLÍNICOS CON UN NUEVO ANALOGO DEL LH-RH:
EL D-TRP⁶-LH-RH

CARLOS JARAMILLO JARAMILLO
MADRID, NOVIEMBRE DE 1.977



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y CLÍNICOS CON UN NUEVO ANALOGO DEL LH-RH:

EL D-TRP⁶-LH-RH

TESIS DOCTORAL

Presentada por el Licenciado
don Carlos Jaramillo Jaramillo
para optar al título de
Doctor en Medicina

Madrid, Noviembre de 1977

DEDICATORIA:

A mi familia, y mis amigos
que son también mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor J. Botella Llusia, por su apoyo entusiasta y por su experiencia que me ha ayudado en la parte clínica de este trabajo. Al Profesor A. Fernández-Cruz Liñán, por haberme facilitado en su Cátedra, todo cuanto requerí de ella.

De una manera muy especial quiero expresar mi agradecimiento al Dr. A. L. Charro Salgado y al equipo que él dirige, mis compañeros: Dres. R. Fernández-Durango, A. López-Maciá, G. López del Campo, V. Pérez-Infante, las Licenciadas en Química, M. Puente -- Cueva y E. Bordiú Obanza, y los Sres. I. Torres, F. Montiel Casado y O. Vaca. Un equipo, que pese a todas las dificultades para la investigación es capaz de realizar una magnífica labor, compitiendo y colaborando a su vez internacionalmente, formando especialistas, en suma realizando una labor tesonera y profunda en el difícil campo de la investigación.

Al Profesor R. Cadórniga y la Srta. M. Ambit, por su ayuda en la preparación farmacológica del análogo utilizado en este trabajo.

Al Profesor A.V. Schally y a los Laboratorio Ayerst, por haberme donado generosamente la hormona.

Al Ecuatoriano, Profesor R. Fierro-Benítez, por su apoyo moral y sus consejos.

A los Dres. F. Nogales y R. Ardevi6, por su ayuda en la interpretación de las biopsias y en las citologías respectivamente.

A los Sres. Q. Sarasquete, A. Casado y F. Ormeño por su colaboración en la iconografía; a la Sra. M. C. Salmerón Urrea por su ayuda en la mecanografía.

Al Patronato de Investigaciones Endocrino-Metabólicas de la "Fundación General Mediterránea", por su apoyo económico.

Y a todos aquellos que de una manera y otra han contribuido a la finalización de este trabajo.

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
CRF	Factor liberador de la corticotrofina
FSH	Hormona foliculoestimulante
GIF	Factor de inhibición de la hormona de crecimiento
LH	Hormona luteinizante
LH-RH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
mIU/ml	mili-unidades internacionales por mililitro
Δ MxA	Incremento máximo absoluto
Δ Mx%	Incremento máximo porcentual
MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
MSH-RH	Factor liberador de la Hormona estimulante de los melanocitos
ng	nanogramos
PIF	Factor inhibidor de la prolactina
PRL	Prolactina
SNC	Sistema nervioso central
T	Testosterona
TSH	Tirotrofina
TRH	Hormona liberadora de tirotrofina
μ g	microgramos
AT	Area total

A. INTRODUCCION

I.-	Introducción	12
I.1.-	Aspectos históricos	14
II.-	Localización anatómica del hipotálamo	18
III.-	Hormonas y Factores Hipotalámicos Hipofisiotropos (Liberadores e Inhibidores)	21
III.1.-	Hormona Liberadora de Tirotrófina (TRH o TRF)	
III.2.-	Factor Inhibidor de la Prolactina (PIF)	22
III.3.-	Factor Liberador de Prolactina (PRF)	23
III.4.-	Factor Liberador de Corticotrofina (CRF) ...	23
III.5.-	Factor Liberador de la Hormona de Crecimiento (GH-RF)	23
III.6.-	Hormona Inhibidora de la Somatotrofina (GIF, Somatostatina)	24
III.7.-	Factor Inhibidor de la Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH-RH;MSH-RIF).....	24
III.8.-	Factor Liberador de la Hormona Estimulante de los melanocitos (MSH-RH;MSH-RF).....	25
III.9.-	Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LH-RH;LH-RF;GN-RH)	25
III.9.1.-	Sitio de Producción de la LH-RH ..	25
III.9.2.-	Demostración de la existencia de una hormona hipotalámica liberadora de LH y FSH: aislamiento, estructura y síntesis	28
III.9.3.-	Biosíntesis de la LH-RH	32
III.9.4.-	Estudios inmunológicos de la LH-RH.	
III.9.5.-	Metabolismo y vida media de la LH-RH	34
III.9.6.-	Características químicas y biológicas de la LH-RH	35

III.9.7.- Mecanismo de acción de la LH-RH ...	36
III.9.8.- Otros materiales con actividad LH-RH	36
III.9.9.- Efecto de los esteroides sexuales a la LH-RH	37
III.9.9.1.- Efecto de los esteroides sexuales en la respuesta a la LH-RH en animales	37
III.9.9.2.- Efecto de los esteroides sexuales en la respuesta a la LH-RH en humanos	40
III.9.10.-Efectos de la LH-RH en animales ...	41
III.9.11.-Diagnóstico clínico de la LH-RH en la especie humana	44
III.9.11.1.- Diagnóstico clínico de la LH-RH en mujeres	45
III.9.11.2.- Diagnóstico clínico de la LH-RH en hombres	50
III.9.11.3.- Diagnóstico clínico de la LH-RH en niños	52
III.9.12.-Estudios y respuesta a la LH-RH en varias enfermedades endocrinas: Acromegalia, Cushing y en pacientes tratados con glucocorticoides	54
III.9.13.-Uso terapéutico de la LH-RH	55
III.9.13.1.- Uso terapéutico de la LH-RH en mujeres	56
III.9.13.2.- Uso terapéutico de la LH-RH en hombres	57
III.9.14.-Análogos con potencia superior a la LH-RH	59
III.9.14.1.- Introducción	59
III.9.14.2.- Estudios básicos con análogos superactivos	60

III.9.14.3.- Estudios clínicos ...	64
III.9.15.-Análogos inhibidores de la LH-RH	67
B.- OBJETO DE LA TESIS	72
C.- MATERIALES Y METODOS	74
1.- Materiales	74
1.1.- El D-Trp ⁶ -LH-RH	74
1.2.- Material clínico	79
1.2.1.- Hombres normales	79
1.2.2.- Mujeres normales	80
1.2.3.- Pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico masculino	81
1.2.4.- Mujeres anovulatorias	83
2.- Métodos	88
2.1.- Generalidades de RIA	88
2.2.- Radioinmunoensayo de LH y FSH, con material donado por NIH (National Institute of Health) ...	89
2.2.1.- Marcaje de las hormonas	90
2.2.2.- Anticuerpos	90
2.2.3.- Curva Standard	91
2.2.4.- Separación del antígeno marcado libre - del ligado y del yodo libre	94
2.3.- Radioinmunoensayo del 17 β -estradiol	99
2.3.1.- Componentes del kit	99
2.3.2.- Metodología del RIA de 17 β -estradiol ..	99
2.4.- Radioinmunoensayo de la Testosterona	102
2.4.1.- Componentes del kit	102
2.4.2.- Metodología del RIA de Testosterona ...	103
2.4.3.- Fiabilidad del método	106
2.5.- Determinación de Pregnandiol	106
2.6.- Cálculo de resultados	107

D.- RESULTADOS	109
1.- Hombres normales	109
2.- Mujeres normales	121
3.- Pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico - masculino	131
4.- Mujeres anovulatorias	142
E.- DISCUSION	160
F.- CONCLUSIONES	180
G.- BIBLIOGRAFIA	183

INTRODUCCION

PINTOS (4) los cuales en un herido de la guerra de Africa, que tenía alojada una bala en el tallo hipofisario, advirtieron el desarrollo de un síndrome de hipogonadismo masculino secundario, obesidad y diabetes insípida.

Actualmente sabemos que la hipófisis no funciona en forma autónoma, sino que está regulada por un grupo de hormonas que proceden del Hipotálamo (5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,352). De ésto puede deducirse que el Hipotálamo y la Hipófisis, constituyen una unidad funcional-endocrina. El comportamiento de la unidad Hipotálamo-hipofisaria es de extraordinario interés, porque explica las íntimas relaciones de los dos sistemas integradores de los mamíferos superiores: el Nervioso Central y el Endocrino. La secreción de las hormonas adenohipofisarias depende del Hipotálamo por medio de la neurosecreción de zonas íntimamente relacionadas con el cerebro visceral. De esto puede deducirse la complejidad, y al mismo tiempo explicarse el porqué, de los arcos reflejos que regulan las secreciones. La Prolactina (PRL), por ejemplo, puede ser liberada como respuesta al estímulo del coito, la corticotrofina puede ser liberada en respuesta al stress. Y, así pueden enumerarse ejemplos muy variados, que explican claramente la conexión que tiene la adenohipófisis con las estructuras del SNC, a través del Hipotálamo. Es muy importante también, saber que la interrelación -- existente entre el Hipotálamo y la Hipófisis anterior se efectúa a través de un influjo humoral específico, de acuerdo con los postulados de GREEN Y HARRIS (18). Los quimiotransmisores originados en el Hipotálamo llegan a la Hipófisis anterior por el sistema Porta-Hipofisario (19) donde ejercen su acción de liberadores: "releasing".

I. 1. ASPECTOS HISTORICOS

Resulta interesante realizar un pequeño resumen cronológico de los diversos experimentos fundamentales que han conducido a los conocimientos que actualmente se tienen de la Neuroendocrinología.

En contraste con la Neurohipófisis o lóbulo posterior, -- que recibe abundantes fibras nerviosas a través del tracto Hipotálamo-Hipofisario, el lóbulo anterior posee escasa inervación como lo afirmara ACHUCARRO en 1912 (20). Inmediatamente después de esta constatación, se formuló la hipótesis de que el Sistema Nervioso Central podría influir en la adenohipófisis por medio de un particular sistema vascular denominado -- "Sistema Porta-Hipofisario", descubierto por POPA y FIELDING (19) y que luego HARRIS (21) constató en casi todos los vertebrados. Estos vasos que se originan en capilares situados en la Eminencia Media e Infundibulum, descienden a lo largo del pedúnculo hipofisario y se introducen en los sinusoides del lóbulo anterior de la hipófisis. El que la sangre en dicho sistema progresa en forma descendente fué demostrado por -- HOUSSAY en 1935 (22) y confirmado por WISLOCKI y KING un año más tarde (23); posteriormente, GREEN y HARRIS en 1949, lo corroboraron en la rata (24). Años más tarde se desarrolló un conocimiento anatómico más completo de los vasos del sistema Porta-hipofisario al describirse los llamados vasos largos y cortos, que se originan en el plexo capilar primario de la -- eminencia media y terminan en los sinusoides de la hipófisis anterior (25). De lo expuesto resulta claro que ya sea de la Neurohipófisis o de la eminencia media, la sangre puede penetrar directamente en la Adenohipófisis, como se puede ver en la Figura 1.

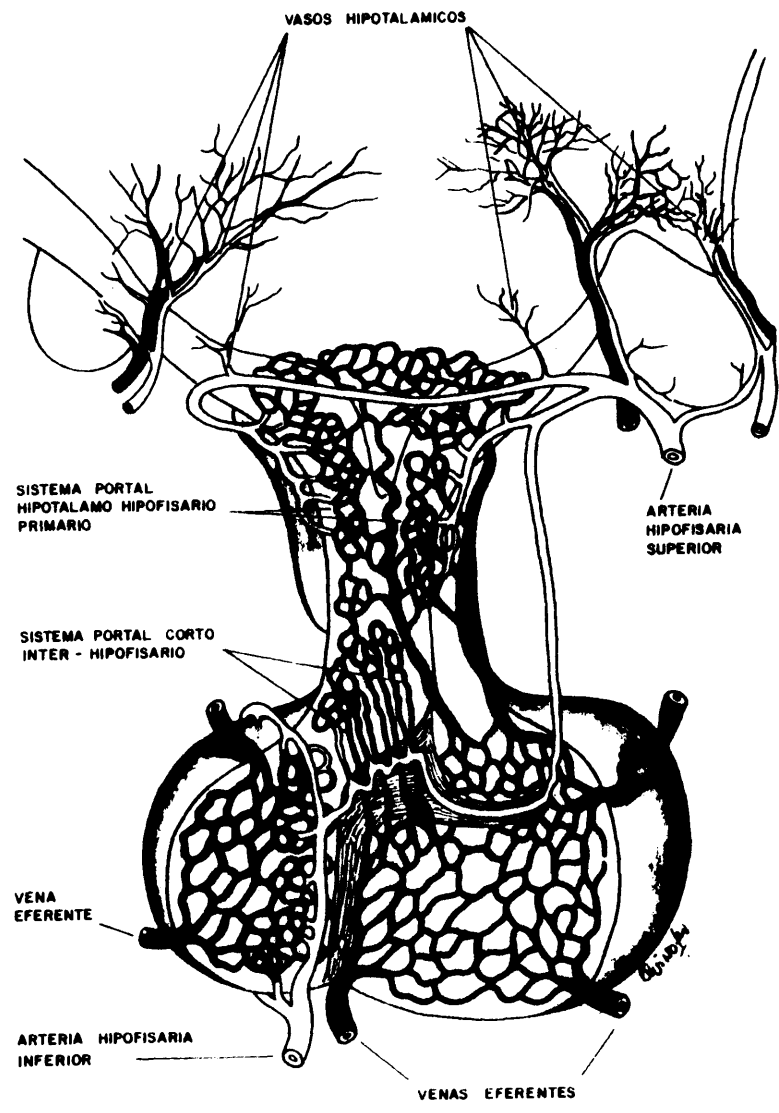


Figura 1.-

Vascularización Hipotálamo-Hipofisarias.
 Netter (63).

El descubrimiento de esta particular estructura vascular, que permite la irrigación de la Hipófisis y, la estrecha relación que se establece entre el lecho capilar primario del sistema Porta-Hipofisario con las terminaciones nerviosas de la eminencia hipotalámica, desencadenó toda una serie de investigaciones tendentes a esclarecer el significado funcional de esta entidad Hipotálamo-Hipofisaria. Y, así en 1950, los trabajos de HARRIS (26) demostraron que los vasos portales después de la sección del pedúnculo hipofisario, se regeneraban rápidamente. Con la regeneración de los vasos portales se -- instalaba nuevamente la relación anatómica normal entre Hipotálamo e Hipófisis y el retorno de la función hipofisaria. - Esta fué una prueba a la tesis de regulación humoral de la Hipófisis anterior y de que la misma dependía de la integridad del sistema Porta-Hipofisario.

Luego se siguieron otra serie de experiencias, que confirmaban esta tesis. El transplante de la hipófisis en un lugar distante de la silla turca es seguido de trastornos en la función hipofisaria, sobre todo en lo concerniente a la síntesis y liberación de gonadotrofinas (Foliculo-estimulante (FSH) y Luteinizante (LH)) y, en forma menos pronunciada, respecto a la de adrenocorticotrofina (ACTH) y a la de Tirotrofina (TSH) (27). Años después el mismo HARRIS (21) demostró que aunque la mayoría de las hormonas hipofisarias, disminuían o anulaban su producción cuando eran transplantadas a otro lugar, había una excepción a la regla, la excepción estaba representada por la PRL, que en tales condiciones no sólo continuaba -- sintetizándose, sino que se segregaba en cantidades superiores a las normales.

El retorno a un funcionamiento normal solamente se conseguía cuando la glándula era reimplantada bajo el Hipotálamo, ya sea inmediatamente después de haberla sacado de la silla turca o bien después de un tiempo más o menos prolongado de haberla transplantado en un lugar lejano de la silla turca - (27).

II. LOCALIZACION ANATOMICA DEL HIPOTALAMO

El Hipotálamo, como su nombre lo indica está debajo del Tálamo, en una zona central del cerebro. Su límite anterior está formado por un plano que pasa por la lámina terminalis, la comisura blanca anterior por arriba y el quiasma óptico - por abajo. El límite posterior lo constituye un plano que - va de la comisura blanca posterior al borde posterior de los cuerpos mamilares. Dorsalmente el surco hipotalámico delimita el Hipotálamo y el Tálamo. El tuber cinereum constituye el límite ventral. El límite lateral del hipotálamo está -- presentado por un plano imaginario anteroposterior que pasa por fuera de los pilares anteriores del fórnix. Siguiendo a Le Gros Clark (114) los núcleos y áreas del Hipotálamo pueden agruparse en tres zonas de delante atrás:

ZONA PREOPTICA: - Area preóptica: medial y lateral
- Area hipotalámica anterior
- Núcleo supraóptico
- Núcleo paraventricular
- Núcleo supraquiasmático
- Núcleo parvocelular periventricular

ZONA TUBERALIS: - Núcleo dorsomediano
- Núcleo ventromediano
- Núcleo infundibularis o subventricular o arcuato.
- Area hipotalámica lateral
- Area hipotalámica dorsal

ZONA MAMILARIS: - Cuerpo mamilar
- Núcleo premamilar
- Núcleo supramamilar
- Núcleo intercalado
- Area hipotalámica posterior

El Hipotálamo está además en conexión directa con la Hipófisis por medio del Tallo Hipofisario, como se ilustra en las Figuras 1,2, y 3.

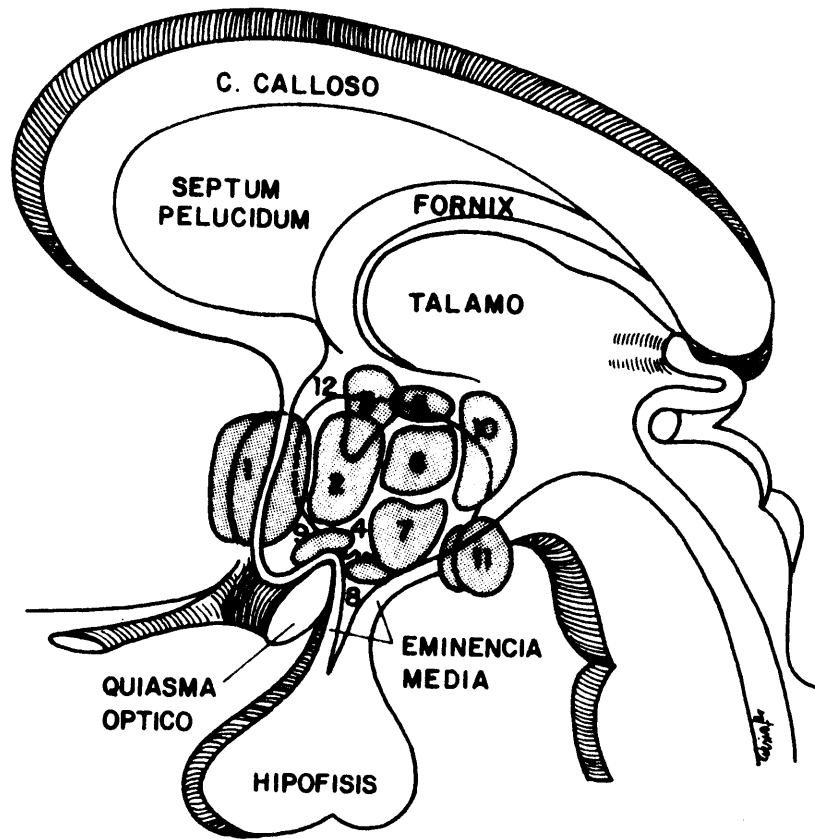


Figura 2.- Areas y Núcleos Hipotalámicos: 1: Area preóptica (media y lateral); 2. Area hipotalámica anterior; 3. Núcleo paraventricular; 4. Núcleo Supraóptico; 5. Area hipotalámica dorsal; 6. Núcleo dorsomediano; 7. Núcleo ventromediano; 8. Núcleo arcuato; 9. Núcleo supraquiasmático; 10. Area hipotalámica posterior; 11. Cuerpos mamilares; 12. Area Hipotalámica lateral. Moguilevsky y Schiaffini (78).

III. HORMONAS Y FACTORES HIPOTALAMICOS HIPOFISIOTROPOS

(Liberadores e Inhibidores)

Las hormonas hipofisiotropas del Hipotálamo afectan la secreción adenohipofisaria estimulando la liberación y probablemente también la síntesis hormonal; en otros casos, la influencia sobre el proceso de secreción puede ser de tipo inhibitorio.

En estos momentos la existencia de nueve reguladores - hipotalámicos de la pituitaria está razonablemente bien establecido. La nomenclatura de estos compuestos todavía no está aceptada de modo universal. El término original de -- "factores liberadores", fué, en 1968, reemplazado por SCHALLY (28), con el término de "hormonas liberadoras", "releasing - hormones". Por ello nosotros adoptaremos, en este trabajo, la nomenclatura propuesta por REICHLIN (29) que nos parece la más conveniente en el momento actual de nuestros conocimientos. En ella simplemente se aceptan como "releasing hormones" aquéllos compuestos de los que se conoce su estructura química y se han sintetizado, quedando el término de "releasing factors" para los demás.

Los conocimientos sobre estructura química, síntesis y aplicación clínica de las hormonas hipotalámicas son los siguiente:

III.1. HORMONA LIBERADORA DE LA TIROTROFINA (TRH o TRF)

La TSH está regulada por la TRH hipotalámica (30,31,32,351). SCHREIBER y sus colaboradores (33,34) la descubrieron en el 61, aunque estudios anteriores (35,36) indicaban claramente su presencia.

SCHALLY y sus colaboradores (37) aislaron una sustancia, glutámico-histidina-prolina, la cuál más tarde fué confirmada por BURGUS y colaboradores (38) como la TRH.

Su existencia en animales ha podido demostrarse en numerosos estudios (39,40,41,42,43), con el descubrimiento de un RIA específico (45). El estudio de esta hormona es muy difícil ya que es muy lábil a los ácidos y álcalis (44,46). Siendo su vida media de unos 4 minutos (47). Su síntesis al parecer depende del ATP (48).

Actualmente sabemos que la TRH no solamente es una hormona liberadora, sino que estimula la síntesis de TSH (49) y también que es capaz de estimular la liberación de PRL (50,-51,52).

Se ha podido sintetizar un análogo más potente (53) el N³ im-metilderivado, que es 100 veces superior al TRH.

Los estudios en humanos (54,55,56) demuestran que es un potente liberador de TRH y de PRL. Y, que muy posiblemente se podría utilizar en cuadros que cursan con depresión endógena (57,58).

III.2. FACTOR INHIBIDOR DE LA PROLACTINA (PIF)

Las pruebas "In vivo" que demuestran la existencia de un PIF son numerosas (59,60,61,62,63,64,65) y han sido corroboradas con transplantes hipofisarios y secciones hipotalámicas (66,67,68,69,70). Las evidencias más absolutas han sido realizadas en cultivos "In vitro" de células hipofisarias -- (60,61,71,72). Sin embargo su estructura química y síntesis, están por dilucidarse.

III. 3. FACTOR LIBERADOR DE LA PROLACTINA (PRF)

Desde que KRAGT y MEITES (73) observaron que el Hipotálamo de la paloma ejerce un efecto estimulante en la secreción del PRL, se han ido acumulando experiencias (74,75), que hacen pensar que en los mamíferos la secreción de PRL estaría regulada por dos hormonas. En un principio se pensó que la TRH podría ser la hormona estimulante de la PRL, pero hay trabajos que niegan que ésta sea la hormona fisiológica (76).

III. 4. FACTOR LIBERADOR DE LA CORTICOTROFINA (CRF)

Los estudios de SAFRAN y colaboradores (80) y posteriormente los de Guillemin y col (81), demostraron la existencia de la CRF. En un principio se pensó que la CRF podría originarse de la vasopresina o ser la misma substancia (28,82,83,84,85). Sin embargo hoy en día, la diferencia entre vasopresina y CRF está perfectamente aclarada (86,87,88,89).

Los intentos por demostrar la secuencia de aminoácidos de esta hormona (90,91) se han visto seriamente frenados por la existencia de una enzima proteolítica que destruye el CRF (30,399).

III. 5. FACTOR LIBERADOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO GH-RF)

La liberación de la hormona de crecimiento está regulada por el hipotálamo (28,30,82,92,93,94,95,96).

Las pruebas directas que confirman la existencia del GH-RF, han sido realizadas "In vitro", añadiendo extractos purificados de Hipotálamo a pituitarias aisladas (97,98,99,100).-

Estos mismos extractos inyectados en animales (101,102,103) producen un incremento de GH.

Los estudios conducentes a la determinación de la estructura química, están en un grado muy avanzado y se ha propuesto ya una estructura química, la cuál es un decapeptido (104,105,106). Sin embargo, su total confirmación está todavía por dilucidarse.

III. 6. HORMONA INHIBIDORA DE LA SOMATOTROFINA (GIF, Somatostatina).

KRULICH y sus colaboradores (107) fueron los primeros en demostrar la existencia de una hormona Hipotalámica, inhibidora de la Somatotrofina. Cinco años más tarde BRAZEAU y sus colaboradores (108) caracterizaron y sintetizaron este compuesto, que es un tetradecapeptido, y, al cuál ellos lo denominaron "somatostatina". El cuál ha sido localizado en otras áreas del cerebro (322).

Este compuesto además de inhibir GH (109), disminuye la liberación de FSH, insulina, glucagón, gastrina, renina, pepsina, ácido gástrico (110,111,112,113,353).

III. 7. FACTOR INHIBIDOR DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LOS MELANOCITOS (MSH-RIH; MSH-RIF)

Se ha demostrado que la secreción de la MSH, está regulada por un control tónico inhibidor del Hipotálamo (115,116,117).

CELIS y NAIR con sus colaboradores (118,119) han propuesto que el péptido prolil-leucil-glicina-amina es la MSH. Sin

embargo los estudios de BOWER y sus colaboradores se oponen a ellos (121). CELIS y colaboradores (120) piensan que esta -- hormona podría ser producto de la división de la oxitocina.

III. 8. HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA ESTIMULANTE DE LOS MELANOCITOS (MSH-RH; MSH-RF)

Según CELIS y colaboradores (120) de la escisión de la oxitocina, se producirían dos péptidos el uno la MSH-RF y el otro la MSH-RIF.

III. 9. HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH-RH; LH-RF; GN-RH)

A este capítulo he querido darle el verdadero interés - que se merece en el contexto de este trabajo, ya que el suje to de esta Tesis es la Fisiofarmacología y Aplicación Clíni ca de un análogo del LH-RH, el D-Trp⁶-LH-RH. Y, también, -- porque con esta hormona descubierta por Schally y su grupo - en 1971, en estos escasos seis años que nos separan, se ha - dado margen a una gran producción de trabajos que tienen o - pueden tener muchísima importancia desde el punto de vista - médico y veterinario. Por lo tanto creo, que sin ser dema-- siado expresivo para no pecar de exagerado, y tampoco sin te - ner que resumirlo tanto para no pecar de parco, le he dado - a éste tema la extensión que se merece.

III. 9. 1. SITIO DE PRODUCCION DEL LH-RH

Este compuesto se produce en el Hipotálamo (Figs. 2 y 3), zona del cerebro que bordea el tercer ventrículo y se encuen tra por debajo del Tálamo.

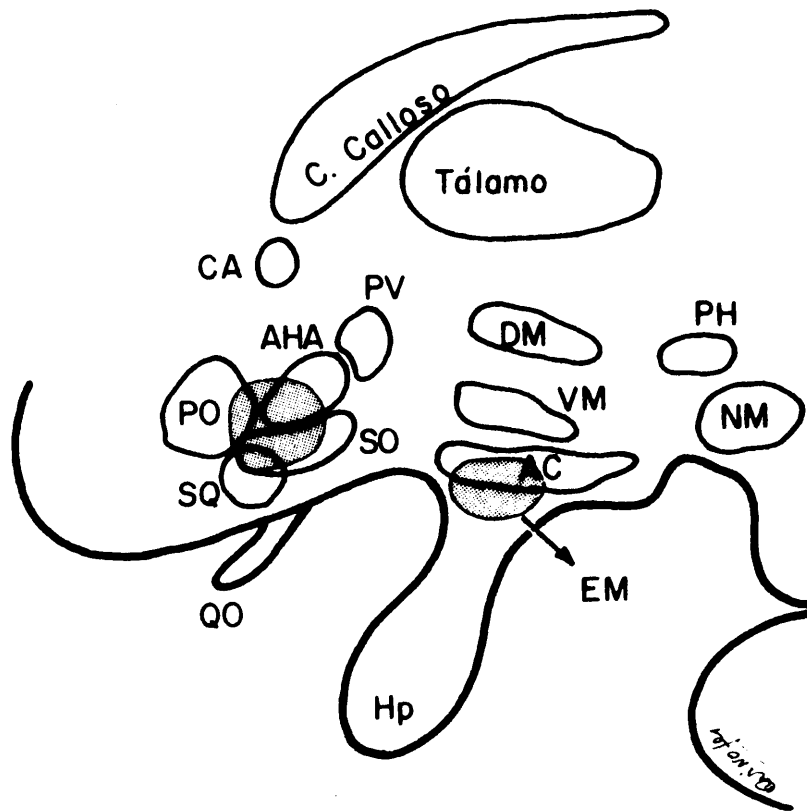


Figura 3.- Zonas relacionadas con la Secreción de LH-RH: CA. comisura anterior; PO. área preóptica; SQ. - área supraquiasmática; AHA. área hipotalámica anterior; SO. núcleo supraóptico; QO. quiasma óptico; PV. núcleo paraventricular; DM. núcleo dorso-mediano; VM. núcleo ventromediano; AC. núcleo arcuato; PH. área hipotalámica posterior; NM. núcleos mamilares; AM. eminencia media; Hp. hipófisis. Moguilevsky y Schiaffini (79).

En los animales se ha podido demostrar que hay dos zonas productoras de LH-RH. Una, ubicada en el hipotálamo anterior (área preóptica, núcleos supraóptico y supraquiasmático) y -- otra en el hipotálamo medio (núcleos arcuato y centromediano) (122,123,124,379) Mientras que el FSH-RH se produce en el núcleo paraventricular y su inmediata periferia (124) (Fig. 3). En este aspecto, una de las experiencias más interesantes y definitivas de que realmente es el núcleo paraventricular el sitio de producción de FSH-RH, es la implantación de cicloheximide (un compuesto que inhibe la síntesis protéica), la cuál localizada en el núcleo paraventricular inhibe exclusivamente la producción de FSH-RH, pero no la de LH-RH (124).

Trabajos muy recientes de WEINER y colaboradores (125), sugieren que el sitio exacto de producción del LH-RH, sería el órgano vasculosum de la lámina terminalis. Por otro lado KALRA y colaboradores (286) deducen de su interesantísimo trabajo que el área pre-óptica es el lugar de mayor producción de LH-RH pero que también el Hipotálamo Medio Basal lo es, -- aunque en cantidades mucho menores.

Los trabajos de WHITE y colaboradores (126) sugieren la posibilidad de que la glándula Pineal sea un sitio excelente de producción de LH-RH, aunque estos trabajos no han podido ser reproducidos exactamente; es decir, que señalando la gran producción de LH-RH (127) han abierto un camino para nuevas investigaciones (como el grupo de WILBER (287), en la que participan tres instituciones), las cuáles concluyen que el LH-RH no solamente se encuentra en el Hipotálamo sino también en -- otras áreas del encéfalo, y en algunos sitios en mayor cantidad que en el mismo Hipotálamo como son el Cerebelo y el Cere

bro medio y en otros sitios en menor cantidad, como son la corteza cerebral y la Pineal.

Por último señalaremos, que el trabajo de GIBBONS y colaboradores (128) demuestra que la placenta "In vitro" es -- también capaz de sintetizar LH-RH.

III. 9. 2. DEMOSTRACION DE LA EXISTENCIA DE UNA HORMONA HIPO- TALAMICA LIBERADORA DE LH Y FSH: AISLAMIENTO, ES- TRUCTURA Y SINTESIS.

HARRIS Y GREEN(1,21) basados en sus estudios anatómicos y fisiológicos, llegaron a la hipótesis de que la Hipófisis era controlada por el Hipotálamo. Su confirmación fué realizada por SCHALLY y su grupo, en una serie de experimentos muy elegantes que culminaron en 1971 con la síntesis del LH-RH (150, 151,152,153,154).

En el quinquenio que va de 1960 a 1965, se demostró la existencia de un material específico neurohumoral capaz de -- producir la estimulación de LH y FSH en estructuras hipotalámicas de ratas, animales domésticos y humanos (9,145,146,147, 148,149).

Por ejemplo IGARASHI y sus colaboradores (9), veían que después de 10 minutos de la inyección IV de extractos ácidos de eminencias medias había un significativo incremento de la FSH en ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (50ug de benzoato de estradiol) y progesterona (25mg), mientras con extractos de corteza cerebral no tuvieron ningún efecto. Además, cuando se inyectaban estas sustancias en ratas hipofisec- tomizadas previamente, no había elevación de FSH en plasma, -

lo cuál demostraba claramente la existencia de un factor FSH-RH en la eminencia media.

Al principio se pensó que habían dos sustancias responsables de la liberación de LH y FSH a las cuáles se les llamó "Factores Liberadores". Sin embargo, trabajos posteriores -- con material hipotalámico de cerdo bastante purificado, demostraban que estas sustancias en animales y humanos tenían una actividad liberadora de LH y FSH (155,156,157).

Posteriormente SCHALLY y sus colaboradores (150,151) empleando dos métodos diferentes de purificación aislaron un - homogeneizado de cerdos que, con dosis tan pequeñas como 0,2 - ug LH-RH/rata, causaba un significativo aumento de LH (150,151, 152) lo cuál fué medido por un radioinmunoensayo específico de LH para rata (158). Cuando se aumentaba la dosis, la elevación de LH duraba entre 20 y 40 minutos. Las dos preparaciones extraídas por los dos métodos anteriores, demostraron tener una idéntica actividad específica (151). Midiendo por métodos biológicos y por RIA (159) la FSH, se demostró que con estas sustancias se obtenía un incremento significativo de FSH. La comprobación de que la LH-RH actúa directamente sobre la Pituitaria se realizó en cultivos de Pituitarias de rata a las que se añadía LH-RH y se medían LH y FSH. Dosis tan pequeñas como 1 nanogramo por mililitro, fueron efectivas (150,151). La inactivación química o enzimática de la LH-RH, se acompañó siempre de una pérdida en la actividad para liberar LH y FSH (150,152, 160,161).

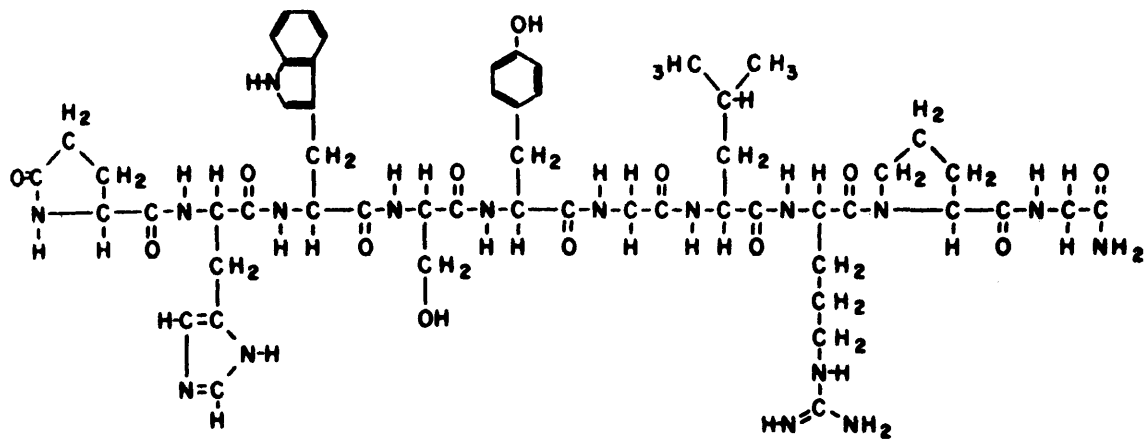
Al mismo tiempo que se realizaron los estudios señalados, químicamente se establecía que la LH-RH, que en un principio -

se le denominó LH-RH/FSH-RH, era un decapeptido, compuesto de 10 aminoácidos y que contenía dos aminoácidos de glicina, uno de histidina, arginina, triptófano, serina, glutámico, prolina, leucina y tirosina (150,151,152). Como resultado de éstas y posteriores investigaciones que se han realizado y se siguen realizando, se ha llegado a la conclusión de que ésta es la única sustancia natural, con capacidad de liberar LH y FSH, lo cuál no quiere decir que pueda existir otra sustancia específica, posiblemente otro decapeptido, que estimule la liberación de FSH. En apoyo de esta teoría existen pruebas anatómicas y fisiológicas (124,162).

La secuencia de los aminoácidos de la LH-RH, fué realizada por un proceso de ultramicroescala, combinando el Edman-Dansyl y acoplado métodos de trititación en carbonos terminales. Estos procedimientos fueron usados directamente después de la digestión con quimitripsina y termolisina y sin separar los fragmentos. Basados en estos resultados se propuso la siguiente secuencia de aminoácidos: (pyro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-amida (152). Posteriormente esta estructura fué confirmada con análisis secuenciales convencionales (153) y por espectroscopía de masa(380) La estructura de la LH-RH se muestra en la Fig. 4.

Inmediatamente después de descubierta la estructura química de la LH-RH, se procedió a su síntesis, la cuál confirmó que la estructura propuesta era la correcta (154,163,164). La síntesis se realizó por el método de fase sólida (165,344).

Se pudo comprobar entonces que las propiedades físico-químicas de la LH-RH natural de cerdo eran exactamente iguales a



pGLU-HIS-TRP-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY-NH₂

Figura 4.- Estructura Química de la LH-RH.

a la sintética y, además, que la secuencia de los aminoácidos - era exactamente esa y no otra. Los Laboratorios Abbot, Hoeschst, Yanaihara, Merck Sharp & Dohme, Ayerst y Sankyo han reproducido la LH-RH propuesta por SCHALLY y sus colaboradores (166). Otras instituciones científicas también han corroborado la realidad - de este descubrimiento (167,168), dentro de las cuales merece - destacarse las del grupo de GUILLEMIN (169), que a los pocos me - ses de la síntesis en hipotálamos de cerdo, comprobó exactamen - te la estructura propuesta en hipotálamos de oveja.

Cabe señalar aquí, a título de curiosidad, que para los prime - ros 200 nanomoles de LH-RH se necesitaron 165.000 hipotálamos - de cerdo (29).

III. 9. 3. BIOSINTESIS DE LA LH-RH

Hasta el momento presente, no disponemos de datos que nos indiquen de una manera feaciente la biosíntesis de la LH-RH. - MOGUILVSKY y sus colaboradores (129) señalan que ciertos frag - mentos de hipotálamos de ratas pueden incorporar tirosina tri - tiada (H^3 -tirosina) dentro de la LH-RH y que su incorporación - aumenta con la castración. Por otro lado JOHANSON y sus colabo - radores (130) afirman que en la fracción que ellos denominan mi - tocondrial, de hipotálamos, puede incorporarse el ácido glutámi - co al cuál previamente se ha marcado con C^{14} dentro del LH-RH. - Lo dicho indica que el esclarecimiento del mecanismo de biosín - tesis del LH-RH está por demostrarse.

III. 9. 4. ESTUDIOS INMUNOLOGICOS DE LA LH-RH

SCHALLY y colaboradores (76,172,265) han demostrado que la LH - RH es capaz de producir anticuerpos y han logrado posteriormen -

te establecer métodos de radioinmunoensayo para LH-RH bastante específicos (173). En conejos en que se han desarrollado anticuerpos anti-LH-RH, se produce posteriormente atrofia gonadal, debido a la neutralización de la LH-RH endógeno por los anticuerpos (174). Además de esto, la administración de antisueros anti-LH-RH en ratas, la mañana del proestro, bloquea la liberación de LH y FSH en la tarde y por tanto se produce la anovulación como lo han demostrado ARIMURA y sus colaboradores (175). Este hecho sugiere que el anticuerpo anti-LH-RH bloquearía no solamente la LH-RH sino también la FSH-RH, y sería otra de las pruebas a favor de que la LH-RH es la liberadora de LH y FSH. Una de las posibles aplicaciones prácticas de este descubrimiento sería el control de la ovulación en la especie humana, evitando por otra parte, la serie de inconvenientes que tienen los otros métodos.

Con los métodos de RIA desarrollados a partir de los estudios inmunológicos se ha podido detectar la elevación de la LH-RH en plasma periférico a mitad del ciclo en mujeres normales (173) también en la tarde del proestro de las ratas (176) y en el estro de la oveja (177, 263, 264).

Por otra parte con la obtención de sueros anti-LH-RH se han podido realizar estudios inmunológicos e inmunohistoquímicos. PELLETIER y sus colaboradores (178), usando el microscopio electrónico, han podido observar que la LH-RH está localizada en los gránulos secretorios de la eminencia media. SETALO y sus colaboradores (179) han visto que en las terminales de las fibras nerviosas de la eminencia media hay una fuerte reacción inmunoreactiva a la LH-RH y también en el área

retro-quiasmática y en el núcleo arcuato, pero en estos dos últimos en cantidad mucho menor. KIZER (180) basado en los estudios inmunológicos e histoquímicos en ratas machos adultos, ha podido demostrar que las neuronas conteniendo LH-RH no son de origen catecolaminérgico.

WINTERS y sus colaboradores (181) han encontrado cantidades significativas en cerebros humanos.

Muy posiblemente este capítulo tan interesante de la inmunología, en los próximos años nos aclaren mecanismos -- que, hoy por hoy, nos son desconocidos. (262,266,337,338).

III. 9.5. METABOLISMO Y VIDA MEDIA DE LA LH-RH

GRIFFITH, KOCH y KUHL con sus colaboradores (131,132,-133) han demostrado muy claramente que los homogenizados de hipotálamos de rata y de cerdo degradan el LH-RH. Según Griffith esto querría decir que las peptidasas hipotalámicas degradan la LH-RH y jugarían un papel muy importante en la regulación de la secreción de esta hormona. Según Kuhl, la enzima L-cistina arilamidasa, que inactiva a la LH-RH, podría ser activada por concentraciones elevadas de LH. Los estudios de Koch identifican como productos de la degradación de la LH-RH a los polipéptidos -Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-NH y probablemente Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂, lo que indica que la disyunción ocurre entre los aminoácidos 6 y 7.

Los estudios preliminares (127) indican que las células del hígado, pituitaria y riñón rápidamente rompen la molécula de LH-RH, y resultados similares se ha obtenido incubando LH-RH en plasma.

Usando un RIA específico y LH-RH marcada se ha podido -
determinar que la vida media de la LH-RH es de 4 a 6 minutos.
La LH-RH tritiada es rápidamente degradada, en sangre (182,358).

III. 9. 6. CARACTERISTICAS QUIMICAS Y BIOLOGICAS DE LA LH-RH

Las características químicas y biológicas de la LH-RH,-
que a continuación citaremos, las hemos tomado fundamental--
mente del trabajo de PAREDES y sus colaboradores (391), y --
son las siguientes:

- Los anillos imidazol de la HIS e indol del TRP son --
los grupos más importantes y determinan la actividad
LH-RH.
- Los grupos (PYRO)-GLU-HIST-TRP no presentan actividad
liberadora de gonadotropinas.
- El remplazo del anillo pirrolinoide con moléculas li-
neales determina que la estructura resultante retenga
actividad LH-RH.
- Al quitar el OH en SER-TYR se determina una actividad
LH-RH entre 50-60% en relación al LH-RH original.
- La desaparición de la ARG, no determina pérdida de ac-
tividad de la molécula.
- Al quitar la LEU-GLY, disminuyen moderadamente en la
actividad LH-RH.
- La pérdida de PRO determina un descenso marcado de la
actividad LH-RH por alteración molecular.
- La desaparición del grupo amido de la GLY mantiene en
un 14% la actividad liberadora de LH y FSH.

III. 9. 7. MECANISMO DE ACCION DE LA LH-RH

Lo que conocemos hasta ahora sobre la forma en que la LH-RH realiza sus acciones en las células hipofisarias, lo debemos fundamentalmente a BERGEAT y sus colaboradores (139) lo cuál, después ha sido ampliamente confirmado por otros estudios (135,136,137,138,140), que indican que el mediador químico de la LH-RH en su acción de liberación tanto de LH como de FSH, es el AMP-cíclico. Hay un estrecho paralelismo entre los controles de AMPc y de las gonadotropinas, dependiendo del tiempo de incubación y de las concentraciones de LH-RH. Al parecer, el Calcio juega un papel muy importante para que se realice la estimulación del LH y FSH por parte de la LH-RH y también para la acumulación y estímulo del AMP-cíclico. (405,407,425).

III. 9. 8. OTROS MATERIALES CON ACTIVIDAD LH-RH

En los años 71, CHANG y sus colaboradores (183) atribuyeron al compuesto (pyro)-Glu-Tyr-Arg-Trp-amida la capacidad LH-RH, sin embargo los estudios de SCHALLY y sus colaboradores, demostraron de una manera clara y extensa que esto no era cierto (150,151,152,153,154,257).

FAWCETT y sus colaboradores (184) comunicaron la separación de una gonadotropina distinta a la LH-RH, basándose estos autores en estudios por métodos biológicos "In vitro", y por RIA de LH y de LH-RH. Sin embargo la actividad biológica e inmunológica de este compuesto tan cercano a la LH-RH no es distinta de la propia LH-RH.

En el momento presente, no existen evidencias suficientes para establecer la existencia de una FSH-RH distinta de la LH-RH. Los estudios fundamentales de SCHALLY y sus colaboradores (185) demuestran que la LH-RH de hipotálamos de cerdo es, fundamentalmente, también FSH-RH y, posiblemente -hipótesis mantenida por Schally- esta substancia sea la única que fisiológicamente tenga capacidad para liberar LH y FSH. Este punto de vista está afianzado en las investigaciones que demuestran que hay un bloqueo de la LH-RH con anticuerpos anti-LH-RH en ratas (175,186) y hamsters (187).

III. 9.9. EFFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES EN LA RESPUESTA A LA LH-RH

La interacción de los esteroides con la LH-RH posiblemente sea quienes regulen de una forma directa la producción de LH y FSH por parte de la Hipófisis. Estos hechos se fundan en numerosos estudios en animales y humanos. Sin embargo la explicación de todos los fenómenos de liberación, así como los de feed-back correspondientes a estas hormonas, todavía no están muy bien establecidos.

III.9.9.1. Efecto de los esteroides sexuales en la respuesta a la LH-RH en animales

La influencia que ejercen los esteroides sexuales, tanto para la estimulación como para la inhibición de la LH y FSH directamente sobre la Hipófisis, está bastante bien esclarecido (188,194,259,260,261). Sin embargo este efecto directo sobre la pituitaria que ejercen las hormonas esteroides sexuales, no indican que sea la hipófisis el único lugar en que actúan.

Los trabajos de SMITH y DAVIDSON (189), implantando esteroides en el Hipotálamo de ratas, sugieren que el "feed-back" - negativo se ejercía en el Hipotálamo, mientras que el efecto positivo de los esteroides se produciría a nivel de la pituitaria. En el mismo trabajo se señala que la dehidrotestosterona (DHT) suprime la LH por efecto directo tanto a nivel hipotálamico como pituitario. JONES y BOYUS (190) administrando en perros estradiol, progesterona y testosterona, 1 hora antes que la LH-RH inhibe la liberación de LH, siendo el estradiol el más potente inhibidor de los tres esteroides. -- Después de 24 horas de la aplicación de estas sustancias, - se restablecieron las respuestas a la LH-RH.

GALLAWAY y colaboradores (191) utilizando cabras han podido demostrar que la testosterona ejerce un efecto bloqueante en la liberación de LH tras el estímulo con LH-RH.

VILCHEZ-MARTINEZ y colaboradores (192,193) han podido - observar en ratas, que los esteroides sexuales ejercen un -- efecto bifásico en la respuesta al LH-RH. Después de la administración de 0.1-0.4 ug de estradiol a ratas, se deja pasar un tiempo de 1 a 6 horas y se inhibe la respuesta de las gonadotropinas. Sin embargo, si se dejan pasar entre 6 y 20 horas, la respuesta a la LH-RH es significativamente superior, por parte de las gonadotropinas, en relación a los controles. Lo cuál indica que hay un efecto positivo por parte de los estrógenos.

Estos resultados también se han encontrado en hembras - ovariectomizadas (127) a las cuales se les ha inyectado estradiol. Si la estimulación con LH-RH era 3 horas después de la

inyección de estradiol, los niveles de LH quedaban deprimidos, mientras que si se realizaban 18 horas después había una mayor estimulación de LH.

En las ratas, la mayor estimulación de LH-RH ocurre en el proestro, y el máximo pico como lo han demostrado AIYER y colaboradores (193) está entre las 17 y 18 horas. También hay una buena respuesta en el estro. La respuesta más baja es en la tarde del diestro I y II teniendo su nadir a las 14 horas (193). La administración de un anti-estrógeno (ICI - 46474) a las 17 horas del diestro reduce la respuesta de la LH-RH inyectado en la tarde del proestro. Esto indica que la fase inicial del incremento de la sensibilidad a la LH-RH depende de la marcada concentración del 17β -estradiol en la fase precedente a la liberación de la LH preovulatoria. En conexión con estos resultados resulta interesante señalar -- que el pico del estradiol es precedente al de LH en ratas (196), monos (198) y en la mujer (197,199,201,202).

Los trabajos que indiquen el posible papel de la testosterona son realmente escasos. (258,395).

En la rata, la testosterona puede ser un estímulo de secreción continua de FSH durante el estro (127). Los niveles de testosterona son mayores en la tarde del proestro durante la liberación de LH preovulatoria. La administración de un antisuero, antitestosterona previene el incremento continuo de FSH durante la mañana del estro. Esto podría indicar que la testosterona ejerce un efecto positivo en la síntesis de la LH-RH a nivel Hipotalámico.

Los estudios "In vitro" (195) con pituitarias aisladas de rata, sugieren que el efecto de la LH-RH estaría modulado por los estrógenos, la progesterona y la testosterona. Y también los estudios "In vivo" (325,371).

III.9.9.2. Efecto de los esteroides sexuales en la respuesta a la LH-RH en humanos

Actualmente podemos afirmar sin ninguna duda que, en el hombre, los esteroides sexuales juegan un papel muy importante en la regulación de la LH-RH (76,142,166,171,172, - 197,199,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,333,336,350). En muchos casos, los esteroides sexuales producen una disminución de la respuesta a la LH-RH (76,166,171,172,197,204,205,- 206,207,208,209,211,212), pero luego se ha descubierto que -- tienen las dos características en el feed-back, estimulatoria e inhibitoria (142,197,201,202,203,204,205,206,208,209,210). -- Los cambios que se producen en los estrógenos a nivel del ovario en el ciclo menstrual son responsables de la diferente respuesta a la LH-RH. NILLIUS y WIDE (201) y YEN y sus colaboradores (142) y, en nuestro laboratorio PEREZ-INFANTE y colaboradores (144) han demostrado que la respuesta mayor a la LH-RH es en la fase peri-ovulatoria. YEN y colaboradores (204) han encontrado un aumento de la respuesta a la LH-RH particularmente cuando se emplean dosis muy pequeñas. La FSH parece ser -- más susceptible de inhibirse por efecto de los estrógenos que la LH. En presencia de dosis elevadas de estrógenos, la respuesta de la FSH disminuye al estímulo con LH-RH.

TAYMOR y colaboradores (197) así como THOMPSON y colaboradores (205) han demostrado que la administración de 25-30

μg de benzoato de estradiol por Kg de peso corporal o de 3-5 mg/Kg de progesterona en mujeres con amenorrea secundaria inhibe la respuesta de la hipófisis a una dosis de 150 μg de LH-RH.

KEYE y JAFFE (206) utilizando una infusión IV de estradiol a 0.05-0.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por hora, en mujeres en el día 2 del ciclo menstrual, al inyectarle 50 μg de LH-RH IV en sólo lo pulso, encuentran una disminución o bloqueo de la respuesta de la LH y un bloqueo de la respuesta de FSH.

SILER y YEN (207) observan que, en mujeres con fallo ovárico, la respuesta a la LH-RH está incrementada, lo que se explicaría puesto que estas mujeres no tienen el feedback esteroideo gonadal.

SHERINS y colaboradores (209) y LEE y colaboradores (211) han demostrado que la testosterona disminuye los niveles basales de LH y FSH, siendo un fenómeno dosis-dependiente.

III. 9. 10. EFFECTOS DE LA LH-RH EN ANIMALES

Las primeras observaciones de SCHALLY y colaboradores (76,150,151,166,172) demostraban que tanto la LH-RH natural como la sintética estimulaban la liberación de LH y FSH en ratas y otra serie de animales. Posteriormente, numerosísimos estudios han confirmado estas primeras observaciones. (216,217,218,219,220,256).

HUMPREY y colaboradores (216) inducen la liberación de LH, y además ovulación, con LH-RH, cuando lo administran a

ratas en proestro tomando clorpromazina, en hamsters en preoestro tomando fenobarbital y en conejos en estro. La respuesta de las ratas a la LH-RH durante el ciclo estral es variable siendo máxima en el proestro y estro (194,217, 218). El incremento de la sensibilidad puede ser debida al incremento de los estrógenos circulantes.

KANEMATSU y colaboradores (219) demuestran que, en conejos, una dosis de 2 µg de LH-RH hace que los niveles de LH se incrementen 250 veces. La ovulación según estos mismos autores podría inducirse con una dosis de 250 µg/LH-RH/kg.

Se ha demostrado que la LH-RH es activa por diferentes rutas de administración. En ratas la LH se eleva, -- cuando el decapeptido se inyecta por vía intracarotídea, subcutánea, intravaginal, intravenosa, intramuscular, por vía oral, aunque por esta última la dosis tiene que ser al menos 100.000 veces superior a la intracarotídea (216).

Otros autores han demostrado que por el líquido cefalorraquídeo (la inyección se realiza en el 3^{er} ventrículo) la LH-RH puede ser transportada a la sangre de la parte hipofisis en cantidades significativas, y, además la LH-RH administrada intraventricularmente estimula y prolonga más la liberación de LH que cuando se da intravenosamente (220). ONDO y colaboradores (221) han demostrado también que la infusión de LH-RH en los vasos portales estimula significativamente la LH.

La FSH, también aumenta significativamente después de la administración de LH-RH, lo que ha sido demostrado "In vivo" e "In vitro" (221,22,223,224).

FERIN y colaboradores (225) estudiando *Macacus Rhesus*, han encontrado que la más alta respuesta a la LH-RH se encuentra a mitad del ciclo menstrual de las monas. Sin embargo otros autores (76,166,172,226) han visto una relativa insensibilidad de la hipófisis en respuesta a la administración de LH-RH, esto, posiblemente debido a problemas de ambientación que sufren estos animales cuando son trasladados fuera de su habitat normal (227).

Numerosas publicaciones demuestran que la LH-RH eleva la LH plasmática en ovejas, cerdos y gatos (127,229,230, -231,228).

SYMONS y colaboradores (229) han observado en ovejas aumento de la LH luego de dosis 100 y 500 µg de LH-RH, por vía IV y subcutánea (SC). Demuestran también que la inyecciones prolongadas o una infusión muy extensa de LH-RH, -- puede disminuir progresivamente la respuesta pituitaria.

SEGERSON y colaboradores (230) demuestran, trabajando en ovejas, que la LH-RH es capaz de inducir al ovulación y además que es posible adelantar el momento de la ovulación.

POMERANZ y colaboradores (231) han demostrado que la respuesta a la LH-RH en cerdos puberales y en cerdos adultos castrados está aumentada.

En terneras utilizando dosis entre 0,25 y 1 mg de LH-RH administradas intracarotídeamente, intramuscularmente o subcutáneamente, se produce un incremento de la LH y FSH, y, además se puede conseguir la ovulación. La mejor respuesta de las gonadotropinas se encuentra el día del estro (127).

MONGKONPUYA y colaboradores (232) han demostrado que después de la castración a los toros, la respuesta de las gonadotropinas a la LH-RH se incrementa.

CUNNINGHAN y FURR y sus colaboradores (233,234) demuestran que la LH-RH, administrada IV a pollos entre los 14 y 20 semanas, incrementó la LH entre los 5 y 10 minutos después de la inyección. Los niveles de la LH retornan a la normalidad después de una hora. En animales intactos, la cantidad de LH liberada depende de la dosis. Demuestran también que una inyección subsiguiente de LH-RH, dos horas después, no altera la respuesta hipofisaria.

En resumen, podríamos decir que los estudios en animales nos llevan a afirmar que la LH-RH no tiene especificidad de especies, lo cuál, lógicamente, abre posibilidades enormes para su utilización y también nos hace pensar que también los otros péptidos hipotalámicos participarían de estas cualidades.

III. 9. 11. DIAGNOSTICO CLINICO CON LA LH-RH EN LA ESPECIE HUMANA

Hasta el momento presente, la ayuda que puede brindar la LH-RH, en la diferenciación exacta entre varios tipos de hipogonadismos no está muy bien precisada. (141,143,318).

Se ha demostrado que en pacientes con Síndrome de Turner y Klinefelter, hay una muy buena respuesta a la LH-RH. Una falta de respuesta a la LH-RH en pacientes con Enfermedad de Sheehan ha sido observada, aunque hay algunos que responden, pero siempre por debajo de los límites normales. Ultimamente se ha visto que en pacientes con hiper-prolactinemia, la respuesta a la LH-RH está disminuída.

En general la FSH responde en mucha menor cantidad que la LH, en individuos normales, excepto en los siguientes casos: fase folicular muy temprana, menopausia, niños, especialmente en los prepuberales. También existen casos patológicos en los que la FSH se eleva mucho más por ejemplo en las azoospermias. Nos interesa en este capítulo revisar los resultados que diferentes autores han obtenido hasta el momento, en mujeres, hombres y niños.

III.9.11.1. Diagnóstico Clínico de la LH-RH en mujeres

Para realizar el test de la LH-RH, la mayor parte de los autores prefieren la vía IV(247)En general no existen diferencias significativas cuando se utiliza la vía IV, IM o SC. Sin embargo RANNEVICK y THORELL (249) señalan que cuando ellos administran 100 ug de LH-RH por vía IM a mujeres amenorreicas, las gonadotropinas se elevan más, y se mantienen durante más tiempo que cuando se les administra vía IV. JEPPSON y colaboradores (250) han demostrado que aplicando 2 mg de LH-RH intranasalmente se estimula la liberación de LH y FSH en mujeres; sin embargo, a dosis de 4 mg, sublingualmente, no se produce dicho efecto.

VAITUKAITIS y colaboradores (235), usan clomifeno y - una dosis de 10 µg de LH-RH en mujeres con amenorrea primaria y secundaria y definen una nueva subclase de amenorrea. Si la respuesta al clomifeno por parte de la LH y FSH es baja y hay diferentes respuestas al LH-RH cualitativa y cuantitativamente, estaríamos en estos casos ante una amenorrea de causa hipotalámica por déficit de producción de LH-RH en dógeno.

Entre nosotros, BOTELLA y CHARRO y sus colaboradores - (251,252) dan también mucha importancia al estudio conjunto de la prueba funcional del clomifeno y de la LH-RH. Posiblemente cuando no hay respuesta al clomifeno y sí al LH-RH, el problema sea de fallo hipotalámico.

GINSBURG y sus colaboradores (236) son otro de los grupos que estudian el Test combinado del Clomifeno y de la LH-RH. Ellos observan que en mujeres con fallo gonadal o con fallo prematuro del ovario, hay una exagerada respuesta de las gonadotropinas a la LH-RH; sin embargo la LH no se incrementa después de la administración de clomifeno. Las pacientes que tienen una respuesta ausente o baja a la LH-RH tampoco responden al clomifeno. En la casuística que presentan, 7 de las 13 mujeres amenorreicas responden al clomifeno. Esta observación les hace pensar que, en las pacientes que respondieron a la LH-RH y no lo hicieron al clomifeno, la causa de la amenorrea con anovulación está a nivel Hipotalámico.

YEN y colaboradores (237) encuentran que, en pacientes anovulatorias, las fluctuaciones episódicas de la LH están

ausentes, y en estos casos, presumiblemente, el diagnóstico sea amenorrea hipotalámica.

PATTON y TAYMOR con sus colaboradores (197,243), encuentran que la respuesta a la LH-RH en pacientes con amenorrea hipotalámica es normal.

Las mujeres con fallo primitivamente ovárico tienen incrementada tanto la LH como la FSH al estímulo con LH-RH. - Los primeros estudios en pacientes con Síndrome de Turner ya lo indicaban (171,172). Luego MORTIMER y colaboradores (246) y DONALD y colaboradores (244) han comunicado que los pacientes con hipogonadismo primario tienen una respuesta muy marcada de FSH en comparación con sujetos normales.

Los pacientes con anorexia nervosa muestran una pobre respuesta de la LH tras el estímulo con LH-RH (238,239,240). La causa de que no exista una buena respuesta de la LH podría deberse a una prolongada deficiencia de la LH-RH, lo cuál a su vez condicionaría una falta de respuesta pituitaria. La causa original de este síndrome no está perfectamente definida.

VANDERKERCKHOVEN y sus colaboradores (238), sugieren -- que el Test de la LH-RH podría ser de utilidad para distinguir entre casos de amenorrea psicótica leve, (en los cuales la respuesta cualitativa a la LH-RH es completamente parecida a la de la mujer normal), de los casos de amenorrea por anorexia nervosa, en que la respuesta de la LH está bastante reducida.

WARREN y sus colaboradores (241) han visto que en mujeres que tienen una severa pérdida de peso, la respuesta a la LH-RH está bastante disminuída. Las pacientes con amenorrea secundaria que además habían perdido peso por dietas impuestas por ellas mismas, se hicieron refractarias a la LH-RH; sin embargo en el momento en que aumentan de peso la respuesta se normaliza.

Trabajos de AONO y su grupo (242), y más recientemente de CHARRO y colaboradores (253), demuestran que en el Síndrome de Sheehan o hipopituitarismo, la mayoría de las pacientes no responden a la LH-RH y de aquellas que lo hacen, la respuesta es bastante baja.

En mujeres con ovarios poliústicos típicos, se muestran unos niveles elevados de LH y una respuesta exagerada de la misma a la LH-RH mientras que la respuesta de FSH es baja (197,243).

MORTIMER y colaboradores (246), realizaron una prueba con 100 ug de LH-RH IV, en 155 pacientes con gran variedad de enfermedades en el eje Hipotálamo-hipofisario-gonadal. 137 de estas pacientes, o sea el 88%, eran hipogonadales. A mi juicio, el punto crítico de este estudio fué demostrar que la LH-RH es incapaz de distinguir entre hipogonadismos de causa hipotalámica e hipogonadismos de causa pituitaria.

KELLER y otros (245) han desarrollado el "Índice de Gonadotropinas Hipofisarias Humanas" (HPGI: "human pituitary gonadotropin index"), al observar la respuesta de LH y FSH y ¹⁷₃ - estradiol en 339 mujeres amenorreicas y 74 pacientes -

voluntarias normales. Realizaron el test con 25 µg de LH-RH ya que con estas dosis ven un incremento significativo de LH y FSH en mujeres normales. Sus observaciones le llevan a sugerir que este HPGI puede ser de utilidad en las amenorreas funcionales - antes, durante y después de una terapia. Este índice asociado con el Clomifeno puede dar una información más adecuada para la posible diferenciación entre la disfunción hipotalámica y la hipofisaria.

KATZ y CARR (248), observan la respuesta de los esteroides gonadales, especialmente estrógenos, después de la administración de la LH-RH. En mujeres con amenorrea hipotalámica, después de la administración de la LH-RH aumentan los niveles de estrógenos, mientras que en los pacientes que adolecen de un problema ovárico este fenómeno no sucede así.

Resumen lo expuesto podríamos decir:

- 1.- El fallo ovárico, se caracteriza por tener niveles elevados de LH y FSH basales, acompañados de una exagerada respuesta al LH-RH.
- 2.- El síndrome típico del ovario poliquístico, se caracteriza por presentar niveles altos de LH y bajos de FSH, acompañados de una respuesta elevada de LH y baja de FSH, tras el estímulo con LH-RH.
- 3.- Ausencia o disminución de la respuesta del LH tras LH-RH - nos podría indicar:
 - Fallo Hipotalámico
 - Amenorrea hipotalámica por anorexia nervosa y/o pérdida exagerada de peso.

4.- En una amenorrea primaria podermos tener:

- Ausencia de respuesta al LH-RH, lo que nos indicaría lesión hipofisaria.
- Respuesta normal o deficiente: patología hipotalámica
- Respuesta exagerada: disgenesia gonadal

5.- Combinando el LH-RH y el Clomifeno podríamos acercarnos -- con mayor seguridad al diagnóstico de la lesión. Si la alteración es a nivel hipotalámico, no hay respuesta al clomifeno pero hay una respuesta al LH-RH.

6.- El ver la respuesta de los esteroides sexuales, también -- nos ayudaría a diferenciar si la causa es Hipotalámica u ovárica. Si al dar LH-RH los esteroides sexuales aumentan, la lesión posiblemente es de causa hipotalámica.

III.9.11.2. Diagnóstico Clínico del LH-RH en hombres

GONZALEZ-BARCENA y sus colaboradores (254) administrando LH-RH a hombres normales por diferentes vías encuentran que la máxima respuesta para LH y FSH se produce cuando administran 250 µg en infusión IV continua durante 4 horas. Encontrando un doble pulso que BREMMER (255) nuevamente lo ha visto en un trabajo más reciente.

Una sola inyección de 100 µg de LH-RH dada por vía IV, IM o SC libera prácticamente las mismas cantidades de LH y FSH con tiempos similares independientemente de la vía de administración. Esto fué confirmado por MORTIMER (267) que observó también liberación pulsátil asincrónica de LH y FSH, después de la administración de LH-RH. La administración intranasal de 2 mg de LH-RH es menos efectiva que la parenteral (267,268, 269,170) aunque las estimaciones de la absorción por ruta in-

tranasal varían desde solo 1,25% a un 2% de la dosis. Esta vía puede tener una aplicación práctica enorme en el futuro. (373).- Varios investigadores han encontrado aumentos de la testosterona plasmática en algunos jóvenes tras LH-RH (271,272,278). -- SCHWARSTEIN y sus colbaradores (271) han podido demostrar que con una dosis de 50 µg de LH-RH, la LH, FSH y T, sufren variaciones a diferentes horas del día en hombres normales. La máxima respuesta la obtuvieron a las 6 y 18 horas del día.

El uso diagnóstico de la LH-RH tiene problemas similares a aquellos discutidos en el caso de las mujeres. El valor del -- Test de la LH-RH para diagnosticar las enfermedades hipotalámicas y las pituitarias, en el caso de los hipogonadismos masculinos, no está todavía aclarado (246). Sin embargo es posible que con el uso de pequeñas dosis del orden de 25 µg para el test de la LH-RH (277) se pudiesen agudizar mejor estas diferenciaciones. Si a esto se le añade el test del clomifeno, el diagnóstico puede completarse perfectamente. Los hombres que no responden al Clomifeno pero que tienen una respuesta buena al LH-RH, casi con seguridad tienen una lesión de origen hipotalámico o de una estructura superior (275,276,277).

Las medidas de la respuesta de T, a la LH-RH pueden ofrecer también información mayor para el diagnóstico (278). Aun-- que una de las comunicaciones indicaba la gran heterogeneidad de la respuesta de las gonadotropinas a la LH-RH en el hipogonadismo hipogonadotrópico (273), hay otros estudios que han encontrado que la mayoría de los pacientes (274) o todos los pacientes (275) afectados, respondían, especialmente después de inyecciones repetidas de LH-RH (134). Hombres con aplasia germinal que tienen niveles basales de LH y FSH más altos, muestran una

mayor respuesta a la LH-RH, cuando se comparan a los controles (280). Los hombres con oligospermias también responden al estímulo con LH-RH (177,277). Scharztein ha encontrado que en los hombres oligospermicos normogonadotrópicos la respuesta de la FSH era normal, pero la de la LH, era menor que los controles y los niveles de T subían más despacio que en los normales. Sin embargo FRANCHIMONT y sus colaboradores han hallado que en pacientes oligospermicos idiopáticos y azoospermicos, la LH-RH ocasionalmente causa una elevación exagerada en la FSH plasmático, indicando una mayor reserva pituitaria de FSH, que en los normales. (285).

En resumen, el Test de la LH-RH, para el uso diagnóstico en hombres todavía no está bien estudiado, y sin embargo en combinación con la prueba del clomifeno puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de los hipogonadismos de causa hipotálamica o pituitaria.

III.9.11.3. Diagnóstico Clínico de la LH-RH en niños

KASTIN, SCHALLY y colaboradores (288) en el año de 1971, vieron que en sujetos prepuberales la LH-RH era capaz de inducir la liberación de LH y FSH, con posterioridad a este estudio, muchos autores se han dedicado a investigar la liberación de gonadotropinas en relación con la pubertad (199,281,282,283, 284,285,286). ROTH y sus colaboradores (281) observan una liberación sorprendente de LH, después de la inyección de la LH-RH en la pubertad; pero con los niños prepuberales la respuesta es mínima. También han observado que la respuesta de la T, es diferente tras del estímulo con LH-RH; los hombres adultos responden mucho mejor que los varones prepuberales y la respuesta más pequeña se encuentra en niños prepuberales (282).

JOB y colaboradores (283) describen una elevación altamente significativa de los niveles de la LH plasmática en niños - de ambos sexos y una mayor liberación de FSH, en niñas como -- respuesta a la LH-RH.

FRANCHIMONT y sus colaboradores (199) encontraron más tarde que, después de instaurada la pubertad, el cociente FSH/LH está invertido, y que el aumento de LH es mayor que el de FSH, en respuesta a la administración de 25 µg de LH-RH.

En un estudio de BERMUDEZ y colaboradores (289), la LH-RH fué administrada a niños prepuberales y hombres adultos en una infusión IV de 4 horas de duración con una dosis de 100 µg/m² de superficie corporal. Los niveles plasmáticos de LH, FSH y T y androstenediona fueron medidos por RIA. Se encontraron -- con que la liberación de LH era mayor que la de FSH en los adultos, después de la administración de LH-RH, con un ligero incremento de la T plasmática.

La interpretación exacta de los datos depende de si los resultados son expresados en cantidades absolutas: mIU/ml, como un incremento máximo porcentual (Δ Mx%) o como cantidad total de hormona liberada. Pero, independientemente de la manera de expresar los datos, éstos apoyan la idea original (288) de que tanto los niños como los adultos liberan gonadotropinas, en -- respuesta a la LH-RH.

JOB y colaboradores (281) propusieron el uso de la LH-RH para la evaluación de la reserva hipofisaria de gonadotropinas en pacientes prepuberales con varios desórdenes hipotalámicos,

pituitarios o gonadales. Posteriormente mostraron (282) que - en niños hipopituitarios la hipófisis no respondía a la LH-RH y que los niños con hipogonadismos-hipofonadotrópicos respon-- dían menos que los controles normales prepuberales.

El test de la LH-RH podría tener utilidad para demostrar una deficiencia hipotalámica y/o pituitaria antes del tiempo - fisiológico de la pubertad(284). Los pacientes agonadales con 12 años o más mostraban respuestas elevadas al LH-RH, pero los niños agonadales con 11 años o menos mostraban un incremento menor, lo que sugiere que los esteroides sexuales pueden no in- fluir en los cambios de la regulación de la LH y FSH, que ocu- rren al principio de la adolescencia (285). ILLIG y sus cola- boradores (358) sugieren que en la pubertad el Test de la LH- RH, puede ser útil en el diagnóstico para distinguir entre un fallo gonadal primario y pituitario primario; los niños con fa- llo testicular muestran una elevada respuesta a la LH-RH y los que tienen hipopituitarismo idiopático, respuestas disminuídas.

III.9.12. Estudios y respuesta a la LH-RH en varias enfermeda- des endocrinas: Acromegalia, Cushing y en pacientes tratados con glucocorticoides

En uno de los primeros trabajos sobre el efecto de la LH- RH en acromegálicos (166) se vió que, en tres pacientes con es- te síndrome, la respuesta a la LH-RH y TRH fué diferente. Uno de los pacientes, tras el estímulo con LH-RH, liberó LH; pero luego de la TRH no hubo liberación de TSH. El segundo pacien- te, con acromegalia activa, liberó TSH, en respuesta a la LH- RH y TRH, respectivamente. En algunos pacientes con acromega- lia se ha visto la respuesta a la LH-RH con una liberación de

hormona de crecimiento y también de LH y FSH (335,290). Esto quizás podría indicar que en esta enfermedad los receptores - de la membrana de las células hipofisarias están afectadas y han perdido su especificidad para cada una de las hormonas liberadoras. Hasta el momento presente no se ha investigado la respuesta de la LH-RH en niños recibiendo hormona de crecimiento.

En la enfermedad de Cushing, BOCCUZZI y sus colaboradores (214) piensan que la depresión de la respuesta a la administración de LH-RH, se podría deber a los niveles elevados de cortisol. Entre nosotros, CHARRO y colaboradores (253) han visto - que en pacientes tratados crónicamente con hidrocortisona, no hay variaciones significativas de la LH y la FSH en respuesta al LH-RH. Tampoco con la administración aguda de 250 µg IV en 2 horas. Sin embargo, estos autores, han demostrado que la administración de ACTH, produce una significativa disminución de la respuesta de la LH y FSH. Estos resultados les llevan a -- pensar que la respuesta disminuída en el Cushing no se deba a un exceso de cortisol, ya que en sujetos tratados aguda o crónicamente con dosis elevadas de hidrocortisona la respuesta al LH-RH no se modifica. Por lo tanto, piensan ellos, que posiblemente los andrógenos producidos por la estimulación con ACTH son los que frenarían la respuesta al LH-RH. Sin embargo, este punto está todavía muy discutido y merece profundizarse en él, ya que por ejemplo, SAKAKURA y sus colaboradores (213), tratando con prednisona durante $1^{1/2}$ meses, encuentra una disminución de la respuesta al LH-RH. Otros aspectos en Patología se amplían en diversos estudios.(215,303,376).

III. 9. 13. USO TERAPEUTICO DE LA LH-RH

III.9.13.1. Uso terapéutico de la LH-RH en mujeres

Los estudios de SCHALLY y sus colaboradores (76,166,172), KASTIN (171), ZARATE (296), han demostrado que la LH-RH puede liberar suficiente cantidad de gonadotropinas para inducir un crecimiento folicular adecuado con maduración y luego ovulación. Este hecho ha sido confirmado posteriormente por varios autores, (297,375,386,390,294,360,363,400,414).

Al menos tres grupos de investigadores han intentado el uso combinado de la LH-RH con Clomifeno y/o Pergonal (297,298,375,386). NAKANO y sus colaboradores (297,386), han encontrado que con el uso de la LH-RH son capaces de inducir ovulación y embarazo, en mujeres anovulatorias normales después de la inseminación artificial, y en pacientes anovulatorias con o sin pretratamiento con clomifeno. Aunque 10 de las 31 pacientes con ciclos anovulatorios o amenorrea secundaria aparentemente ovularon, solamente dos concibieron. KELLER y sus colaboradores (375) también han sugerido que lo mejor es un pretratamiento con clomifeno o HMG (Pergonal) para inducir la ovulación -- más tempranamente que con el uso del LH-RH sólo.

Es también de interés señalar que la administración de LH-RH, como lo han demostrado ZAÑARTU y sus colaboradores (434), puede producir ovulación en mujeres anovulatorias por causas iatrogénicas debidas a tratamientos prolongados con depo-Progevera o acetado de depo-clormadinona. Dos de 16 mujeres ovularon, y, en tres se encontraron folículos preovulatorios. Sin embargo, sobre el total, el porcentaje de ovulaciones inducidas por el LH-RH, era bajo y nuestro conocimiento actual, sobre el uso de esta hormona para terapia en la infertilidad femenina es inadecuado.

El tema de la inducción de la ovulación ha sido escuetamente revisado por LUNFELD e INSLER (438). Ellos concluyen que el esquema óptimo de la terapia con esta hormona (LH-RH) es insuficiente. Sin embargo, se puntualiza una adecuada información sobre los esquemas de tratamiento, dosis de LH-RH, etc. La LH-RH, en su opinión la cuál compartimos, podría resultar el agente de elección en el tratamiento de las amenorreas hipotalámicas.

Otro aspecto a destacar es que la administración repetida (o una sola, ocasionalmente) de esta hormona, presumiblemente, puede reestablecer la respuesta a la LH-RH en casos de amenorrea primaria (433) de anorexia nervosa, deficiencia aislada de gonadotropinas y varias lesiones orgánicas hipotálamo-hipofisarias-incluyendo los craneofaringiomas (134). COMARU y sus colaboradores (331) han observado al restablecimiento de ciclos menstruales normales en mujeres que sufrían amenorrea secundaria después de un sólo tratamiento con LH-RH.

III.9.13.2. Uso terapéutico de la LH-RH en hombres

El estudio de los diferentes trabajos sobre este tema, nos hace ver que la LH-RH es un agente terapéutico útil también en los hombres.

En pacientes masculinos con hipogonadismo-hipogonadotrópico, el tratamiento prolongado con 500 µg de LH-RH tres veces al día da como resultado una iniciación y mantenimiento de la secreción de LH y FSH, existiendo una elevación de la testosterona plasmática y restauración de la potencia, así como una inducción de la espermatogénesis (291). YASHIMOTO y colaboradores (134), dieron a conocer la restauración de la respuesta a la LH-RH en hombres -

con deficiencia aislada de gonadotropinas y lesiones hipotálamo-hipofisarias. BESSER (420) también ha encontrado que, en pacientes con craneofaringioma, la administración repetida de LH-RH, puede restaurar la respuesta pituitaria. MEDEIROS-NETO y colaboradores (292) en 1973 describían que la infusión prolongada de LH-RH a dos hermanos con deficiencias múltiples de hormona trófica y enanismo, restauraba la respuesta de gonadotropinas al estímulo con 200 µg de LH-RH.

Actualmente sabemos, que la ausencia de respuesta a una sola inyección de LH-RH, puede ser el resultado de una privación crónica de LH-RH, debida a desórdenes hipotalámicos en estos pacientes (292). Estudios posteriores, que ya hemos discutido, así como también los realizados en mujeres (134,171,291,331,433) han demostrado que el LH-RH puede restaurar la síntesis y secreción de la LH y FSH y en algunos casos restablecer una función normal hipotálamo-hipofisaria-gonadal.

El estudio de SCHWARSTEIN y colaboradores (299) sugiere que el tratamiento prolongado con LH-RH (500 µg/día) aumenta las cantidades de esperma a niveles normales y puede establecer una fertilidad normal en algunos hombres oligospermicos. Estos estudios están siendo confirmados y extendiéndose al uso de análogos de larga acción. Los resultados preliminares de un aumento de la libido y potencia en los hombres (291,299) por el LH-RH son interesantes, especialmente cuando esto ocurre antes de que la T haya alcanzado niveles normales. Estas observaciones están de acuerdo con experiencias realizadas en animales (255,309) que sugieren un efecto central del LH-RH.

El problema de la formación de anticuerpos con el uso prolongado de LH-RH y sus análogos, no ha sido adecuadamente investigado. El tratamiento en hombres normales con 250 µg de LH-RH de 2 a 7 días no produce formación de anticuerpos (408). Sin embargo un paciente con hipogonadismo-hipogonadotrópico, tratado varios meses con LH-RH, para curarle la impotencia, respondió al LH-RH y fueron detectados en su suero anticuerpos anti-LH-RH. Este es el único caso estudiado en el que se haya producido anticuerpos, por lo cuál nosotros pensamos que el uso -- prolongado, sobre todo en niños debe ser cuidadoso.

III. 9. 14. ANALOGOS CON POTENCIA SUPERIOR A LA LH-RH

III.9.14.1. INTRODUCCION

Con posterioridad al descubrimiento de la LH-RH, la mayor parte de los investigadores se han convencido de que es necesario encontrar análogos con una potencia superior a la LH-RH. Esto ha determinado que aparezcan multitud de trabajos (76,166, - 172,300,301,302,305,306,307,312,313,328,329,330,339,340,341,342, 345,410,423) de análogos superactivos y con mayor potencia biológica que la LH-RH, que tiene una vida muy corta. (165,321,357).

Las bases iniciales para la síntesis de estos compuestos, fueron los estudios entre estructura química y actividad biológica (77,166,172). Parece ser que el ácido piroglutámico, la histidina y el triptófano juegan un papel funcional en la actividad biológica del LH-RH y simples sustituciones o deleciones en estas posiciones, disminuyen o suprimen la actividad del LH-RH. Se ha visto también que la sustitución de estos aminoácidos por estructuras semejantes, o su aromatización o la formación -

de puentes de hidrógeno o el cambio de orientación condicionan cambios en la actividad. Así tenemos que el D-piroGlu¹-LH-RH tiene un 8% de actividad LH-RH; el Trp²-LH-RH un 40%; el (-pirazolil-3-alanina)²-LH-RH un 19%; el D-His²-LH-RH un 10%; el 2-naftil-Ala³-LH-RH un 52% y el penta-metil-fenil-Ala³-LH-RH de un 34 a un 70% de actividad LH-RH. Las posiciones 2 y 3 son también sustituidas y en general han producido análogos inhibidores. Sin embargo el tripeptido piro-glutámico-His-Trp o su amida son inactivos (76). Las sustituciones en las posiciones 4 y 10 han demostrado que producen análogos bastante activos, y, en el caso de las posiciones 6 y 10, se producen péptidos superactivos (300,305,306,307,313,328,329,339,340,341,423).

Entre los análogos del LH-RH con sustituciones en las posiciones 4,5,7 y 8 que poseen una relativa mayor actividad que la LH-RH, están: la Ala⁴-LH-RH con un 9%; la Treo⁴-LH-RH un 19%; la Phe⁵-LH-RH un 64%; la Val⁷-LH-RH de un 16 a un 35%; la Ile⁷-LH-RH de un 33-44% y la Lys⁸-LH-RH de un 11 a 28%. No han sido sintetizados muchos análogos con sustituciones en la posición 9, pero la Ala⁹-LH-RH, sólo tiene 1% de actividad.

III.9.14.2. Estudios básicos con análogos superactivos

Algunos análogos con sustituciones en 6, en 10 o en ambos son más potentes que la LH-RH y poseen una actividad más prolongada (300,305,306,307,313,328,329,340,341,423).

El primer análogo superactivo de la LH-RH, el des-Gly¹⁰-LH-RH etilamida, fué sintetizado por FUJINO y sus colaboradores (341). En unas 3 a 5 veces más potente que la LH-RH (341,423) y también parece tener una actividad más prolongada (307,423).

Otros análogos modificando el carbono terminal, tienen también una actividad considerable, y la des-Gly¹⁰-LH-RH-propilamida es de 2 a 5 veces más activa mientras que la des-Gly¹⁰-2,2,2-trifluoroetilamida-LH-RH es 9 veces más activa que la LH-RH -- (307,341).

MONAHAN y sus colaboradores (432) fueron los primeros en demostrar que la D-Ala⁶-LH-RH, era mucho más potente que la LH-RH. La actividad de este análogo es de 6 a 7 veces superior a la de la LH-RH (329,339). Más tarde VILCHEZ-MARTINEZ y colaboradores sintetizaron la D-Leu⁶-LH-RH que tenía una actividad 5 a 9 veces superior (431) y posteriormente COY y colaboradores -- (328) descubren otros análogos, haciendo sustituciones en posición 6 con D-aminoácidos, con capacidad superior al LH-RH, uno de los cuales es el D-Trp⁶-LH-RH, sujeto de esta tesis, y, del cuál hablaremos detenidamente, más adelante.

Algunos péptidos, sintetizados por el grupo de SCHALLY -- (313,329,431) y el grupo de FUJINO (306,340,439) incorporaron cambios en las posiciones 6 y 10. Estas combinaciones producen análogos 30 a 60 veces más potentes que el LH-RH. Así se ha visto, por ejemplo, que la D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH-etilamida (EA) era de 30 a 40 veces más potente que la LH-RH en la liberación de la LH, cuando se inyectaba a ratas machos inmaduras, usando los niveles integrados de LH por espacio de 6 horas (313,431).-- Siguiendo la misma metódica se comprobó que la potencia de liberación de FSH era 15 veces mayor que la de la LH-RH; la actividad de inducción de la ovulación de este análogo en ratas se estima que fué de 50 a 80 veces más alta que la LH-RH (339,340).

Después de una inyección subcutánea en ratas machos inmaduras, la D-Leu-des-Gly¹⁰-LH-RH-EA liberada 53 veces más LH y 15 veces más FSH que la LH-RH, por un período de al menos 6 horas (440). FUJINO y colaboradores (340) encontraron que la actividad ovulatoria de este compuesto en ratas era 70 a 80 veces más que la de la LH-RH, pero, sorprendentemente, la liberación "In vitro" de FSH y LH sólo era de unas 200 a 400% de la de la LH-RH. La D-Ala⁶-Des-Gly¹⁰-LH-RH-(EA) y la D-Leu⁶-des-Gly¹⁰-LH-RH-(EA) producen también una prolongada liberación de LH y FSH - de 6 a 10 horas - en ratas, cuando se administra -- oralmente o intravaginalmente (300,305,306), aunque la dosis - necesarias para la vía oral eran 1000 veces superiores y para la vía vaginal 100 veces superiores a la elevación comparable por vía subcutánea. "In vitro" las actividades liberadoras de LH y FSH de la D-Leu⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), de la D-Phe⁶-LH-RH-9-(EA), de la D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA) y del D-Trp⁶-LH-RH-(EA), usando células de pituitaria anterior, en cultivos de una sola línea celular (clona), fueron respectivamente: 3000,1500,3000 y 1500 % de la de la LH-RH (330).

Tanto la D-Leu⁶- como la D-Ala⁶-(EA), se probaron en inyección IM en ovejas (300), siendo la primera 50 y la segunda 42 - veces más potente que la LH-RH. La Des-Gly¹⁰-LH-RH(EA) fué también valorada en ovejas en anestro, en las cuales liberaba más LH e inducía más constantemente la ovulación que dosis comparables de LH-RH.

El incremento de la actividad biológica de los análogos superactivos del LH-RH con sustituciones en las posiciones 6 y 10 se atribuyó en principio a una mayor unión de los receptores pituitarios, a una inactivación más lenta o a una combinación de

los dos factores (77,341). Se ha podido comprobar que la D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH(EA) se rompe menos rápidamente por las enzimas cerebrales que la LH-RH, y ésto posiblemente se deba a las mencionadas sustituciones en 6 y 10.

MONAHAN y colaboradores (439) sugirieron inicialmente que la mayor actividad de la D-Ala⁶-LH-RH puede ser explicada por -- cambios de configuración espacial de este análogo, creando una -- mayor afinidad a los receptores pituitarios que con el LH-RH. -- Sin embargo trabajos posteriores del mismo grupo, mostraron que la actividad de la D-Ala⁶-N-Me-Leu⁷-LH-RH en la cuál el -aminohidrógeno está reemplazado por un grupo metilo (Me: metilo), es la misma que la D-Ala⁶-LH-RH, ya que este compuesto puede formar un puente de hidrógeno entre la leucina y la serina, que pensaron -- podría ser el estabilizador de la molécula; por lo tanto la hipótesis de que un cambio de estereoisomería configuracional daría más o menos afinidad ha quedado casi descartada. Los estudios -- de COY y sus colaboradores (328) demuestran que la N-metil-D-Ala⁶-LH-RH es 70 veces más activa que la D-Ala⁶-LH-RH, lo cuál nos -- sugiere que algo referido a la unión con el receptor puede explicar la actividad biológica aumentada de los análogos con sustituciones en posición 6, con D-aminoácidos. El carácter hidrofóbico (lipídico) de la cadena lateral del aminoácido en posición 6 y también su tamaño y aromaticidad, pueden contribuir también a darle dicha actividad. Se ha encontrado también que la introducción de grupos butil-terciarios, dentro de las cadenas laterales en posiciones 6 y 7 aumentan la actividad biológica de la LH-RH. Por lo tanto, el D-Ser-(bu^t)⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), podría ser -- tan activo o más que el D-Leu⁶-desGly-LH-RH-(EA).

Hay un paralelismo entre actividad biológica de los análogos de la LH-RH y su habilidad de estimular la acumulación "In-vitro" del 3^1-5^1 AMPc pituitario. Esto añade más información al papel del AMPc como mediador de la reacción de la LH-RH.

En conclusión podemos decir que está claro que muchos análogos poseen la propiedad deseable de liberar de forma prolongada y aumentada la LH y FSH y esto les hace más interesantes desde el punto de vista terapéutico clínico que la propia LH-RH. Existe además la posibilidad de prolongar estos efectos, con productos depot adecuados, u acoplando la molécula del análogo con un polímero adecuado. Por ejemplo se han comprobado que el D-Lys⁶-LH-RH, unido al poliglutamato sódico, tuvo una actividad biológica mucho más prolongada (312).

III.9.14.3. Estudios Clínicos

Siendo los análogos superactivos de larga acción más apreciados clínicamente que la propia LH-RH en situaciones en las que se requiere una prolongada elevación de la LH y de la FSH, como por ejemplo para la ovulación o para el tratamiento de las oligospermias, vamos a preocuparnos en las siguientes líneas de describir la experiencia acumulada en la clínica humana.

El primer análogo que se estudió fué el desGly¹⁰-LH-RH. -- KASTIN y NAKANO y sus colaboradores (369,388), vieron que este análogo poseía una actividad dos veces superior a la LH-RH en hombres normales y además el pico máximo de la LH se alcanzaba más tardíamente que con la LH-RH. Otro análogo, el D-Ala⁻desGly¹⁰-LH-RH-(EA), en dosis de 25 µg IV, eleva los niveles de LH y FSH en sangre periférica de hombres normales, durante más de cuatro

horas, en contraste con un efecto mucho más débil y banal de la LH-RH (370). Otros estudios han demostrado que este compuesto es activo por diferentes vías (IV, IM y SC), y que dosis tan bajas como 2,5 µg son capaces de liberar LH y FSH, en hombres normales (421). En estos mismos trabajos se ha determinado en base a estudios matemáticos que la capacidad del análogo en liberar gonadotropinas es 10 a 20 veces superior a la LH-RH.

En mujeres se ha podido demostrar que el D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), tiene una potencia superior a la LH-RH, 9 veces mayor para liberar LH y 5 para FSH (402). En este mismo estudio se pudo comprobar que una dosis única de 100 µg por vía IV fué capaz de mantener los niveles elevados de LH, en 4 de cinco mujeres y los de FSH en las 5. Cuando se ensayó Clínicamente este compuesto en mujeres amenorreicas (422), se pudo comprobar que la administración repetida IM de dosis entre 150 y 1500 µg tres veces por semana durante 3 semanas, producía una elevación de LH y FSH plasmáticos y condicionaba ciclos normales en el 40% de las mujeres tratadas. No se produjo ningún efecto colateral o secundario detectable y, además no se agotó la producción de gonadotropinas pituitarias.

Estudios clínicos muy extensos con el D-Leu⁶-desGly¹⁰-LH-RH están realizándose. Este análogo eleva los niveles plasmáticos de la LH y FSH en hombres normales cuando se administra por vía IV (en un sólo pulso o en infusión continua), SC e IM, en dosis de 20 a 500 µg. Las elevaciones de los niveles de gonadotropinas duran más de 24 horas en el caso de utilizar dosis elevadas. No se ha podido comprobar un agotamiento hipofisario de la producción de las gonadotropinas en hombres normales, después de 48 horas de una infusión IV de 500 µg de este análogo. Los hom-

bres normales también responden a la administración de 10 mg -pero no de 2 mg- de este análogo con una elevación de los niveles plasmáticos de LH y FSH (421). Aunque esta vía de administración es útil terapéuticamente, las dosis requeridas son 1000 veces mayores que las que se necesita por vía IV. Se ha ensayado también en hombres normales la vía intranasal, con dosis de 800 µg, comprobándose que por esta vía también es activo. En mujeres normales este análogo también es muy efectivo cuando se da intravaginalmente en forma de supositorios de carbowax, pero la actividad disminuye cuando se da por vía rectal, en dosis de 2 mg.

En mujeres amenorreicas el D-Leu⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), administrado IM eleva los niveles plasmáticos de LH y FSH, por un tiempo mayor de 24 horas (422), lo que está de acuerdo con lo hallado en hombres normales (421). La elevación máxima de LH sérica se alcanza entre las 2 y 6 horas y la de FSH entre las 2 y 12 horas, después de la inyección.

Esta observación, de que solamente una inyección de D-Leu⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), condiciona una elevación prolongada de LH y FSH sérica en humanos puede ser de vital importancia para diseñar tratamientos adecuados en mujeres amenorreicas, aunque desgraciadamente no se han realizado más trabajos en este sentido. En cambio, se han intentado provocar ovulaciones en mujeres normales, tratadas previamente con 0.05 de etinil estradiol: en el día 13^a. del ciclo se administraron 0.5-0.8 mg de este análogo en una sola inyección. De las 10 mujeres tratadas estos fueron los resultados encontrados: en el día 15^o., 7 de ellas tenían signos de ovulación muy temprana y en el día 16^o, en dos más (430). Esto podría tener dos aplicaciones prácticas inmediatas, según nuestro

-67-

criterio. La primera, utilizarlo en mujeres que necesitan inseminación artificial y en segundo lugar, potencialmente, en mujeres normales se podría fijar la fecha de la ovulación, con lo --cuál el método del ritmo alcanzaría un valor muy real con miras a un control de la natalidad, llamémoslo natural. Sin embargo, creemos que todavía es prematuro, y que se requieren más estudios para profundizar en dicho tema.

El D-Leu⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), fué también estudiado en 7 pacientes másculinos, con oligospermia idiopática normogonadotrópica (366). Con dosis de 2,5, 5, 10 y 20 µg se producían aumentos significativos en los niveles de LH y FSH durante 6 y 12 horas.- Los picos de las gonadotropinas se alcanzaron entre la 4^a. y 6^a. horas. Había relación dosis respuesta en ambas gonadotropinas.- Los mayores niveles medios de gonadotropinas se obtuvieron tras la administración de 20 µg del análogo. Todos estos datos hacen factible pensar que este análogo podría ser otro de los tantos - para su utilización en la clínica.

III. 9. 15. ANALOGOS INHIBIDORES DE LA LH-RH

Los primeros intentos de sintetizar un péptido con características inhibitoras, fueron inicialmente tomados con exceptisismo y a veces poniendo en tela de juicio dicha idea.

VALE y sus colaboradores (429) fueron los primeros en comprobar la existencia de un antagonista de la LH-RH, el His²-LH-RH, el cuál no bloquea totalmente la liberación de LH "In vivo" o -- "In vitro" (76,166,172,428).

La información obtenida con los estudios de los análogos estimulatorios de la LH-RH, ha sido utilizada para guiar el intento de crear potentes antagonistas sintéticos de la LH-RH. Uno de estos compuestos el D-His²-desGly¹⁰-LH-RH-(EA) fué el primer inhibidor de la LH-RH que se encontró activo "In vivo" (423,428). Posteriormente a estos estudios de Coy y colaboradores, se han realizado la síntesis de cantidades ingentes de análogos, los cuales han sido preparados y evaluados biológicamente (301,410,439). Algunos de estos inhibidores contienen D-aminoácidos en la posición 6. Así, el Des-His-D-Ala⁶-LH-RH (439) y el desHis²-D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA) (410) inhiben la liberación de la LH y FSH, inducida por la LH-RH "In vivo" e "In vitro".

Después de que REES y sus colaboradores (426) comunicaron que la D-Phe²-LH-RH, poseía propiedades inhibitorias, el grupo de SCHALLY, produjo nuevos compuestos con D-Phe en posición 2, acompañados de sustituciones D-amino en posición 6, todos los cuales fueron excelentes competidores de la LH-RH, tanto "In vivo" como "In vitro" (362). El test utilizado para comprobar que dichas substancias producían realmente un efecto inhibidor fué el siguiente: por vía SC se inyectaba una dosis del análogo de 200 ug/rata y al mismo tiempo se inyectaban 100 ó 200 µg/rata de la LH-RH. Se utilizaron ratas machos inmaduras y se determinó LH y FSH por RIA. Los resultados obtenidos indicaron que el desHis²-D-Leu⁶-LH-RH producía una inhibición porcentual de LH del 79%; el D-Phe²-D-Leu⁶-LH-RH un 61% y un 77.3% el D-Phe²-D-Phe⁶-LH-RH. El porcentaje de inhibición de este último compuesto sube a 91% cuando se administra 30 minutos antes de la LH-RH. La FSH presenta también una inhibición paralela a la de la LH (362). Cuando efectos inhibidores de estos análogos fueron ensayados por un

período prolongado de tiempo en ratas machos inmaduras, en dosis de 500 µg/rata, el D-Phe²-D-Phe⁶-LH-RH y el D-Phe²-D-Leu⁶-LH-RH mostraron efectos inhibidores más potentes que el desHis-D-Leu⁶-LH-RH. La máxima inhibición con los dos péptidos, se logra entre los 30 y 60 minutos. El porcentaje de inhibición en relación a la LH era de un 81% para el D-Phe²-D-Leu⁶-LH-RH y de un 88% para el D-Phe²-D-Phe⁶-LH-RH. El efecto terminaba después de cuatro horas.

DE LA CRUZ y sus colaboradores (427) han ensayado los efectos inhibitorios del D-Phe²-Phe³-D-Phe⁶-LH-RH y han podido comprobar que suprime la respuesta de la LH y FSH a la LH-RH, al menos durante cuatro horas, en ratas y la máxima inhibición aparece a la hora, con un 92,6% para la LH y un 94,4% para la FSH.

Estos compuestos han sido probados también en ratas con ciclos normales, a las cuales se les inyectaba el producto el cuarto día del ciclo la tarde del proestro, y siendo previamente anes-
tesiadas. El desHis²-D-Ala⁶-LH-RH, el desHis²-D-Ala⁶-desGly¹⁰-LH-RH-(EA), el desHis²-D-Leu⁶-LH-RH y el D-Phe²-D-Leu⁶-LH-RH produjeron una inhibición casi completa de la respuesta de LH a la administración de la LH-RH, en una relación 300 veces menor.

FERLAND y colaboradores (302) han demostrado que la sustitución etilamida en el C terminal, del desHis²- y D-Ala⁶-LH-RH no aumenta significativamente la actividad inhibitoria de la molécula.

CORBIN y BEATTIE (326) en su estudio, demostraron que el D-Phe²-D-Ala⁶-LH-RH, inhibe la aparición del pico ovulatorio de la LH y FSH de las ratas y conejos. Los mismos autores dicen que - si este análogo se administra a las ratas pre-coitalmente, previene el embarazo. (316,317).

Las observaciones de BAULIEU y sus colaboradores(425), son - muy interesantes, demostrando que los análogos inhibidores de la LH-RH, son capaces de impedir la acumulación de AMPc en las células adenohipofisarias, paralelamente a la inhibición de LH y FSH. Este es otro de los datos que favorecen la hipótesis de que el - AMPc es el mediador químico de la LH-RH.

SPONA (406) ha demostrado que el desHis²-desGly¹⁰-LH-RH(EA), compite, en los receptores de membrana de la Hipófisis, con la - LH-RH, aunque el mecanismo exacto de la interacción biológica a este nivel todavía no está bien estudiado.

En resumen de este capítulo, podemos decir que se han sintetizado o se puede sintetizar un compuesto inhibidor total de la LH-RH (competitivo o no competitivo) más potente que los descritos anteriormente, lo cuál abriría un nuevo camino, quizás el -- más fisiológico de los conocidos hasta ahora, para el control de la natalidad. En este momento se están empezando a realizar los primeros estudios en este sentido. (319,365).

OBJETO

B. OBJETO DE LA TESIS

Una vez que tenemos una idea global de los fundamentos anatómicos y fisiológicos del Hipotálamo y que hemos profundizado en el capítulo de la LH-RH, indicaremos cuáles son los objetivos que nos planteamos con el D-Trp⁶-LH-RH, análogo más potente que la LH-RH.

- Lo primero, por razones obvias, fué ver si la substancia que teníamos era o no capaz de liberar LH y FSH, ya que en animales esto había sido evaluado perfectamente (328).
- Comprobando lo anterior, pensamos que debíamos buscar la dosis mínima capaz de estimular las células hipofisarias, a fin de que nos sirviera de base en la búsqueda de la dosis más adecuada, para su estudio fisiofarmacológico y, para poder tener alguna base en una posible terapéutica clínica.
- Como el objetivo fundamental de nuestro protocolo de trabajo era estudiar la fisiología y aplicación clínica de este análogo, teníamos que comprobar si, por las distintas vías de administración, este compuesto era idóneo y por esta razón probamos si era eficaz por las siguientes vías:
IV (en un sólo pulso y en infusión continua), IM y SC.
- En las mujeres era muy importante saber el comportamiento del análogo a lo largo del ciclo menstrual, por lo cuál las estudiamos en fase folicular tardía (8°. -10°. del ciclo), fase preovulatoria (11°. -13°. del ciclo), fase ovulatoria (14°. del ciclo) y fase luteínica (23°. -25°. del ciclo).
- Si es verdad que, para que haya ovulación, se necesita al menos que los dinteles de LH y FSH estén elevados durante 8 horas. Lógicamente en los hombres, teníamos que controlar el mismo período de tiempo, con el fin de comparar las dos poblaciones.

- Al mismo tiempo que controlabamos la respuesta de la LH y FSH, controlaríamos el comportamiento de la Testosterona en los hombres y el 17 β -estradiol en las mujeres.
- Si todo lo anterior era positivo, el paso último que nos quedaba era seleccionar un número adecuado de pacientes, femeninos y masculinos, con deficiencia gonadotrópica, y en la que presumiblemente su fallo era de origen hipotalámico y tratarlos con el D-Trp⁶-LH-RH.

MATERIAL Y METODOS

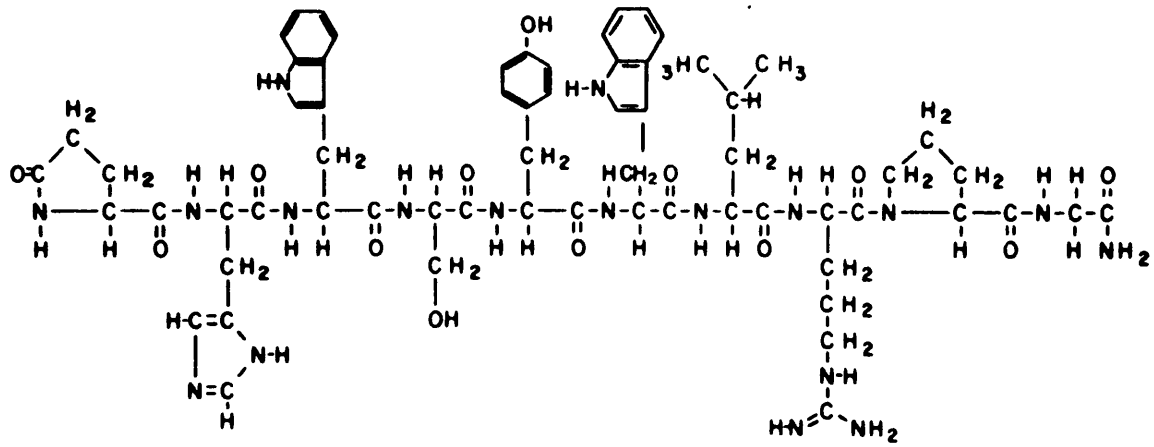
C.- MATERIALES Y METODOS

1.- Materiales:

1.1.- El D-Trp⁶-LH-RH

La hormona utilizada en este estudio es un "factor liberador" de gonadotropinas, análogo del LH-RH, cuya denominación es: D-Trp⁶-LH-RH y que tiene la siguiente fórmula desarrollada: Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ y cuya estructura química se ve en la Figura 5. COY y sus colaboradores (336) a fines de 1974 la sintetizó utilizando el método de fase sólida mediante el cual sustituyó el aminoácido 6-glicina- del LH-RH por el aminoácido D-Trp (triptófano). Esta sustancia se purificó primero en gel y luego en una columna de celulosa-CM (1,4 x 90 cm.) Primero el Dr. Schally y luego los Laboratorios Ayerst del Canadá, nos la enviaron para su estudio liofilizada. Una vez que tuvimos el producto, seguimos el siguiente procedimiento Figura 6 en el Laboratorio de Farmacia, Departamento de Farmacología (Prof. Cadorniga), antes de su utilización clínica:

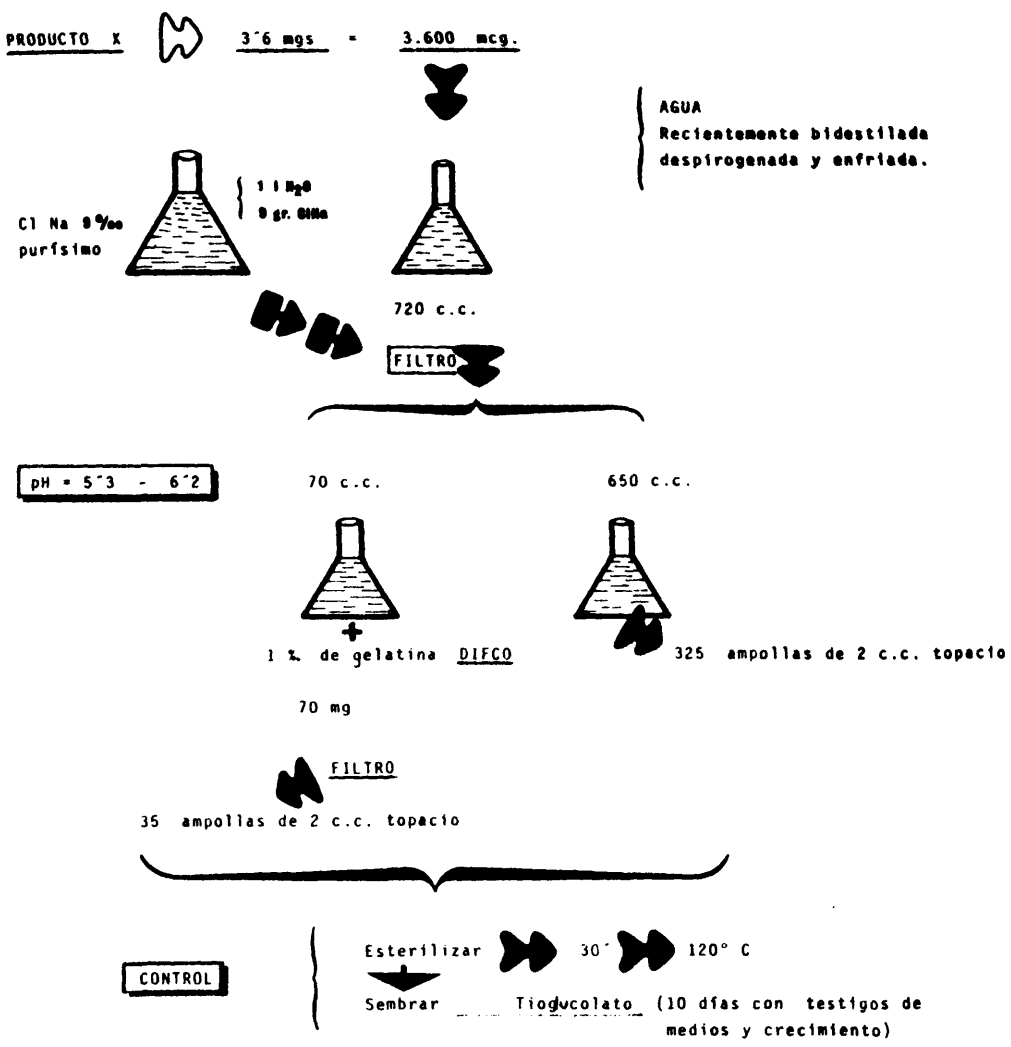
- A.- Disolución en suero fisiológico estéril con ph(5,4).
- B.- Esterilización a 120°C, con calor húmedo, durante treinta minutos.
- C.- Fraccionamiento en ampollas de 2 ml conteniendo 10 µg del análogo cada una.
- D.- Realización de cultivos de muestras recogidas al azar en sustancias apropiadas para la germinación de bacterias y hongos, durante quince días. Al cabo de este tiempo todos los cultivos fueron negativos, con lo cual estuvimos seguros de que al inyectar esta sustancia por cualquier vía no tendríamos ningún peligro de infección.



pGLU-HIS-TRP-SER-TYR-TRP-LEU-ARG-PRO-GLY-NH₂

Figura 5.- Estructura Química del D-Trp⁶-LH-RH.

PREPARACION DEL D-TRP⁶ - LH - RH



6.- Preparación del D-Trp⁶-LH-RH, para uso Clínico.

PROYECTO DE ESTUDIO, CON UN GRUPO CONTROL EN HOMBRES Y
MUJERES NORMALES

GRUPO DE ESTUDIO	JGRS		VIA DE ADMIN.	DURACION DEL ESTUDIO (HRS)	SEXO	Nº DE PACIENTES	EDAD	PESO KG.	DIA DEL CICLO (FASE)
	D-TR LH-RH	LH-RH							
1º	A)	1-7,5	I.V., INY.	8	♂	4	22 A 35 AÑOS	69 - 18,8 (M ± SD)	
	B1	10	I.V., INY.	8	♂	4			
	B2	10	I.M.	8	♂	3			
	B3	10	S.C.	8	♂	3			
	B4	10	I.V., INF.	8	♂	3			
1º c)	C1	50	I.V., INY.	8	♂	3			
	C2	50	I.V., INF.	8	♂	3			
2º		100	I.V., INY.	2	♂	7			
3º CONTROL		SUERO FISIOL.	I.V., INF.	8	♂	3			
1º	A)	SUERO FISIOL.	I.V., INF.	8	♀	3	17 A 35 AÑOS	56,39-10,01 (M ± SD)	(F)8º-10º
	B)	100	I.V., INY.	9	♀	9			(F)8º-10º
			I.V., INY.	8	♀	4			8º-10º
	C)	10	I.V., INY.	8	♀	3			8º-10º
			I.M.	8	♀	3			8º-10º
			I.V., INF.	8	♀	3			8º-10º
	C3	50	I.V., INY.	8	♀	3			8º-10º
2º		10	I.V., INF.	8	♀	3	(F)11º-13º		
3º		10	I.V., INF.	8	♀	3	(O)14º		
4º		5x10	I.V., INY.	8	♀	2	(L)23º-24º		

1.2.- Material Clínico

Para nuestro estudio y por razones obvias, nuestro material clínico lo dividimos en cuatro grupos; los dos primeros hombres y mujeres normales y los segundos hombres y mujeres con patología hipotalámica. El estudio fisiológico lo realizamos en los dos -- primeros grupos, los cuáles los hemos agrupado en el Cuadro 1, para una mejor y rápida comprensión.

1.2.1.- Hombres normales:

Treinta y tres hombres normales, voluntarios, sin antecedentes de enfermedad endocrina, comprendidos entre los 22 y 35 años, con un peso de $69 \pm 18,8$ Kg ($M \pm SD$) sirvieron como sujetos de la experiencia, divididos en los siguientes grupos:

- I.- 23 sujetos recibieron el D-Trp⁶-LH-RH de la siguiente manera:
 - a) A 4 sujetos se les administró dosis crecientes de 1 a 7,5 μ g vía IV en un sólo pulso.
 - b) 13 sujetos recibieron 10 μ g de la siguiente manera:
 - b₁.- 4 en inyección IV en un sólo pulso
 - b₂.- 3 en inyección IM
 - b₃.- 3 en inyección SC
 - b₄.- 3 en infusión IV continua durante 8 horas
 - c) 6 sujetos recibieron una inyección de 50 μ g del análogo de la siguiente manera:
 - c₁.- 3 en inyección IV en un sólo pulso
 - c₂.- 3 en infusión IV continua durante 8 horas
- II.- 7 sujetos recibieron 100 μ g de LH-RH vía IV en un sólo pulso.
- III.- 3 sujetos recibieron suero fisiológico vía IV en infusión continua durante 8 horas.

1.2.2.- Mujeres normales

En este estudio colaboraron voluntaria y libremente, 36 mujeres normales, comprendidas entre los 17 y 35 años, que nunca antes habían sufrido ninguna enfermedad endocrina o metabólica, teniendo todas ellas sus ciclos normales (28-32 días) y siendo su peso de $56,39 \pm 10,01 (M \pm SD)$. Se las clasificó de la siguiente manera:

- I.- Mujeres en fase folicular (8°. -10°.), las cuáles fueron subdivididas de la siguiente manera:
 - a) 3, recibieron solamente solución salina, vía IV en infusión continua durante 8 horas.
 - b) 9, recibieron 100 µg de LH-RH IV en un sólo pulso.
 - c) 16, recibieron el D-Trp⁶-LH-RH de la forma siguiente:
 - c₁.- Dosis crecientes de 1 a 7,5 µg, vía IV en un sólo pulso, en 4 mujeres.
 - c₂.- 10 µg IV en un sólo pulso, en 3 mujeres
10 µg IM, en 3 mujeres y
10 µg IV en infusión continua en 3 mujeres
 - c₃.- 50 µg IV en un sólo pulso, en 3 mujeres.
- II.- Mujeres en fase pre-ovulatoria (11°. -13°. del ciclo). - Se administró 10 µg vía IV en infusión continua durante 8 horas, en 3 mujeres.
- III.- Mujeres en fase ovulatoria (14°. día del ciclo). Se administró 10 µg vía IV en infusión continua durante 8 horas, en 3 mujeres.
- IV.- Mujeres en fase luteínica (23°. -24°. días del ciclo) 2 mujeres recibieron, una dosis de 5 y 10 µg respectivamente, vía IV en un sólo pulso.

Tanto en los hombres como en las mujeres, una vez extraídas, las muestras de sangre (10 ml cada vez,) fueron centrifugas(Rottina/s) y los sueros separados guardados a -20°C. Las muestras de sangre se tomaron en los siguientes tiempos: basal y 15,30,60,120, 180,240,360 y 480 minutos después de la inyección.

Los pacientes permanecieron recostados durante toda la prueba que comenzó entre 9 y 9,30 de la mañana y a mediodía (2 de la tarde) tomaron un pequeño aperitivo (un bocadillo y una bebida no alcohólica). La prueba finalizaba a las cinco de la tarde aproximadamente. Ningún paciente tuvo la más mínima molestia durante el desarrollo de la prueba ó después de ella.

1.2.3.- Pacientes con Hipogonadismo Hipogonadotrópico masculino.

Tres pacientes genéticamente XY, con una silla Turca normal y un E.E.G. normal, clínicamente hipogonadales, uno de ellos con -- anosmia, fueron enviados a la unidad metabólica para su posible estudio y terapéutica con el D-Trp⁶-LH-RH. Ellos fueron debidamente informados del estudio que les íbamos hacer y todos dieron su asentimiento.

La determinación basal de las gonadotropinas en los tres pacientes fué indetectable. A todos ellos les hicimos una prueba de Clomifeno la cuál fué negativa para los tres pacientes y por último les sometimos a una prueba con 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH, IV en un sólo pulso. A dicha prueba todos los pacientes respondieron con una respuesta de gonadotropinas inferior a la normal, excepto en el paciente 3 (G.S.P.) cuya FSH, tuvo una hiper-respuesta a partir de los 120 minutos como podermos ver en la Figura 7. Paciente 1 (E.R.S.).- De 19 años de edad, con apariencia de un niño de 12 a -

14 años. Su estatura era de 154cms. y su peso de 44Kg. Aspecto eunucoide. Ausencia de caracteres sexuales (barba, bigote, vello axilar, vello púbico, libido, erecciones, poluciones). Según la escala de Tanner (451) se encontraba en grado 1. El tamaño testicular en la escala de Waller (452) era para el testículo derecho de <2 y para el testículo izquierdo de 2, correspondiendo con una edad de <2 para el derecho y 2 para el izquierdo en la misma escala. Este paciente había recibido un año antes un tratamiento previo con HCG, durante 6 meses.

Durante 15 semanas cada 8 horas se le administró en inyección IM 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH.

Paciente 2 (R.H.F.).- De 20 años de edad con una apariencia de 15 años. Estatura 182cms. y peso 85Kg. Aspecto eunucoide. Ausencia de caracteres sexuales (barba, bigote, vello axilar, vello púbico, erecciones y poluciones). Según la escala de Tanner se encontraba en Grado 1. El tamaño testicular en la escala de Waller, era para el testículo derecho de <2 y para el izquierdo de <2, correspondiendo con una edad de <2 años para el derecho y <2 para el izquierdo en la misma escala. Este paciente recibió hace 3 años un tratamiento de HCG durante 2 años.

Se le administró el análogo cada 8 horas 10 µg IM durante 13 semanas.

Paciente 3 (G.S.P.).- De 22 años de edad con una apariencia de 15 años. Talla 163cms y peso 64Kg. Aspecto eunucoide. Ausencia de las siguientes características sexuales (barba, bigote, vello axilar y púbico, falta de libido, erecciones y poluciones. En la escala de Waller tenía los siguientes datos: derecho 2 e izquierdo

2, correspondiendo con una edad de 2 para ambos testículos. Este paciente recibió durante 6 meses HCG, un año antes que nosotros lo viésemos.

Durante 17 semanas se le administró análogo, cada 8 horas 10 µg IM. Estos pacientes fueron estudiados de la siguiente manera:

- a) Determinación basal de gonadotropinas y una vez por semana durante su tratamiento, a las 9 a.m. y antes de la inyección del análogo.
- b) Determinación basal de Testosterona y una vez por semana.
- c) Prueba del Clomifeno, antes del tratamiento.
- d) Prueba del D-Trp⁶-Lh-Rh (10 µg IV)
- e) Biopsia pre y post-tratamiento

1.2.4.- Mujeres anovulatorias

Ocho mujeres aparentemente sanas, las cuáles previamente habían recibido tratamiento con Clomifeno, HCG, HMG, y que nunca se habían quedado embarazadas, fueron enviadas desde el Departamento de Esterilidad de la II, Cátedra de Obstetricia y Ginecología, (Prof. Bottella Llusá), para tratarlas con el análogo. Además tuvimos la oportunidad de estudiar a una paciente soltera con anorexia nervosa. Las pacientes fueron debidamente informadas del tratamiento que iban a recibir y todas ellas dieron su asentimiento.

La causa principal de su anovulación y consiguientemente de su esterilidad era una amenorrea secundaria. Todas las pacientes eran normales físicamente y sus pelvis eran también normales. En las mujeres casadas, la histerosalpingografía fué normal, no hallándose patología en la cavidad uterina. Todas tenían un cuello uterino normal.

El diagnóstico de la anovulación fué realizado en el ciclo de estudio, en el cuál nosotros artificialmente, ya que todas - tenían amenorrea, las estudiamos por un período no inferior a - 24 días. Durante este tiempo las pacientes se tomaron la temperatura basal, cinco minutos antes de levantarse por la mañana, - la citología vaginal seriada en todas ellas eran hipoestrogénicas, monofásicas y la extracción de pregnandiól urinario fué menor de 0,8 mg/24 horas. En este ciclo, los niveles de gonadotropinas fueron medidos unas 10 veces aproximadamente. En las casadas se practicó una biopsia endometrial, la cuál indicaba un endometrio en proliferación persistente. Las historias clínicas de las pacientes son las siguientes:

Paciente 1.- (M.G.B.).- Tenía 32 años de edad, casada hace 5, presentaba amenorrea secundaria y esterilidad primaria. Ella - previamente había sido tratada con HCG, HMG y Clomifeno. Esta paciente fué sometida al siguiente protocolo:

1.- Ciclo de estudio (28 días) y 2.- Ciclo de tratamiento: administramos 40 µg de D-Trp⁶-LH-RH vía IV en infusión continua durante 8 horas, e inmediatamente después de la infusión le inyectamos 40 µg SC.

Paciente 2.- (P.A.V.).- De 37 años de edad, casada desde hace 7, tiene esterilidad primaria y amenorrea secundaria. Había sido - tratada con HCG, HMG y Clomifeno. Esta paciente fué sometida al siguiente protocolo:

1.- Ciclo de estudio (24 días), 2.- Ciclo con tratamiento de - Clomifeno 100 mg/día por 5 días y 3.- Ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH: 40 µg vía IV en infusión continua durante 8 horas, seguido inmediatamente después de una inyección SC. de 40µg del análogo.

Paciente 3 (M.J.V.).- De 28 años de edad, casada desde hace 6.- Después de dos años de tomar oralmente 0,5 mg de norgestrel, más 0,05 de etinil estradiol (Eugynon), presenta amenorrea secundaria. Antes de acudir a nuestra consulta, fué tratada con HCG, HMG. Esta paciente fué sometida al siguiente protocolo: 1.- Ciclo de estudio (24 días), 2.- tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH, 40 µg vía IV en infusión continua durante 8 horas e inmediatamente después 40 µg SC, y 3.- segundo ciclo de tratamiento con el análogo, en el cuál durante 10 días seguidos recibió una inyección diaria IM del análogo y al 11º. día se le inyectó una infusión IV continua de 8 horas con 40 µg del análogo seguida inmediatamente después por 40 µg SC.

Paciente 4 (M.C.D.).- De 29 años de edad casada desde hace 4, siempre presentó irregularidades menstruales, alternando con episodios de amenorrea. Fué tratada previamente con HCG, HMG y Clomifeno.- Esta paciente fué sometida al siguiente protocolo: 1.- Ciclo de estudio (24 días) y 2.- Ciclo con D-Trp⁶-LH-RH, en el cuál ella recibió una infusión IV continua de 40 µg del análogo durante 8 horas e inmediatamente después 40 µg SC.

Paciente 5 (L.R.V.).- De 30 años de edad, casada desde hace 6, tiene amenorrea secundaria y esterilidad primaria. Tratada previamente con HCG y HMG. Esta paciente recibió solamente 40 µg de D-Trp⁶-LH-RH en infusión IV continua durante 8 horas, seguida de una inyección de 40 µg SC.

Paciente 6 (V.W.L.).- De 23 años de edad, casada desde hace 5, con amenorrea secundaria y esterilidad primaria. Fué diagnosticada de insuficiencia hipofisaria selectiva para ambas gonadotropinas, LH y FSH y previamente a nuestra consulta recibió tratamientos con HCG, HMG. Esta paciente fué sometida al siguiente protocolo: 1.- Ciclo de estudio (26 días) y 2.- Ciclo con D-Trp⁶-LH-RH, 40 µg en

infusión IV continúa durante 8 horas, seguido de 40 µg SC y 3.- - Segundo ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH, en el cuál recibió 10 µg/cada 8 horas IM (30 µg/día) durante 13 días y al 14 día del ciclo se le realizó una infusión IV de 40 µg del análogo durante 8 horas seguido de una inyección de 40 µg SC.

Paciente 7 (P.F.C.).- De 20 años de edad, soltera, con amenorrea secundaria desde hace cuatro años, la cuál coincidió con una exagerada pérdida de peso. Se le diagnosticó de anorexia nervosa y se le sometió al siguiente protocolo: 1.- Ciclo de estudio (24 -- días) y 2.- Ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH, 10 µg/día IM durante 10 días, al día 11°. ella recibió en infusión IV continúa de 40 µg del análogo, seguida inmediatamente por una inyección de 40 µg SC.

Paciente 8 (M.T.S.).- De 32 años de edad, casada hace 4, con esterilidad primaria e irregularidad menstrual que comenzó a los 20 - años de edad y fué tratada con 3 mg de benzoato de estradiol en - pastillas (Progynon C fuerte). Hace cuatro años y por un período de dos años, tomó ininterrumpidamente, 0,25 de norgestrel con 0,05 de etinil estradiol (Neogynon) y posteriormente fué tratada con - HCG y HMG. Esta paciente se sometió al siguiente protocolo: 1.- Ciclo de estudio (24 días) y 2.- Ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH. Antes de la infusión y durante 10 días se le administró - una ampolla diaria de Pergonal y en el día 11°. , recibió una infu sión IV continúa durante 8 horas de 40 µg de D-Trp⁶-LH-RH, seguida inmediatamente de 40 µg SC del análogo.

Paciente 9 (S.D.Q.).- De 29 años de edad, casada hace 5, esterili- dad primaria e irregularidades menstruales. Durante los años 1971 a 1973, la menstruación le fué inducida con 3 mg de benzoato de es- tradiol más 50 mg de progesterona (Duogynon). Había sido tratada con HMG, HCG y Clomifeno y se le estudio de la siguiente forma: --

1.- Ciclo de estudio (24 días) y 2.- Ciclo con D-Trp⁶-LH-RH, con infusión IV de 40 µg del análogo seguida de 40 ug SC. Trece días antes del tratamiento, recibió, Clomifeno durante 5 días, en una dosis de 100 mg/día.

2.- METODOS

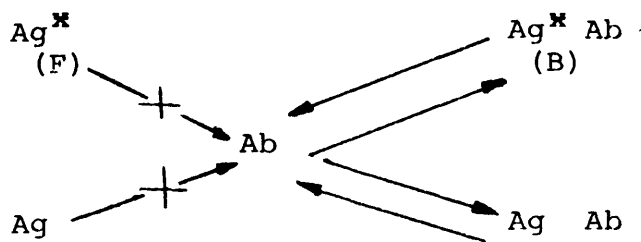
2. 1. Generalidades de RIA

Para poder medir la respuesta del D-Trp⁶-LH-RH en las células hipofisarias hemos utilizado el método de RIA para LH y FSH, basados en los trabajos de Midgley (412), Greenwood, Hunter y -- Clover (417) y fundamentalmente en los trabajos de Fernández-Durango (415) quien montó la técnica en nuestro laboratorio.

Como sabemos, el radioinmunoensayo (RIA) es un método de valoración especialmente utilizado en Endocrinología, que nos permite medir exactamente cantidades muy pequeñas (ng y pg).

Se basa principalmente en medir sustancias con carácter antigénico. Para lo cual se utiliza anticuerpos específicos contra la sustancia que queremos medir (en el caso que nos ocupa, LH, FSH T y 17 β estradiol). Para ello se le hace competir con la misma hormona marcada con un isótopo radioactivo. Una vez estabilizada la reacción se puede saber la cantidad de hormona, midiendo la radioactividad del complejo antígeno anticuerpo. (382).

La reacción se puede esquematizar de la siguiente manera:



- en donde: Ag* es el antígeno marcado (F)
- Ag el antígeno no marcado
- Ag*Ab es el complejo marcado (B)
- Ag Ab es el complejo no marcado
- Ab es el anticuerpo específico

Si la reacción $Ag^* + Ab \rightleftharpoons Ag+Ab$, se realiza manteniendo constante la concentración del anticuerpo y la del antígeno no marcado determinarán una progresiva inhibición de la reacción entre el antígeno marcado y el anticuerpo. La cantidad de antígeno marcado y por tanto la radioactividad ligada al anticuerpo en equilibrio conocida como B (Ag^*Ab), irá decreciendo al crecer la concentración de antígeno y en correspondencia aumentará la cuota de antígeno marcado libre F (Ag^*). A cada valor por tanto corresponderá valores decrecientes del cociente B/F. Este signo por tanto correlativo a la concentración de antígeno standard presente en la reacción. De este modo, usando concentraciones conocidas del antígeno, en forma de solución standard se podrá construir una curva patrón conocida como curva standard. Si nosotros queremos medir una substancia X, ésta provocará una inhibición o reducción del B/F, proporcional a la concentración del antígeno endógeno contenido en ese volumen. La medición exacta la tendremos con una simple integración en la curva standard.

2. 2.- Radioinmunoensayo de LH y FSH, con material donado por NIH (National Institute of Health)

Por lo dicho en la introducción de este capítulo, es evidente, entonces, que en la ejecución del RIA de LH y FSH son importantes los siguientes pasos:

- Marcaje de las hormonas (LH y FSH) con isótopos radioactivos I^{125} .
- Anticuerpos específicos
- Curva standard para usarla como referencia
- Separación del antígeno marcado libre de aquel ligado al anticuerpo.

2. 2. 1.- Marcaje de las Hormonas

Las técnicas de marcaje, hoy día numerosas, utilizan la iodación basada en la introducción de átomos de iodo radioactivo en los grupos tirosínicos. Se incluye un primer paso para oxidar el ion ioduro a iodo molecular, forma en la que reaccionará con la hormona a marcar. Las condiciones de la reacción serán tales que se favorezca la iodación, lo que se consigue con un pH alcalino próximo a la neutralidad.

Este método de Greenwood y Hunter publicado en 1962 (424) para el marcaje específico de la hormona de crecimiento es el que hemos tomado nosotros como base, junto con otro trabajo publicado por ellos mismos diez años más tarde (417) para el marcaje de LH y FSH. Como medio de reacción utilizan un buffer 0,25 M de fosfato a pH: 7,4. El ion ioduro es oxidado por la Cloramina-T a iodo molecular y sustituirá en los grupos tirosínicos a átomos de hidrógeno. Una vez que la reacción se ha completado, se para, añadiendo al medio metabisulfito sódico que reduce el exceso de oxidante. (349).

2. 2. 2.- Anticuerpos

Los anticuerpos que hemos utilizado fueron:

- a) Anti-LH: preparado en conejos inyectados o inmunizados con LH hipofisaria.
- b) Anti-FSH: preparado en conejos inyectados o inmunizados con FSH hipofisaria.

Ambos anticuerpos donados por el National Institute of Health los EE.UU. (NIH), los recibimos en una fracción de 1 ml en una di-

lución 1:2; una vez diluidos en tampón BSA-PBS a 1:100, se guardaron en fracciones de 1 ml a -20°C.

- c) 2°. Anticuerpo: anti gamma-globulina de conejo, obtenido en carneros y suministrado por Antibodies Inc. Davis (California. EE.UU.).

2. 2. 3.- Curva Standard

Para realizar la curva standard, Figura 7 para LH y Figura 8 - para FSH, representamos la radioactividad de los precipitados en % y tomamos como 100 x 100 la radioactividad de los tubos "blanco", es decir los que carecen de hormona "fría" y solamente contienen la hormona marcada y el 1° y 2° anticuerpos.

El cálculo se realiza de la siguiente forma:

$$\text{Tanto por \% de hormona ligada} = \frac{C - RI}{C_0 - RI} \times 100 = \frac{B}{B_0} \times 100$$

donde c representa la radioactividad de los tubos standard o - de los sueros a valorar, C₀ la radioactividad de los tubos "blanco" y RI la radioactividad inespecífica.

Los resultados así obtenidos los llevamos a un eje de ordenadas, representando en las abscisas la concentración de la hormona standard y en las ordenadas el tanto por ciento de hormona ligada. Sobre el papel semilogarítmico unimos todos estos puntos y de esta forma obtenemos la curva standard.

Para hallar las concentraciones de la hormona en los sueros - problema, los valores que obtenemos con la aplicación de la fórmula reseñada anteriormente los llevamos al eje de ordenadas de la curva standard, y el punto de intersección, entre la curva standard y una recta horizontal trazada desde el eje de ordenadas, nos va a dar la concentración.

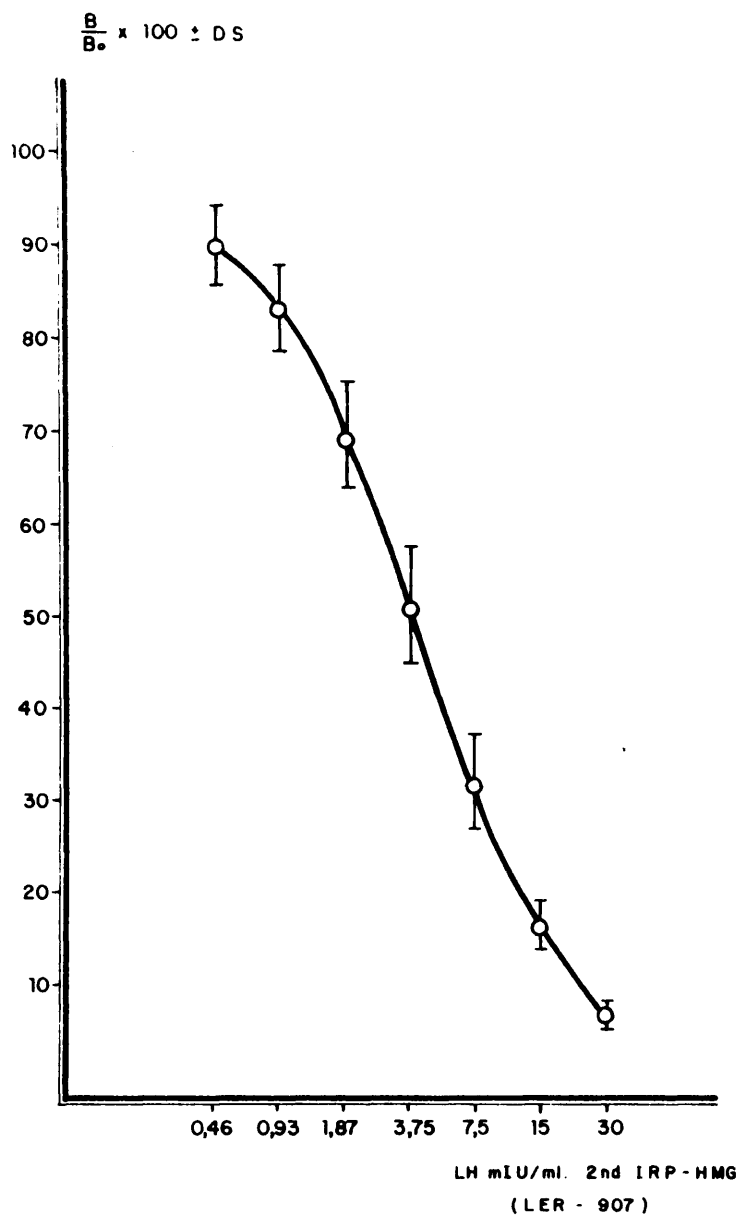


Figura 7.- Curva Standard de LH: Las barras representan la $\bar{M} \pm SD$ (n=14).

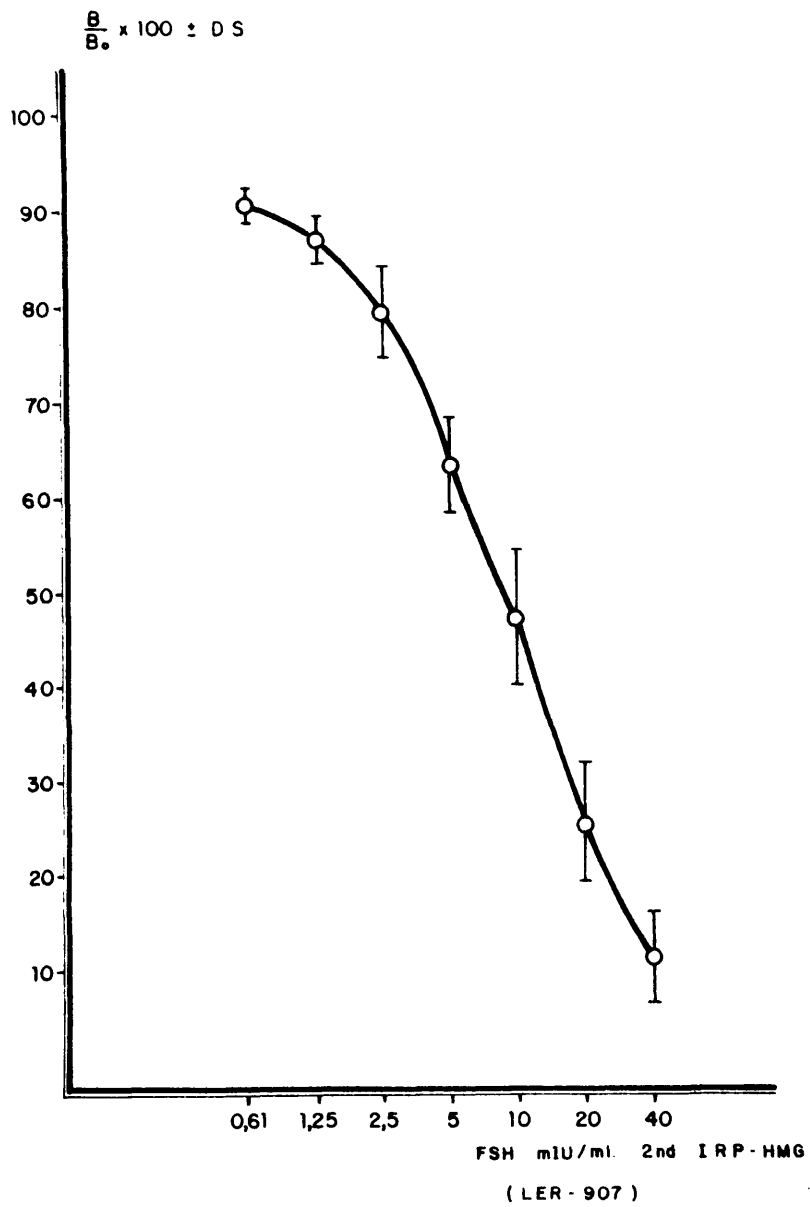


Figura 8.- Curva Standard de FSH: Las barras representan la $\bar{M} \pm SD$ (n=12).

2. 2. 4.- Separación del antígeno marcado libre del ligado y del iodo libre

Para ello hemos utilizado una columna de Sephadex G-75 y hemos recogido fracciones de 0,5 ml, utilizando un colector de -- fracciones "Gilson 1 AMTDC" y de estos, hemos tomado 10 μ l para llevarlos a un contador de radiación gamma (Núclear Chicago de 2 canales) obteniéndose dos curvas. En la 1^a. en su porción descendente se encuentra la hormona apta para el RIA. Lo representamos en las Figuras 9 para LH y 10 para FSH.

Todo este complicado procedimiento fué puesto a punto en -- nuestro laboratorio por la Dra. R. Fernández-Durango y para una mayor información nos remitimos a su trabajo (415).

Los resultados han sido expresados en mili-unidades internacionales por mililitro mIU/ml, teniendo como referencia standard el LER-907, cuya potencia biológica es de 20 IU LH por miligramo.

Todas las muestras fueron medidas por duplicado.

La dosis mínima detectable fué de 0.8 mIU/ml para LH y 0.6 mIU/ml para FSH.

El coeficiente de variación intra-ensayo fué menor del 5% y el inter-ensayo menor del 15% tanto para LH como para FSH.

El coeficiente de regresión al linealizar la curva standard fué de 0.99, para las dos hormonas como se puede ver en la Figura 11 para LH y Figura 12 para FSH.

2. 3.- Radioinmunoensayo del 17 β -Estradiol

Las determinaciones del 17 β -estradiol se han hecho por RIA con Kits comerciales CIS-SORIN-Italia.

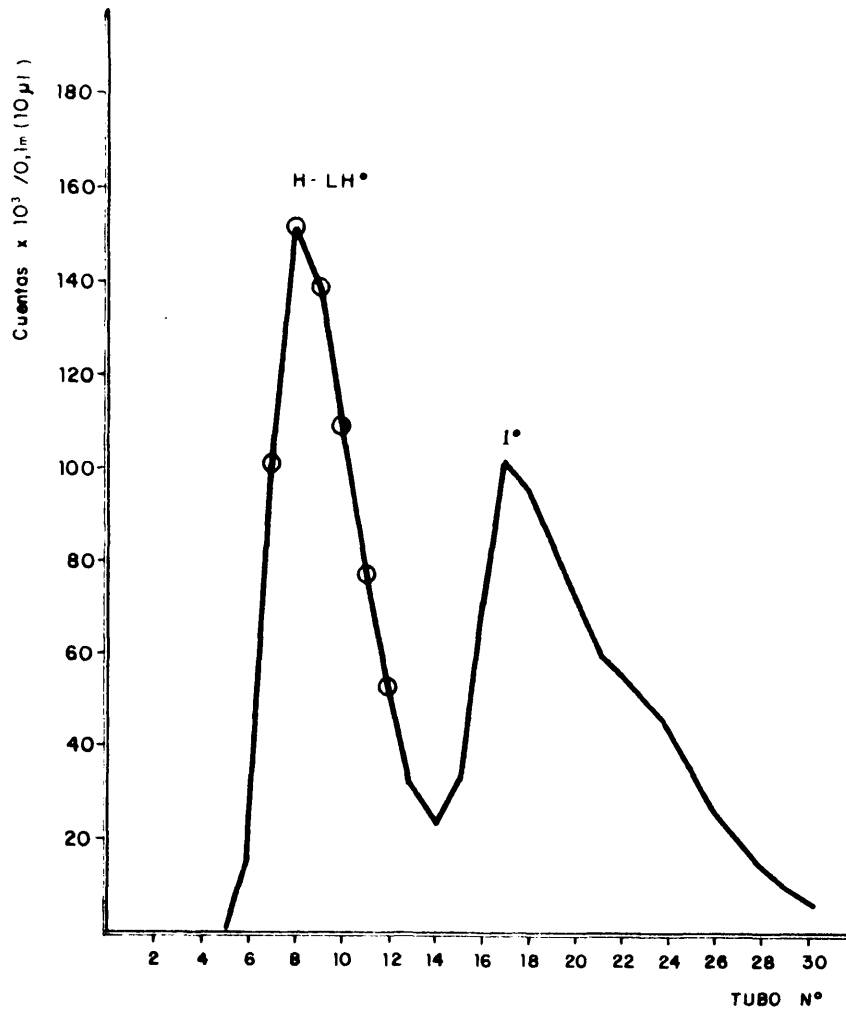


Figura 9.- Marcaje de LH con I^{125} . La curva muestra la separación de I^{125} -LH (primer pico) del I^{125} libre (segundo pico).

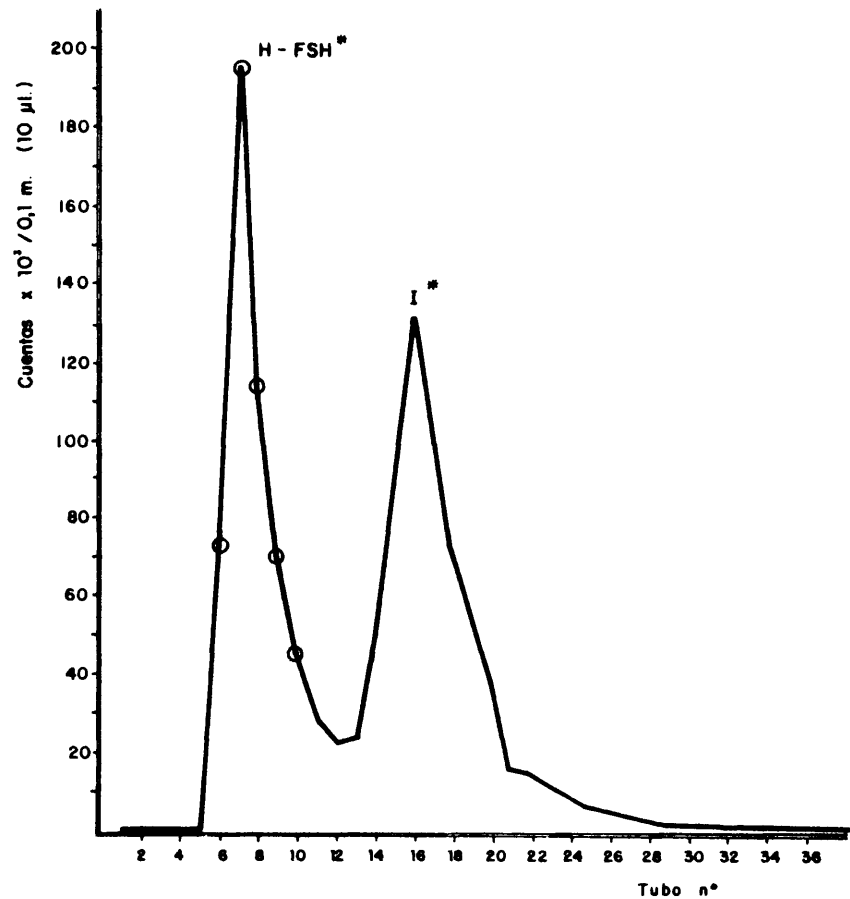


Figura 10.- Marcaje de FSH con I¹²⁵. La curva muestra la separación del I¹²⁵-FSH, (primer pico), del I¹²⁵ - libre (segundo pico).

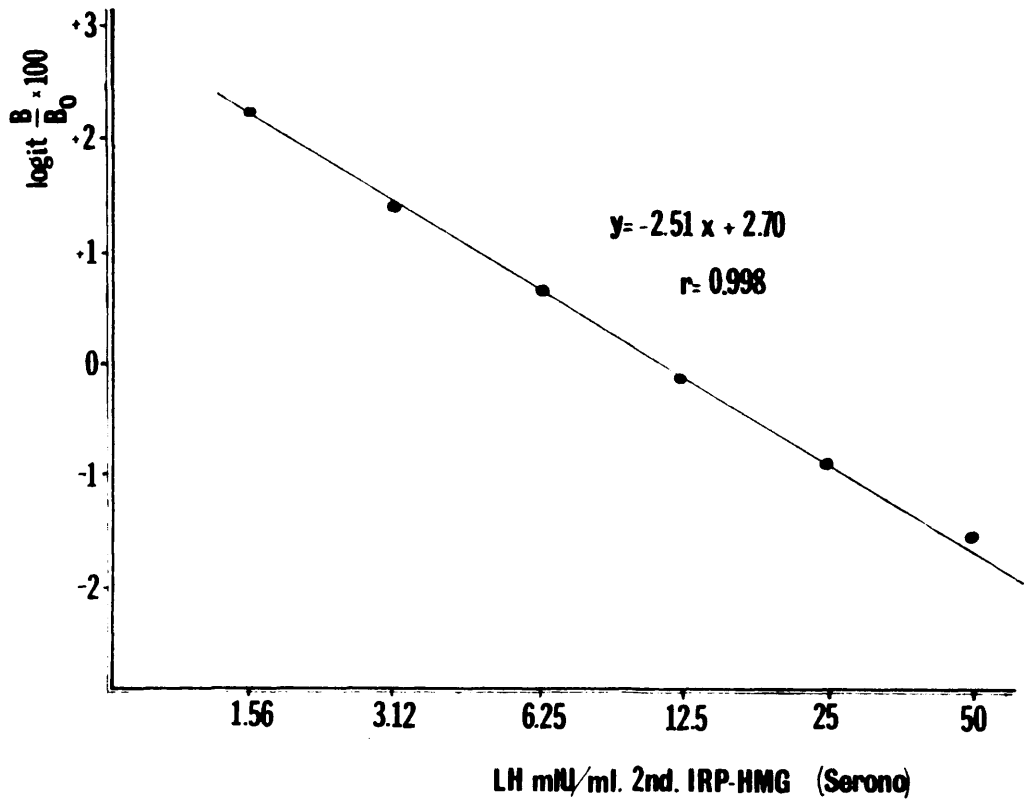


Figura 11.- Representación en Escala Logit-Log de la Curva Standard de LH de la Fig. 7.

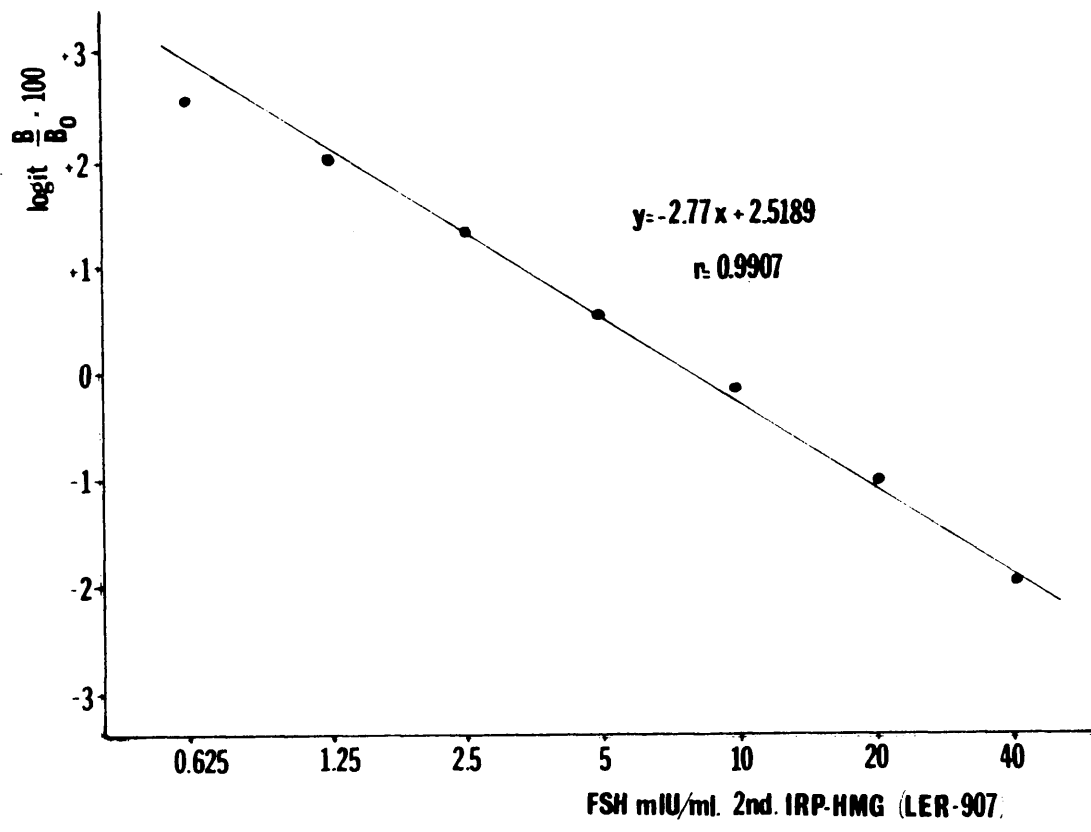


Figura 12.- Representación en Escala Logit-Log de la Curva Standard de FSH de la Fig. 8.

2. 3. 1.- Componentes del Kit

- Estradiol tritiado, actividad específica 350-400 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$
- Estradiol Standard (400 μg disueltos en 1 ml de etanol)
- Antisuero específico (Tiroglobulina humana)
- Tampón fosfato, pH 7,4
- Carbon-Dextrano

2. 3. 2.- Metodología del RIA de 17β -Estradiol

Debido a que la especificidad del anticuerpo es lo suficientemente elevada, es posible evitar el procedimiento cromatográfico y hacer una determinación directa en los extractos secos de suero o plasma. Los porcentajes de reacción cruzada son del 3% para estrona, 0.4% estriol y menor de 0.003% para testosterona, progesterona y cortisol.

El estradiol marcado con tritio en posiciones 2, 4, 6 y 7 tiene una actividad específica de 350-400 mCi/mgr y la cantidad de compuesto marcado en cada tubo a ensayar es de 5mCi/tubo (12 pg/tubo). Durante un período de incubación de 2-3 horas, el estradiol standard o plasmático compiten con el esteroide marcado por los sitios de Binding en el anticuerpo. Al cabo de ese tiempo el mismo complejo se separa del estradiol libre por la adición de carbón charcoal dextrano (1 mg/tubo). Luego se centrifugan y se cuentan 0.5 ml del sobrenadante en un contador de radioactividad, utilizando un líquido o mezcla de centelleo a base de Naftaleno (100 g) PPO (7 g) y POPOP (0.3 g) y Dioxano (1 litro), empleando un tiempo de contaje de 5 minutos.

La curva standard se hace siempre en presencia de una cantidad de residuo seco igual a la del disolvente empleado en la extracción del suero o plasma.



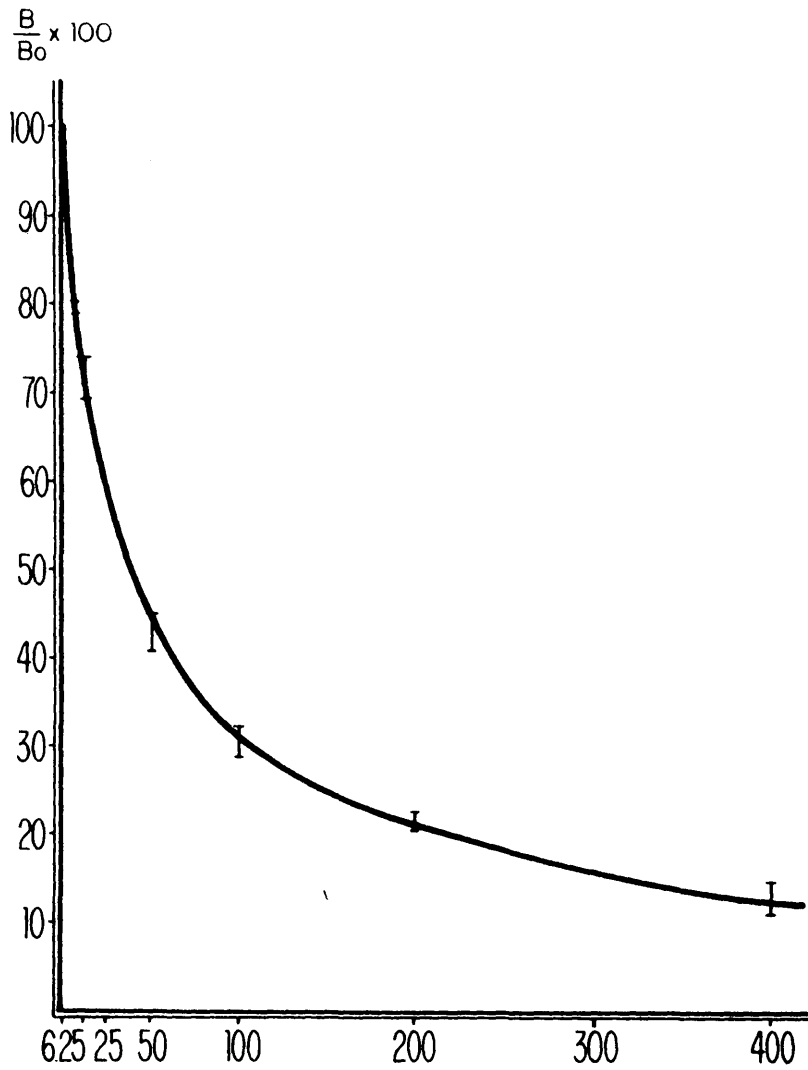


Figura 13.- Curva Standard del 17 β -Estradiol. Las barras re presentan la $\bar{M} \pm SD$ (n=4).

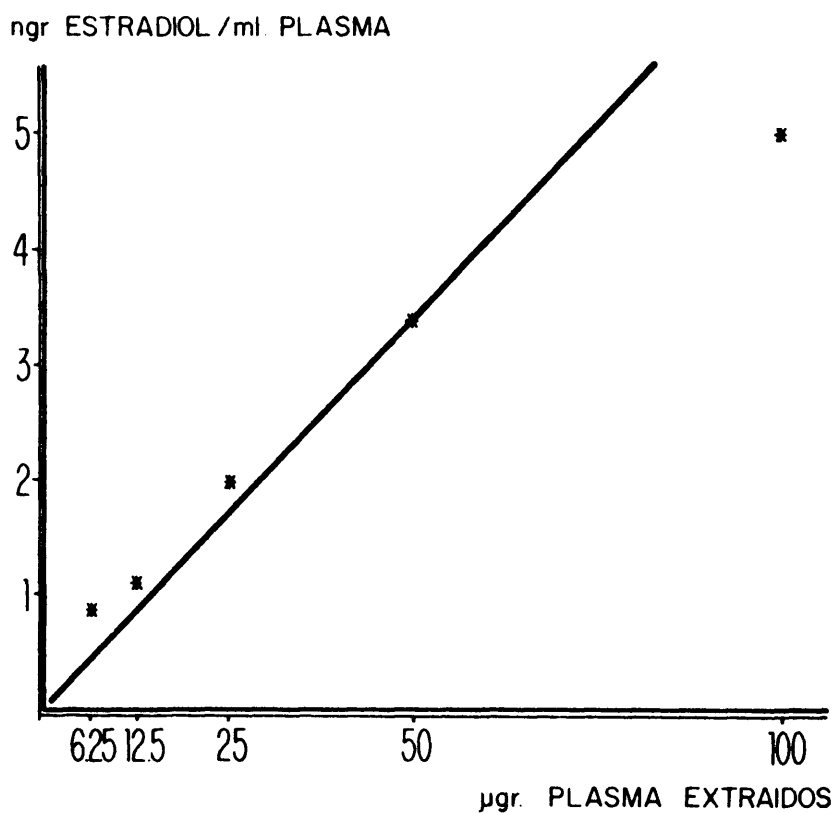


Figura 14.- Curva de Dilución de un Suero de Mujer Embarazada.

De esta manera el máximo "binding" (relación B/T, siendo B=radioactividad ligada y T=radioactividad total) oscila entre 20-45%, dependiendo del Bacth de anticuerpo recibido.

En la Figura 13, se puede ver la media de varias curvas standard y en la Figura 14 un test de dilución de un suero de mujer embarazada, lo cuál nos da una idea de la exactitud del método.

La radioactividad inespecífica (radioactividad no absorbida por el charcoal en ausencia de anticuerpo) varía entre un 3% y 6%.

La variabilidad intraensayo tiene un coeficiente menor del 10% y la variabilidad inter-ensayo, medida en cuatro ocasiones diferentes en un suero de mujer embarazada, nos da un coeficiente de variación del 16,3%.

Para la extracción de las muestras, con dietil-eter, se han utilizado sueros, estando los límites de la recuperación de la extracción entre un 75% el más bajo y un 91% el más alto.

2. 4.- Radioinmunoensayo de la Testosterona

Hemos medido la Testosterona, siguiendo el método de radioinmunoensayo por doble anticuerpo, con Kits comerciales de la Casa Serono (Italia). (343, 359).

2. 4. 1.- Componentes del Kit

- Testosterona-3-TME-I¹²⁵, obtenida al marcar la Testosterona-3-O carboximetiloscina-Tirosina-metil ester por el método de cloramina T.; 1 ml contiene aproximadamente 1.5 µCi.

- Testosterona standard: cuando se diluye con 10 ml de buffer se obtiene una concentración de 400 ng/100 ml y por diluciones sucesivas a 1:2 se obtienen los demás puntos de la curva standard.
- Antitestosterona: se obtiene de conejo
- Anti RGG: son antigammaglobulinas de conejo obtenidas en oveja.
- Tampón: fosfato 0.01 M a un pH: 7,5 que contiene BSA (albúmina bovina) y EDTA-Na₄.

3. 4. 2.- Metodología del RIA de Testosterona

Debido a la afinidad de la T por el polietileno, que puede afectar a la exactitud de los resultados, es conveniente usar unos tubos de cristal con lo que se reduce el binding inespecífico. Los tubos deben lavarse con mezcla crómica para eliminación de todas las sustancias orgánicas.

Previamente hay que extraer la T de las muestras (suero) con éter etílico. Los volúmenes empleados fueron 0.5 ml de suero de mujer o 0.2 ml de suero de hombre, utilizando para ambos casos 3 ml de éter etílico (altamente purificado). Una vez las dos sustancias puestas en contacto en los tubos, se llevan a centrifugar a baja velocidad, menos de 4000 rpm e inmediatamente se dejan los tubos a -20°C, con lo que, al quedar congelada la fase acuosa, se separa muy fácilmente la fase orgánica, la cuál es transferida, ó trasladada por pipetas Pasteur, a otros tubos que, conectados a una corriente de nitrógeno y en baño María, se secan. Al residuo seco se le añade 1 ml de tampón, con lo que se realiza una dilución 1:2, en el caso de las mujeres y 1:5 en el de los hombres. Esto debe tenerse en cuenta en el cálculo final de los resultados.

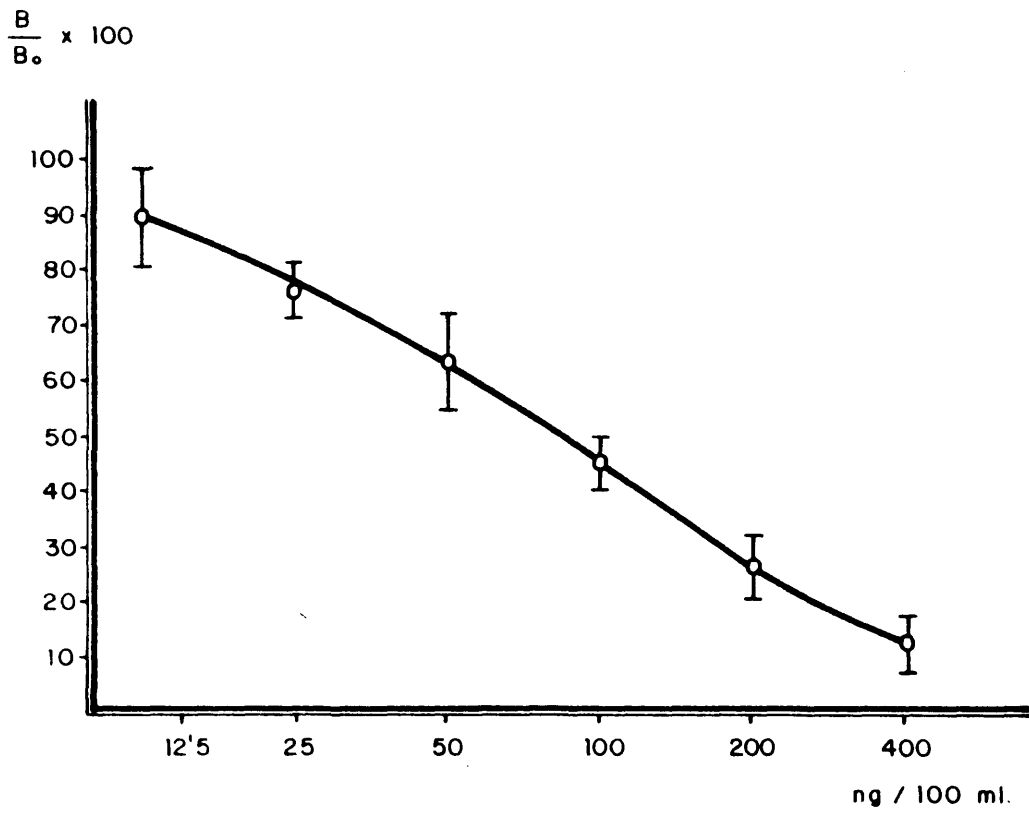


Figura 15.- Curva Standard de Testosterona. Las barras representan la $\bar{M} \pm SD$ (n=10).

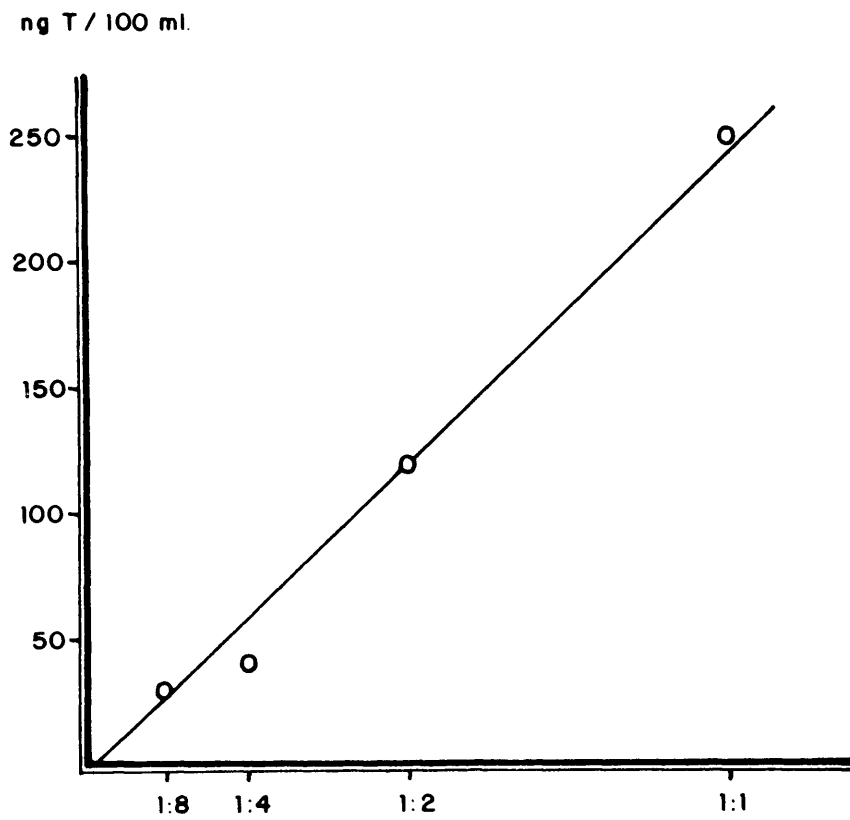


Figura 16.- Curva de Dilución de un Suero Normal.

Además de lo anotado, deben secarse también, en un tubo 3 ml de éter etílico para ver la interferencia del éter en el RIA. Al residuo seco le añadiremos 1 ml de tampón y a esta dilución le llamaremos "control buffer".

2. 4. 3.- Fiabilidad del método

Para ello hemos realizado, varias curvas standard, en primer lugar, como muestra la Figura 15, la cuál tiene un rango de 400 - ng/100 ml a 12,5 ng/100 ml. Podemos ver que en 10 curvas, que la SD tiene en ninguno de los puntos una variación superior al 20%.

Además de ello se realizó una curva de dilución de suero, Figura 16, obteniéndose al representarla en papel milimetrado, una recta que pasa por el origen, probando de esta manera la validez del método.

2. 5.- Determinación de Pregnandiol

El Pregnandiol urinario, se midió en el Laboratorio Central - (Prof. Oriol Bosch), del Hospital Clínico. Se empleó el método de Cromatografía de Gas líquido y en el cuál seguimos las siguientes etapas. (393):

- Hidrólisis: La orina total de 24 horas, que ha sido previamente completada a 1.000ml, en los casos en que la diuresis sea menor. Se toma una alícuota de 4 ml y se la filtra. Se adiciona 1 ml de ácido clorhídrico 5N y ha continuación se dejan 20 minutos en Baño María a 100°C, una vez enfriados se pasa a,
- Extracción y acetilación: se agrega a cada tubo 10 ml de cloruro de metilo y, bien cerrados, se agitan (30 revoluciones/minuto) durante doce minutos, se succiona la parte superior y la inferior se la lava sucesivamente con 3 ml de una solución de carbonato sódico y cloruro sódico; seguidamente se adiciona

0,5 ml de la solución standard y se lava dos veces más con 3 ml de cloruro sódico, se le añade sulfato sódico anhidro se deja secar unos cinco minutos, se traspasa a tubos secos y se procede a evaporar a una temperatura de unos 50°C. Una vez se hayan secado perfectamente los tubos se añade a cada uno 0,2 ml de reactivo de acetilación y se lleva nuevamente a un Baño María a 50°C por treinta minutos.

- Cromatografía: de la mezcla anterior se toman 10-15 µl con pipetas Hamilton y se las seca en corriente aire a unos 40-50°C, se tapa cada cápsula y se pasan por el cromatógrafo.
- Cálculo: se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{mg/día} = \frac{\text{Area de pregnandioli} \times 20 \times \text{diuresis}}{\text{Area de standard} \times 1000 \times \text{alícuota tomada}}$$

2. 6.- Cálculo de resultados

Hemos utilizado la T de Student y para las áreas la fórmula de Simpson, con una Hewlett-Packard, modelo 65.

RESULTADOS

D.- R E S U L T A D O S

1.- Hombres normales

En la Tabla I, podemos ver el Incremento Máximo Absoluto -- (Δ MxA), el Incremento Máximo Porcentual (Δ Mx%) y el Area Total (AT) de la LH y FSH, en pacientes normales masculinos a los cuáles se les inyectaron diferentes dosis de D-Trp⁶-LH-RH, un grupo de 7 pacientes a los cuáles se les inyectó 100 μ g de LH-RH IV y, por fin, otro grupo de pacientes a los cuáles solamente se les inyectó solución salina fisiológica por vía IV en infusión continua durante 8 horas. Hemos podido comprobar que cuando administramos 1 μ g del D-Trp⁶-LH-RH por vía IV en un sólo pulso, no encontramos modificaciones en los valores de LH y FSH. Pero ya con 2,5 μ g, obtenemos una respuesta clara de la LH, pero no así de la FSH. Si seguimos aumentando la dosis podemos observar que existe un incremento de la respuesta a mayor dosis, siendo la máxima respuesta cuando se administra el análogo por vía IV en infusión continua durante 8 horas.

La respuesta de FSH con dosis comprendidas entre 2.5 μ g y 7.5 μ g del D-Trp⁶-LH-RH es muy similar a la que hemos obtenido con una dosis a 50 μ g, y la administramos por vía IV en infusión continua, vemos que la FSH tiene una respuesta significativa ($p < 0.05$).

Se puede ver en la Figura 17, el resultado obtenido tras la administración de 10 y 50 μ g de D-Trp⁶-LH-RH por vía IV en un sólo pulso y de 100 μ g de LH-RH por vía IV. El máximo incremento de LH es alcanzado a los 15 minutos, con dosis de 10 μ g del análogo y 100 μ g de la LH-RH; sin embargo con dosis de 50 μ g del análogo el máximo incremento aparece un poco más tarde, a los 30 minutos. Los niveles de LH alcanzados con dosis de 50 μ g del análogo,

TABLA I.- NIVELES DE LH Y FSH EN SUERO DE HOMBRRES NORMALES DESPUES DEL ESTIMULO CON DIFERENTES DOSIS DE D-TRP⁶-LH-RH

	LH (M ± SD)				FSH (M ± SD)			
	Incremento Máximo Absoluto (mIU/ml)	Incremento Máximo Porcentual (Mx Δ %)	Area Total (8 hrs)		Incremento Máximo Absoluto (mIU/ml)	Incremento Máximo Porcentual (Mx Δ %)	Area Total (8 hrs)	
fusión salina (8hrs) (n=3)	1,17 ± 0,59	75,37 ± 25,01	823,3 ± 547,2		0	0	1161	
LH-RH (100 µg IV) (n=7)	6,7 ± 2,79	320, ± 168,9	628,5 ± 61,47 (x)		0,98 ± 0,65	50,14 ± 47,85	391,9 ± 129,63 (x)	
D-TRP ⁶ -LH-RH								
1 µg IV	1,3	68,4	1168		0,9	20	1112	
2,5 µg IV	5,5	311,7	1869		0,7	10	1357	
5 µg IV	12,8	1066,6	3739		2,9	193,3	1680	
7,5 µg IV	7,1	373,6	3600		1,3	65,0	1344,4	
10 µg IV (n=3)	9,23	506,23 ± 309,42	2756,2 ± 1868,6		0,83 ± 0,83	135,43 ± 96,87	1416,6 ± 484,9	
10 µg IV (=3)	8,00 ± 4,91	333,6 ± 204,41	3931,7 ± 1596,2		0,27 ± 0,71	66,5 ± 11,03	1276,7 ± 606,1	
10 µg IV (n=3)	7,5 ± 1,45	439 ± 158,04	3643,1 ± 1105,04		0,6 ± 0,26	35,67 ± 12,6	1064,6 ± 313,7	
10 µg 8hrs infusión(n=3)	11,37 ± 5,9	382 ± 220	4255,7 ± 1951,8		1,17 ± 0,85	50,17 ± 44,38	1563,7 ± 719,7	
50 µg IV (n=3)	18 ± 1,31	1106 ± 530,5	7992,7 ± 704,5		0,76 ± 0,05	26,87 ± 12,08	1049,8 ± 186,7	
50 µg 8hrs infusión(n=3)	34,7 ± 28,15	2046 ± 1159,5	13505,9 ± 10760,3		7,6 ± 9,9	543 ± 619	2622,5 ± 1442,3	

(x) Area total en 2 horas

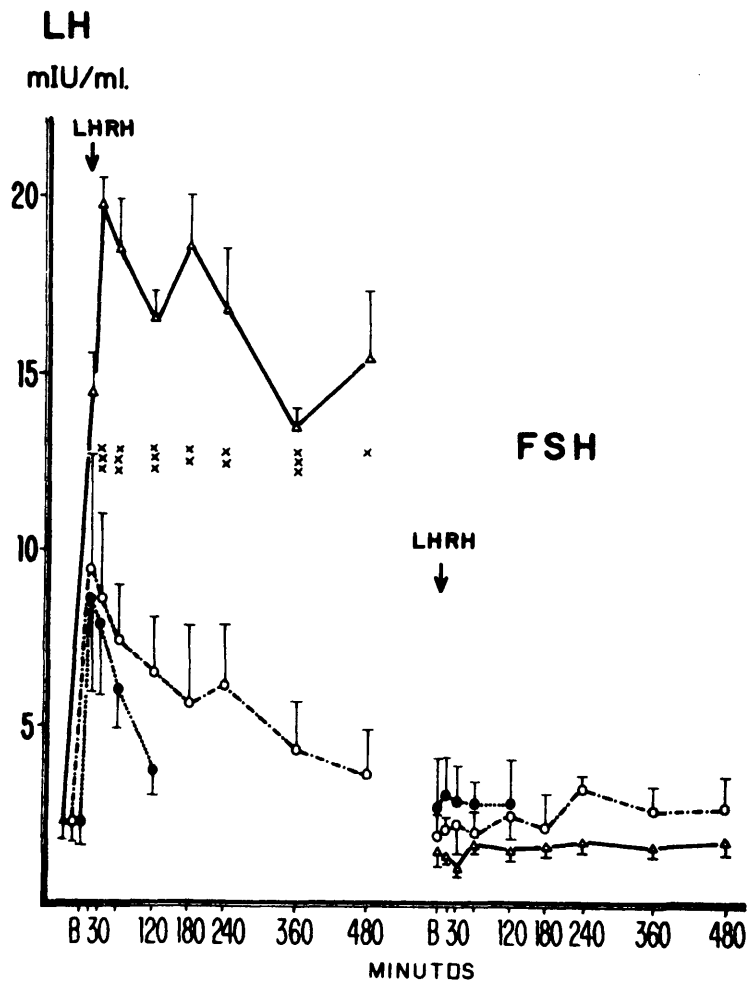


Figura 17.- Niveles de LH y FSH en Hombres Normales tras la administración IV en un sólo pulso de D-Trp⁶-LH-RH. 100 µg LH-RH (n=7) (●...●); 10 µg D-Trp⁶-LH-RH (n=4) (o...o) y 50 µg de D-Trp⁶-LH-RH (n=3) (Δ—Δ). Las líneas verticales indican el Error Standard. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$. x= P 0.05, xx= p 0.02, xxx= p 0.01.

a partir de los 30 minutos son significativamente superiores a los obtenidos con 10 μg del análogo y 100 μg del LH-RH con una $p < 0.05$, en todos los puntos, y, al menos durante 8 horas.

La cinética de la respuesta de LH y FSH, después de la estimulación con una misma dosis de D-Trp⁶-LH-RH (10 μg), pero comparando dos vías, la IV en un sólo pulso y la de la infusión continua en 8 horas, la podemos ver en la Figura 18. En ella podemos observar que el máximo incremento de la LH por vía IV en un sólo pulso la obtenemos a los 15 minutos, y en cambio por vía IV en infusión continua, los máximos valores se alcanzan a las 8 horas. Los valores por vía IV en un sólo pulso son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los valores encontrados con la infusión continua a los 15 y 30 minutos, mientras que al final de la prueba, los valores de LH alcanzados por infusión continua son significativamente superiores a los obtenidos por vía IV en un sólo pulso. Los valores de FSH, no sufren modificaciones con las dosis vías de administración del análogo.

La cinética de respuesta de la LH y FSH, obtenida tras el estímulo de una misma dosis (10 μg) administrada por vía IM y SC la podemos ver en la Figura 19. Los valores máximos de la LH, se alcanzan a los 180 minutos. A los 480 minutos los niveles de la LH, se mantienen muy por encima de los valores basales. Las variaciones que sufre la FSH son comparables a las que hemos obtenido con 100 μg . No existen diferencias significativas entre estas dos vías de administración.

Podemos ver la respuesta de LH y FSH, obtenida tras el estímulo con 50 μg de D-Trp⁶-LH-RH, por vía IV en un sólo pulso y por vía IV en infusión continua de 8 horas, Figura 20. En el

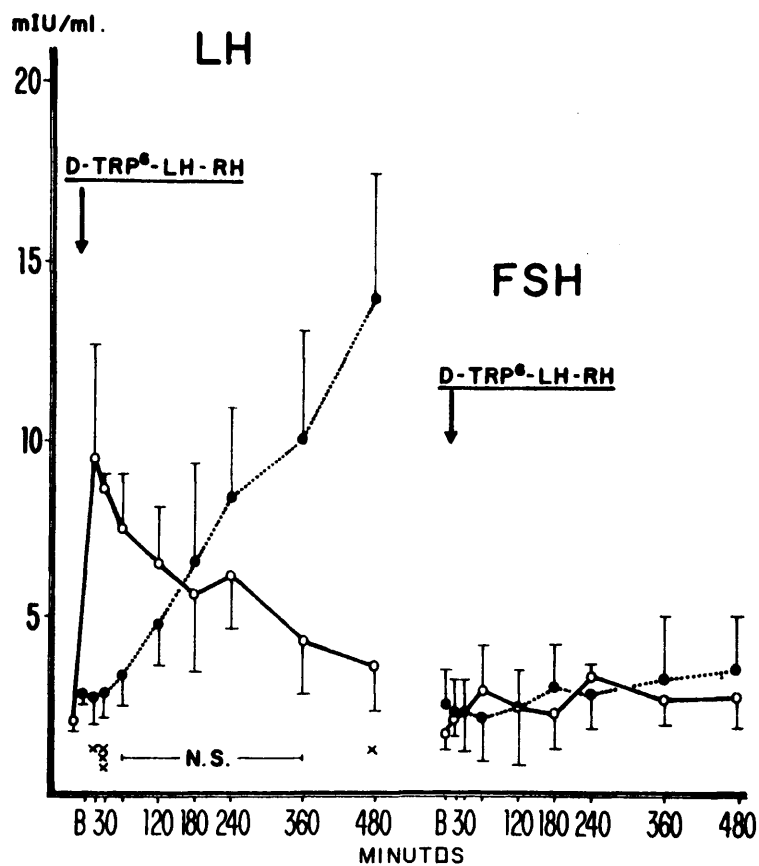


Figura 18.- Respuesta de LH y FSH tras la administración de D-Trp⁶-LH-RH (10 µg) IV en un sólo pulso (o—o) y IV en infusión continua (●...●). Las barras indican la SE. (x)=p < 0.05; (xxx)= p < 0,001. Las barras indican M ± SE (n=3).

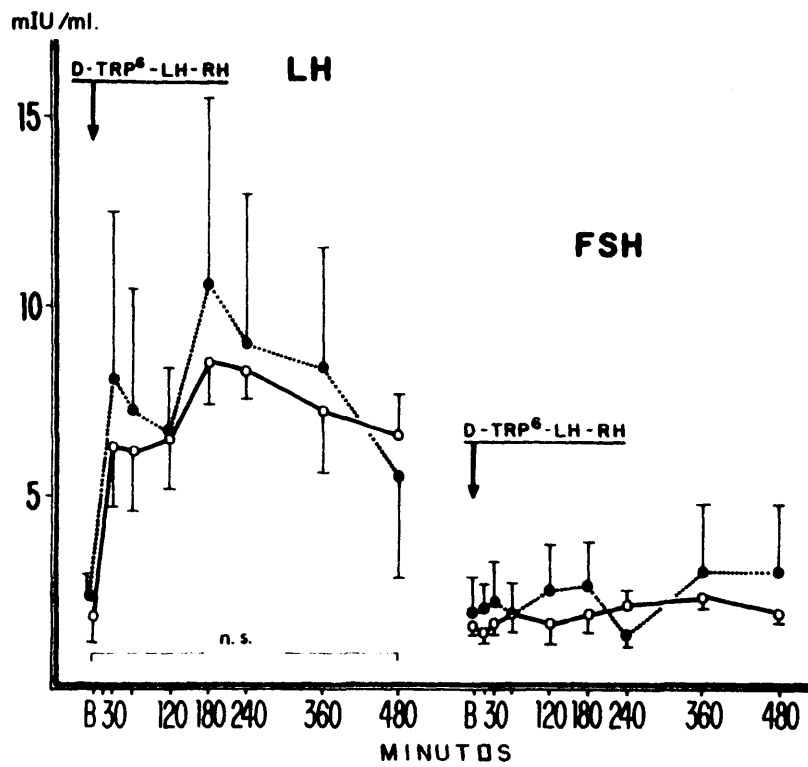


Figura 19.- Niveles de LH y FSH en Hombres Normales tras la administración IM (o—o) y SC: (●...●) de 10 - µg del Análogo. Las barras indican $M \pm SE$ (n=3).

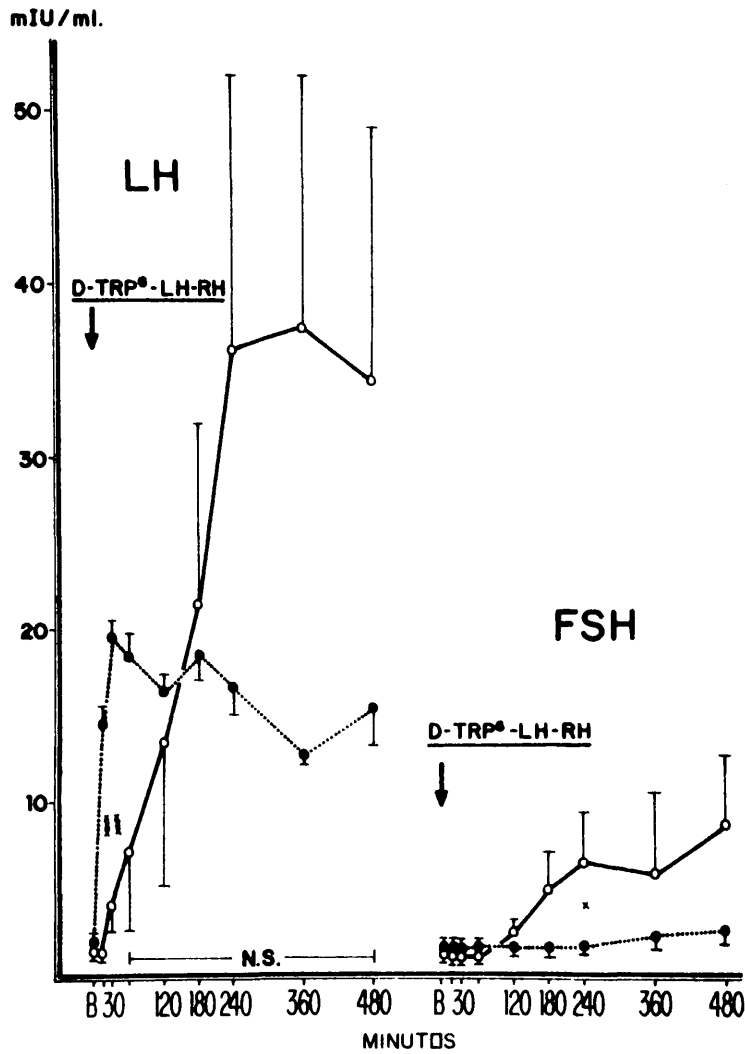


Figura 20.- Cinética de la respuesta de LH y FSH en Hombres Normales tras la administración de 50 μ g del -- Análogo. (●...●) IV en un sólo pulso y (o—o) IV en infusión continua. (x) = $\leq 0,05$. (xxx) = $p < 0,001$. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3).

primer caso, el incremento máximo se alcanza a los 30 minutos, - mientras que con la infusión el máximo valor de la LH se alcanza a los 240 minutos, manteniéndose altos hasta los 480 minutos.

Los valores de la FSH, a partir de los 180 minutos, cuando - la vía de administración es IV en infusión continua, empiezan a tener valores significativamente superiores a los basales ($p < 0.05$) y esta significancia dura hasta las 8 horas. Y comparando los - valores obtenidos por esta vía, con los obtenidos por vía IV en - un sólo pulso podemos ver que a los 240 minutos son significativa - mente diferentes con una $p < 0.05$.

Si comparamos una misma vía de administración, IV en infusión - continua, pero con diferentes dosis del análogo, (ver Figura 21), podemos observar que los valores de LH y FSH, tras la estimulación con 50 μg , alcanzan su máximo incremento a los 240 minutos, mien - tras que con 10 μg , estos valores máximos son alcanzados a los -- 480 minutos. Los valores de LH y FSH, tras el estímulo con 50 μg son mucho más altos que los obtenidos con 10 μg , pero sin llegar a ser significativamente diferentes.

Las variaciones fisiológicas de la LH y Testosterona, en un - grupo de hombres normales, a los cuáles se les inyectó solamente suero fisiológico Figura 22. Durante este período hemos podido - comprobar, que la LH sufre variaciones entre 1 y 3 mIU/ml, mien - tras que la Testosterona, en términos de media, tiene variaciones entre 300 y 800 ng/100 ml.

Podemos ver la cinética de respuesta de la LH y Testosterona, después de la administración de 10 μg de D-Trp⁶-LH-RH por vía IV en un sólo pulso. El pico de la LH se obtiene a los 15 minutos,

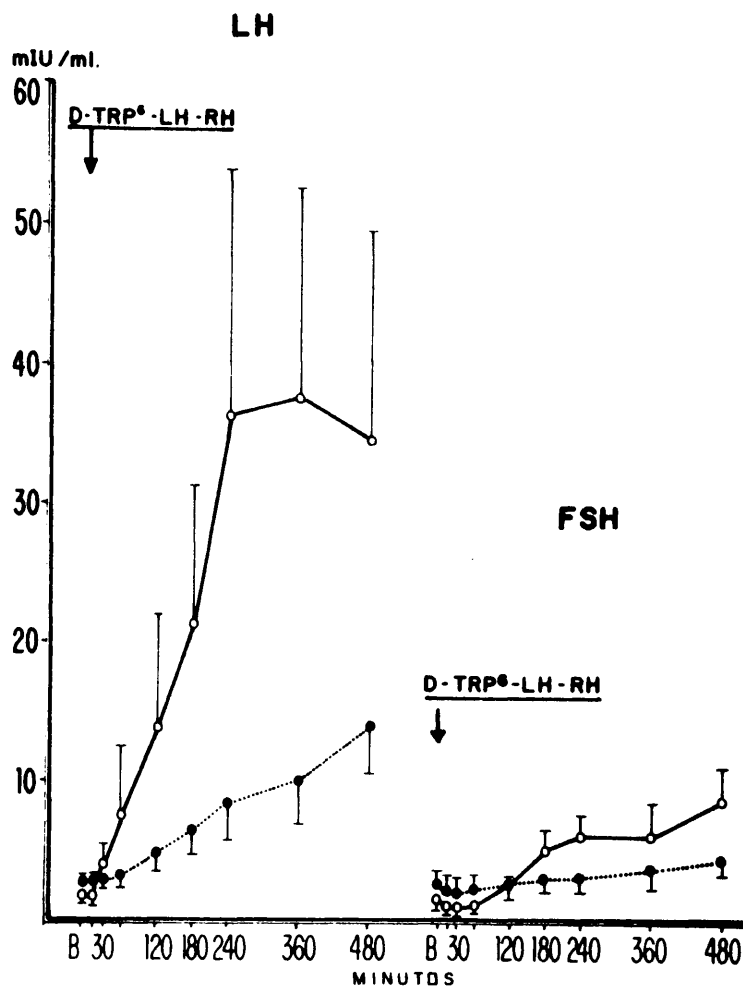


Figura 21.- Comparación de la Cinética de LH y FSH, utilizando una misma vía (IV en insuición continua) tras la administración de 10 ug (●...●) y 50 ug (○—○) del Análogo. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3).

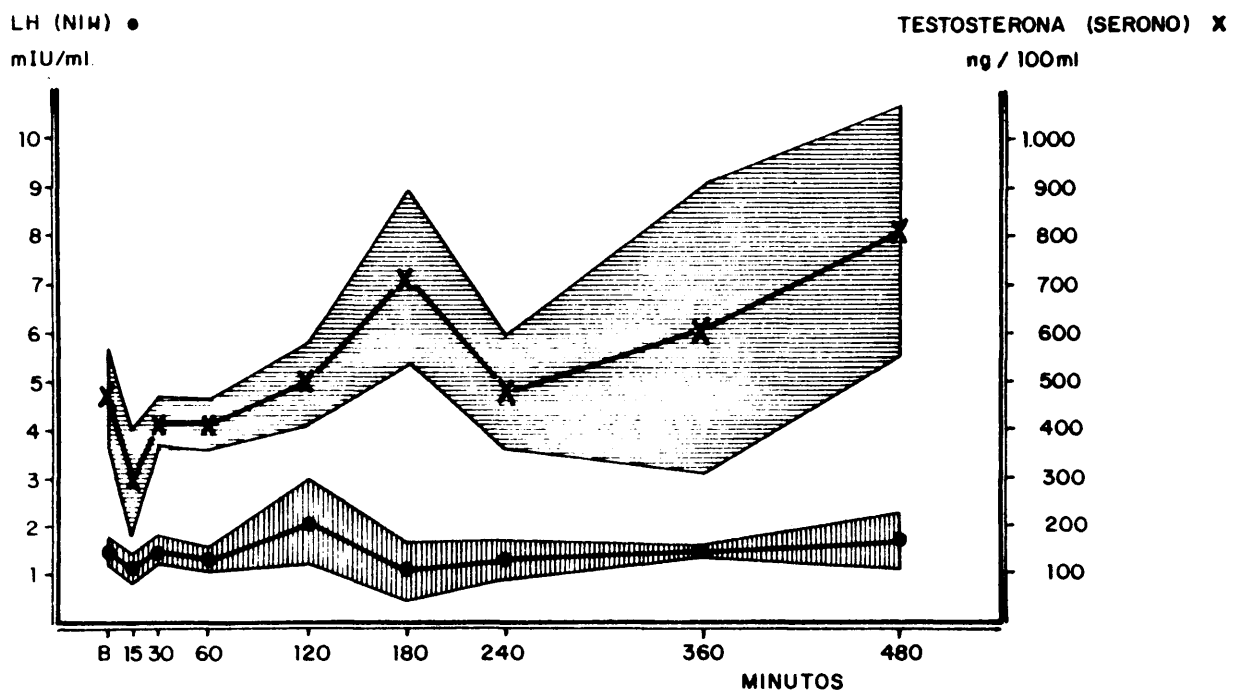


Figura 22.- Niveles Séricos en Hombres Normales de LH(●—●) y Testosterona (x—x). Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3).

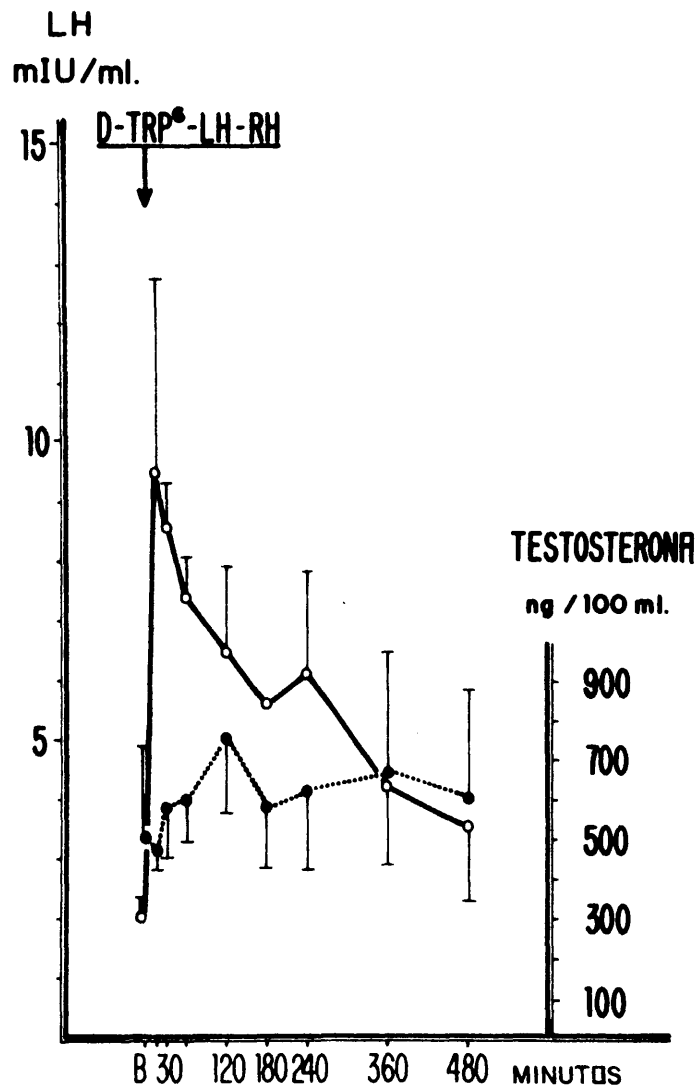


Figura 23.- Niveles de LH (o—o) y Testosterona (●...●) tras la administración de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH, IV en Infusión continua. Las barras indican $\bar{M} \pm SE (n=3)$

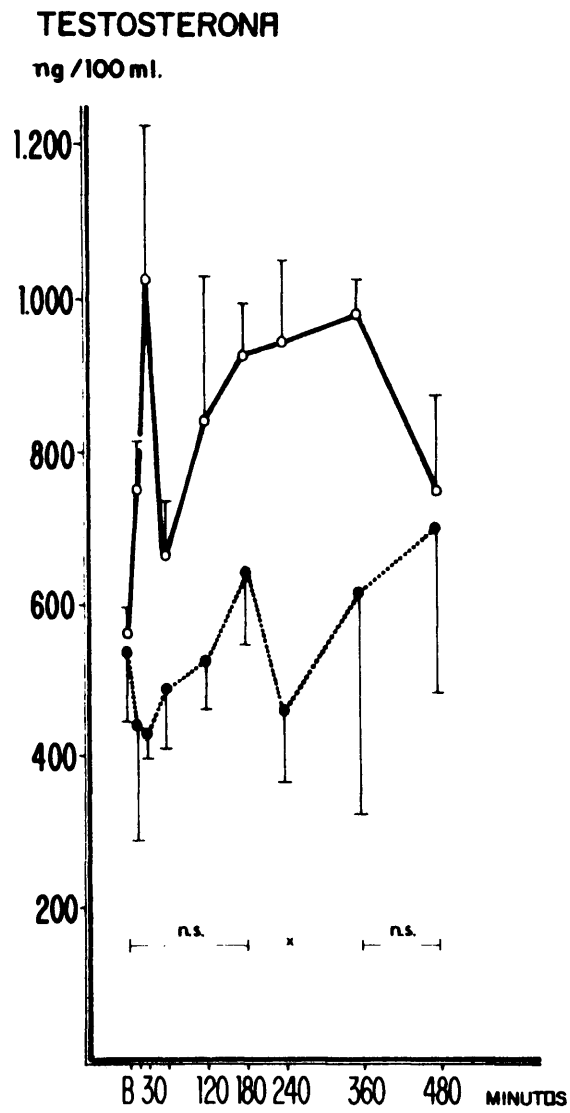


Figura 24.- Comparación de los Niveles de Testosterona en condiciones basales (●...●) y tras la administración de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH (o—o). Las barras indican M ± SE (n=3). x=(p < 0.05).

mientras que el de la Testosterona se obtiene a los 180 minutos, a partir del cuál, los valores se mantienen por encima de los basales. (Fig. 23).

Si comparamos la respuesta de la Testosterona, obtenida tras el estímulo de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH, en condiciones basales, durante un período de 8 horas, Figura 24, se ve claramente que los valores de Testosterona se incrementa, después de administrar el análogo llegando a ser significativamente diferentes ($p < 0.02$) a los 240 minutos.

2.- Mujeres normales

En la Tabla II, mostramos los resultados de LH y FSH, en relación al Incremento Máximo Absoluto (ΔMx_A), al Incremento Máximo Porcentual ($\Delta Mx\%$) y al Area Total (AT) en mujeres en fase folicular (8-10 días del ciclo) después de: 1.- Infusión IV continua de 8 horas de una solución salina; 2.- Administración de 100 µg - de LH-RH por vía IV en un sólo pulso y 3.- Administración de D-Trp⁶-LH-RH, por diferentes vías y con distintas dosis. Al igual que en los hombres, las dosis de 1 µg, no modifican los valores de LH y FSH. Pero cuando se administran 5 µg IV en un sólo pulso, el ΔMx_A es dos veces superior al encontrado tras el estímulo con 100 µg de LH-RH. A medida que aumentamos la dosis, las respuestas, tanto de LH como de FSH, van aumentando. Los máximos incrementos los encontramos con 50 µg por vía IV en un sólo pulso, y las áreas totales obtenidas con esta dosis, son dos veces superiores a las obtenidas con 10 µg.

La respuesta de la LH y FSH, en mujeres normales en fase folicular, después de la administración de 10 y 50 µg de D-Trp⁶-LH-RH

TABLA II.- NIVELES DE LH Y FSH, TRAS LA ADMINISTRACION DE D-TRP⁶-LH-RH EN DIFERENTES DOSIS Y POR DIFERENTES VIAS EN MUJERES NORMALES EN FASE FOLICULAR (8-10 días del ciclo)

Nº. de Pacientes	LH (Media ± SE)	Incremento Máximo	Incremento Porcentual (MxΔ %)	Area Total (8 hrs)	FSH (Media ± SE)		Area Total (8 hrs)
					Incremento Máximo	Incremento Porcentual (MxΔ %)	
Infusión salina (8hrs)	3	0,54 ± 0,29	21,0 ± 0,58	685,6 ± 329,4	1,03 ± 0,32	49,67 ± 23,31	1438,1 ± 257,3
00 µg LH-RH IV	9	8,47 ± 1,34	499,3 ± 167,57	1194,6 ± 126,97	2,91 ± 0,4	77,11 ± 9,96	668,56 ± 83,22
-Trp ⁶ -LH-RH							
1 µg IV	1	0,7	21,2	1730,0	0,5	14,29	1933,0
5 µg IV	1	15,4	592,3	5922,0	7,5	300,00	2574,0
7.5 µg IV	2	50,4	3150,0	16069,0	21,0	700,00	5543,5
10 µg IV	3	62,7 ± 10,2	2178,7 ± 603,4	17103,4 ± 1945,19	14,8 ± 6,3	995,8 ± 363,3	5722,9 ± 2319,4
10 µg IM	3	33,03 ± 11,24	1624,4 ± 92,72	10610,3 ± 3660,0	5,67 ± 1,62	167,3 ± 42,61	3290,2 ± 596,1
10 µg Infusión (8hrs)	3	14,25 ± 8,23	2614,48 ± 2098,2	5422,5 ± 2656,2	5,63 ± 1,97	330,1 ± 136,66	2475,9 ± 728,7
50 µg IV	3	49,6 ± 7,24	2215,67 ± 389,78	15259,5 ± 1666,2	26,8 ± 3,12	842,67 ± 65,36	10871,3 ± 1808,9

(a) Area Total en 2 horas

(****) p < 0.001 en comparación con LH-RH

(*) p < 0.05 en comparación con LH-RH

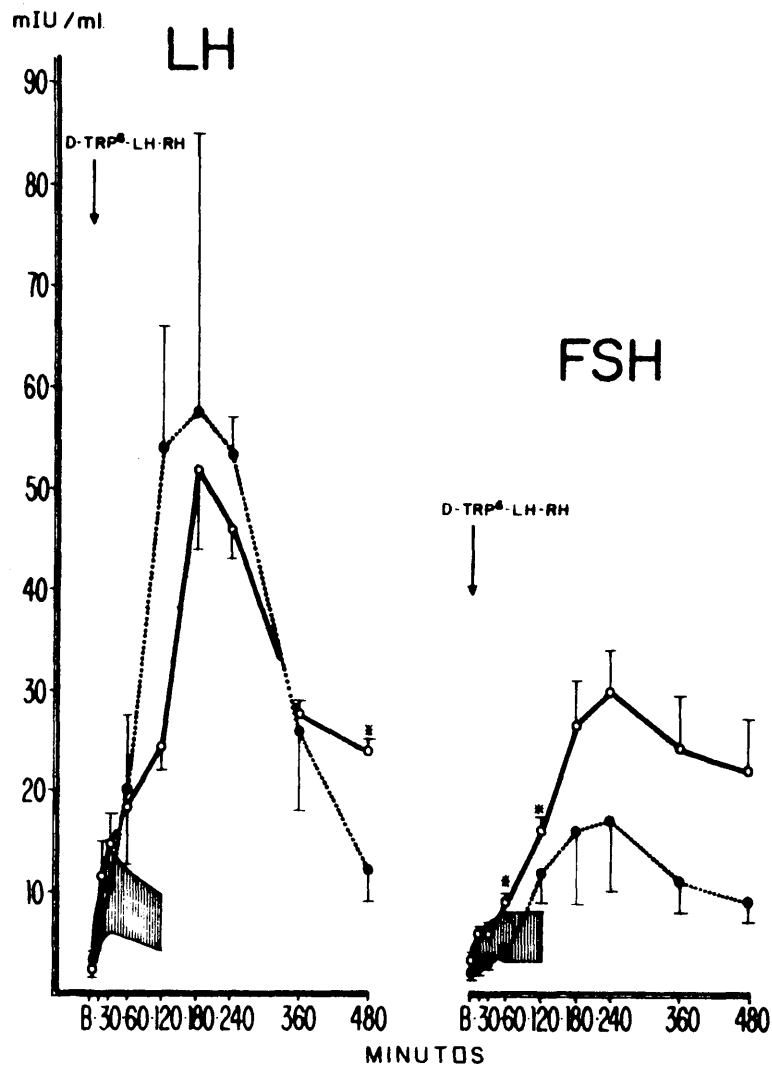


Figura 25.- Cinética de producción de LH y FSH en Mujeres - Normales en fase Folicular, tras la administración de D-Trp⁶-LH-RH IV en un sólo pulso 10 µg (●...●) y 50 µg (○—○) $\bar{M} \pm SE$ (n=3). El área - rayada corresponde a 100 µg de LH-RH. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=7). * $p < 0.05$.

y después de 100 µg de LH-RH vía IV en un sólo pulso. Los valores de la LH, después de la inyección del análogo, en ambos casos, son muy similares, excepto a los 480 minutos, en el cuál -- los valores de la LH tras la administración de 50 µg son significativamente superiores ($p < 0.05$) a los encontrados con 10 µg. En los dos casos los valores de LH, a los 60 y 120 minutos, son significativamente superiores ($p < 0.05$) a los obtenidos con 100 µg de LH-RH. En relación a la FSH, podemos observar que a partir de los 15 minutos y hasta los 60 minutos, los valores obtenidos tras la administración de 50 µg son significativamente superiores ($p < 0,05$) a los obtenidos con 10 µg del análogo. En comparación a lo que se obtiene con 100 µg, podemos ver que a los 60 minutos tanto los valores obtenidos con 50 µg son significativamente superiores ($p < 0,05$) y a los 120 minutos, los valores de FSH luego del estímulo con 10 y 50 µg, son significativamente superiores a los obtenidos con 100 µg de LH-RH.

En los dos casos, después de la administración del análogo -- los valores de la LH y FSH son, a las 8 horas, significativamente superiores ($p < 0,05$) a los valores basales.

En la Figura 25, podemos observar los resultados obtenidos -- cuando, utilizando una misma dosis (10 µg), damos el análogo por diferentes vías: IV en un sólo pulso, IV en infusión continua de 8 horas, e IM. Cuando se administra por vía IM, tanto la cinética de respuesta de la LH como la de la FSH, son muy similares, -- siendo unos valores, (en el caso de la vía IM), mucho más bajos que los obtenidos por vía IV en un sólo pulso, pero sin llegar a ser significativamente diferentes. La respuesta más baja es obtenida cuando se administra el análogo por vía IV en infusión -- continua. Los valores son significativamente más bajos, en rela

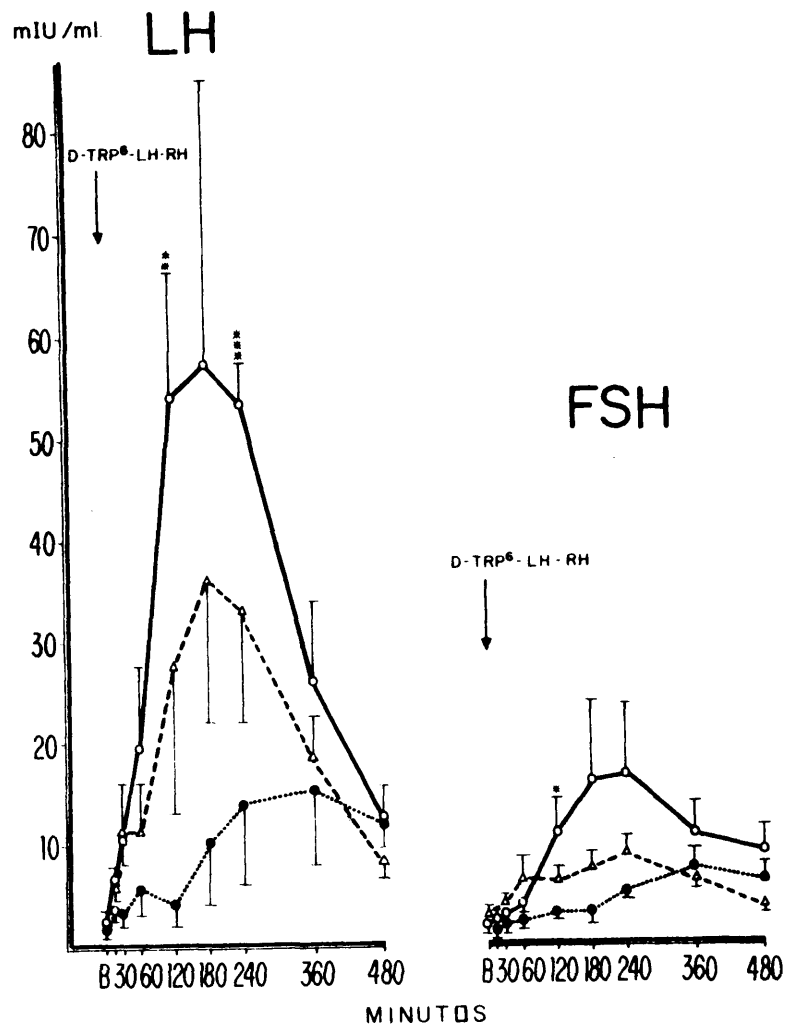


Figura 26.-Niveles Séricos de LH y FSH, en respuesta a la administración de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH, por diferentes vías: IV en un sólo pulso (o—o);- IM (Δ---Δ) e IV en infusión continua (●...●) Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3). * $p < 0.05$. ** $p < 0.02$. *** $p < 0.01$.

ción a los obtenidos con la administración IV en un sólo pulso, a los 120 minutos con una $P < 0,02$ y a los 240 minutos, con una $p < 0,01$. Por lo que respecta a los valores de FSH, sucede un fenómeno parecido, pero en comparación con los de LH siempre son menores. Únicamente hemos encontrado, que los valores de FSH son significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los 120 minutos, cuando se compara la vía IV en un sólo pulso con la vía IV en infusión continua.

La respuesta de LH y 17β estradiol en suero, tras la administración de $10 \mu\text{g}$ del análogo por vía IV en un sólo pulso, podemos verla en la Figura 27. El pico de la LH se obtiene a los 180 minutos después de la inyección del análogo y el pico del 17β -estradiol se alcanza a los 360 minutos, de comenzar la prueba, o sea 3 horas más tarde que el pico de la LH. A los 480 minutos los valores del 17β estradiol, son significativamente más altos que los valores basales ($p < 0,05$).

Los valores de LH y FSH, obtenidos tras la administración IV de infusión continua de 8 horas ($10 \mu\text{g}$) en las diferentes fases del ciclo menstrual, Figura 28. En la fase ovulatoria el incremento máximo de la LH y FSH, es mucho más rápido que en las otras fases y en segundo lugar, el área total en la fase ovulatoria es dos veces superior a las otras dos fases.

En la Figura 29, se ilustra la respuesta de LH y FSH obtenida en fase luteínica después del estímulo con 10 y $5 \mu\text{g}$ del D-Trp-LH-RH vía IV en un sólo pulso. Como se puede observar no existen diferencias de los valores obtenidos con estas dos dosis y además, con muy similares a los obtenidos en fase folicular.

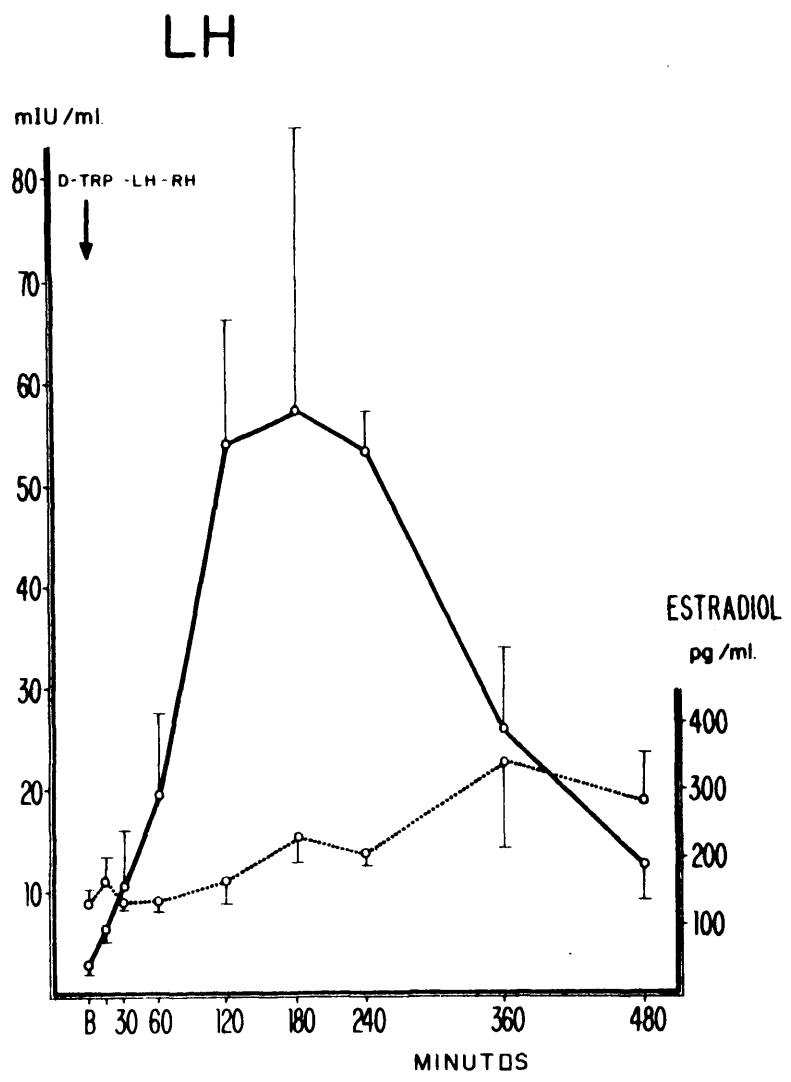


Figura 27.- Niveles de LH (o—o) y 17 β -Estradiol(o...o) en Mujeres tras la administración de 10 μ g de D-Trp⁶-LH-RH. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3).

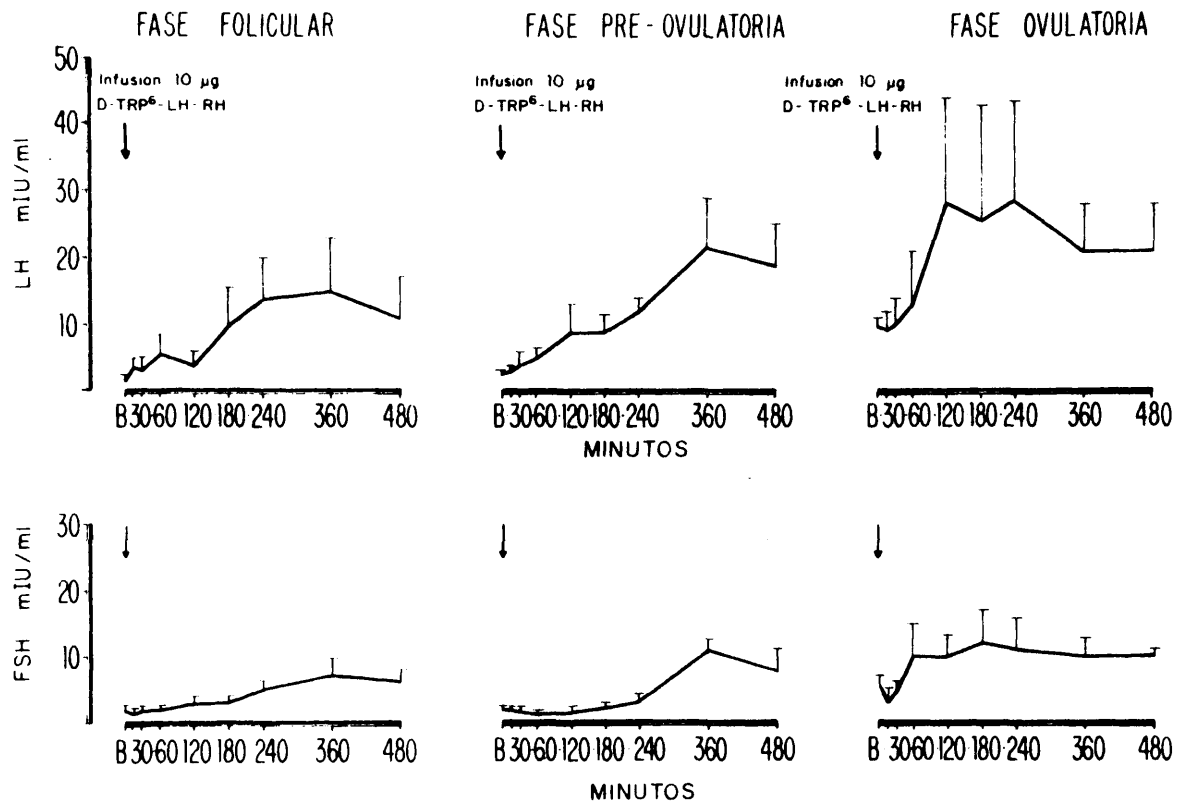


Figura 28.- Comportamiento de la LH y FSH, tras la administración IV en infusión continua de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH en las diferentes fases del ciclo menstrual. $\bar{M} \pm SE$ (n=3).

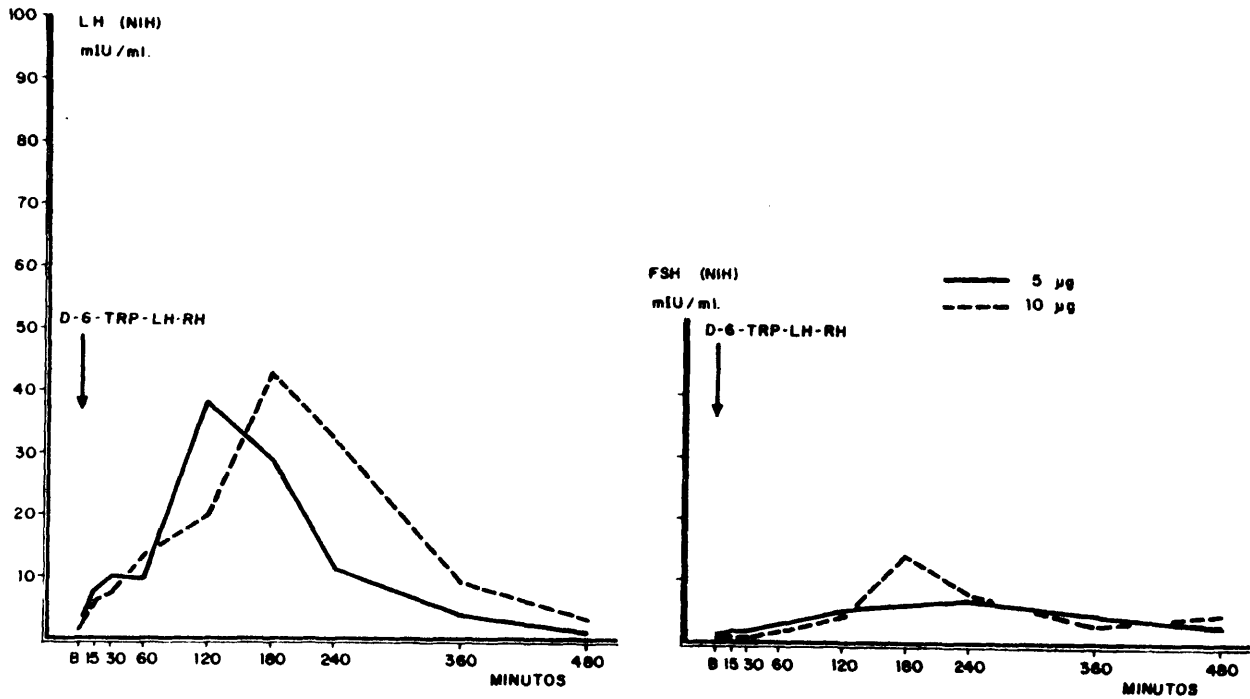


Figura 29.- Niveles de LH y FSH en fase luteínica, tras la administración IV en un sólo pulso de 5 µg (—) y 10 µg (---) del análogo.

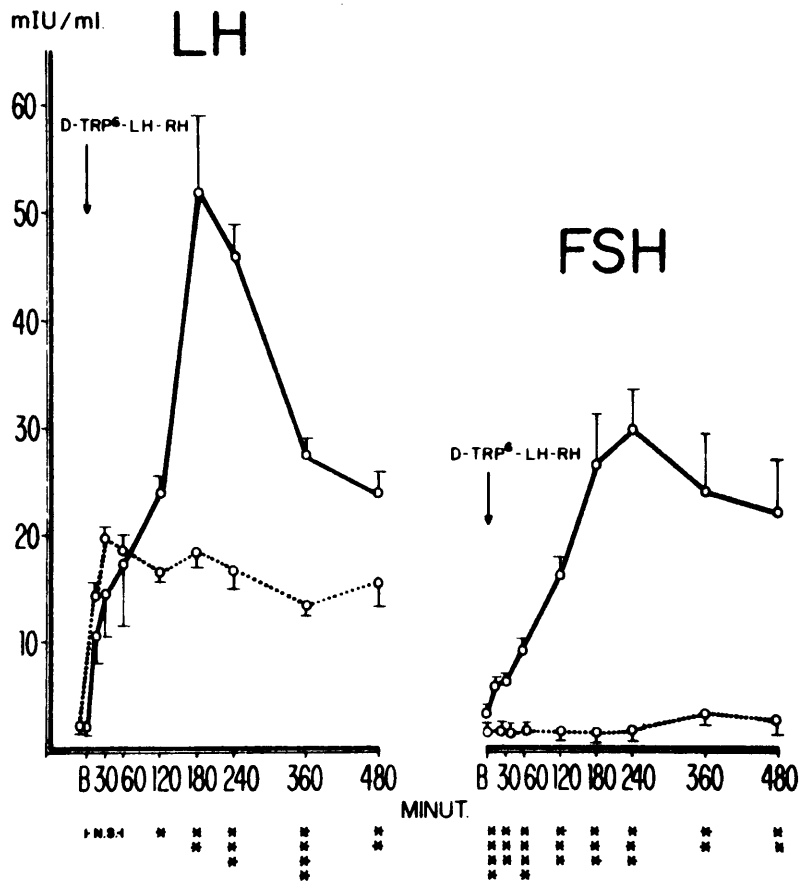


Figura 30.-

Comparación de los niveles de LH y FSH, obtenidos tras la administración IV en un sólo pulso de 50 µg de D-Trp⁶-LH-RH, en hombres (o...o) y en mujeres (o—o) normales. Las barras indican $\bar{M} \pm SE$ (n=3). * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$.

Comparamos la respuesta de LH y FSH, obtenida con la administración de 50 µg, en mujeres en fase folicular y en hombres, por vía IV en un sólo pulso, Figura 30. En las mujeres, el análogo libera una gran cantidad de gonadotropinas, siendo los valores de LH, significativamente superiores ($p < 0,05$) a partir de los 120 minutos y los de la FSH ($p < 0,02$) a partir de los 15 minutos.

3.- Pacientes masculinos con Hipogonadismo Hipogonadotrópico

3. 1.- Datos de laboratorio

Los valores basales de LH y FSH en plasma fueron indetectables en nuestro RIA, en los tres pacientes, y la prueba del Clomifeno, en cada caso, fué negativa.

En la Figura 31, podemos ver la respuesta de la LH y FSH, en los tres pacientes y en hombres normales, tras la administración de 10 µg de D-Trp⁶-LH-RH. En los tres pacientes hubo respuesta de ambas gonadotropinas siempre más baja que lo normal, excepto en uno (G.S.P.), en el cuál la respuesta de FSH fué superior.

En la Tabla III, hemos resumido los datos clínicos y hormonales de los tres pacientes hipogonadales, antes y después del tratamiento con 10 µg IM 3 veces al día. Las gonadotropinas, fueron siempre detectadas por nuestro RIA (Tabla III) y los valores de la Testosterona, que basalmente tuvo unos niveles de 60 y 70 ng/100 ml, se duplicaron durante el tratamiento en términos de media, y en algún caso, este valor, se quintuplicó.

3. 2.- Resultados clínicos

Paciente 1 (E.R.S.): tras el tratamiento, este paciente había crecido 3 cms. de talla, había aumentado 4 kilos de peso y había -

TABLA III.- EVALUACION CLINICA Y NIVELES DE GONADOTROPINAS Y TESTOSTERONA ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON D-TRP⁶-LH-RH (10 µg IM^c/8 horas) EN TRES PACIENTES CON HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

Escala de Tanner	ANTES DEL TRATAMIENTO				DESPUES DEL TRATAMIENTO				Testost (ng/100ml)								
	Testículos Tamaño	Pene Edad	Gonadotropinas (mIU/ml)	LH	Testículos Tamaño	Pene Edad	Gonadotropinas (mIU/ml)	LH									
E.R.S.) 19	1	<2	2	<2	2	5	<0,8	70	4	8	10	13	15	8	1,2	0,82	107+75
R.H.F.) 20	1	<2	<2	<2	4	4	<0,8	62,5	3-2	10	6	14	12	4	2,1	0,87	130+39
G.S.P.) 22	1	2	2	2	2	4	<0,8	60	2	6	4	12	11	4	1,3	2,31	121,3+

* Media ± SD

FSH

+0,34 (n = 1)

+0,72 (n = 1)

+0,94 (n = 1)

LH

+0,34

+0,8

+0,2

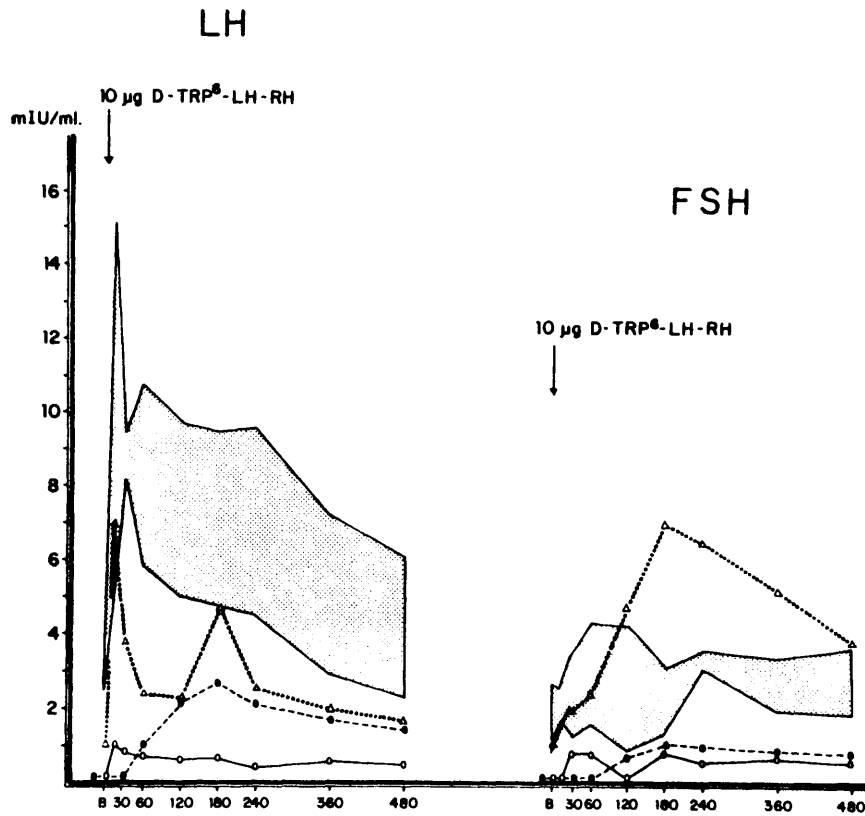


Figura 31.- Respuesta de la LH y FSH, tras la administración de 10 µg IV en un sólo pulso, en tres pacientes varones hipogonadales-hipogonadotrópicos. Paciente 1 (E.R.S.) (●---●); Paciente 2 (R.H.F.) (o—o) y Paciente 3 (G.S.P.) (Δ...Δ). El área sombreada es la respuesta en hombres normales. $\bar{M} \pm SD$ (n=3).

desarrollado los siguientes caracteres sexuales: vello axilar y púbico, bigote, la libido apareció a las 4 ó 5 semanas de comenzar el tratamiento, tuvo varias poluciones nocturnas. El pene - le creció 3 cms. En la escala de Tanner, pasó al grado 4 y los testículos en la escala de Waaler, después del tratamiento, correspondían el derecho a un grado 8 y el izquierdo a un grado 10, lo cuál equivale en la misma escala a unos 13 años para el derecho y 15 para el izquierdo.

Paciente 2 (R.H.F.): este paciente desarrolló el vello axilar, el vello púbico, bigote y vello en brazos y piernas. En la escala de Tanner alcanzó un grado 2-3 y los testículos en la escala de Waaler alcanzaron un tamaño equivalente a 10 para el derecho y 6 para el izquierdo, lo que correspondía a unas edades de 14 y 12 años respectivamente.

Paciente 3 (G.S.P.): este paciente después del tratamiento desarrolló el vello axilar y púbico y, discretamente, el bigote. En la escala de Tanner pasó al grado 2 y sus testículos tuvieron un valor de 6 para el derecho y 4 para el izquierdo, en la escala de Waaler, lo que correspondía a edades de 12 y 11 años respectivamente.

3. 3.- Biopsias

En las Figuras: 32,33,36,37,40 y 41, se muestran las fotografías de las biopsias testiculares de los tres pacientes antes del tratamiento y, en las Figuras: 34,35,38,39,42 y 43, las de las biopsias testiculares post-tratamiento. El compendio de las biopsias lo hemos hecho en la Tabla IV, en la cuál de una manera convencional hemos indicado NORMAL, con cuatro cruces. Como resumen de todo lo expuesto en estas figuras y en la tabla, podemos decir que -

TABLA IV.- BIOPSIA TESTICULAR PRE Y POST-TRATAMIENTO CON D-TRP⁶ -LH-RH

	Membrana Basal	Células Germinales	Células de Leydig	Células de Sertoli	Edema Intersticial
<u>Paciente 1 (E.R.S.)</u>					
Pre-tratamiento	++++	++	+	++++	-
Post-tratamiento	++++	+++	++	+++++	++
<u>Paciente 2 (R.H.F.)</u>					
Pre-tratamiento	+++++	++	+	++++	-
Post-tratamiento	++++	++	++	++++	++
<u>Paciente 3 (G.S.P.)</u>					
Pre-tratamiento	++++	++	+	+++	-
Post-tratamiento	+++ 0	++	+++	+++ 0	++
	++++		++++		

+ muy disminuído
 ++ bastante disminuído
 +++ poco disminuído
 ++++ NORMAL
 +++++ discretamente aumentado
 +++++ más aumentado



Figura 32.- Biopsia testicular pre-tratamiento, correspondiente al Paciente (E.R.S.). Aumento 10X. Túbulos seminíferos disminuídos, escasas células -- germinales y de Sertoli.

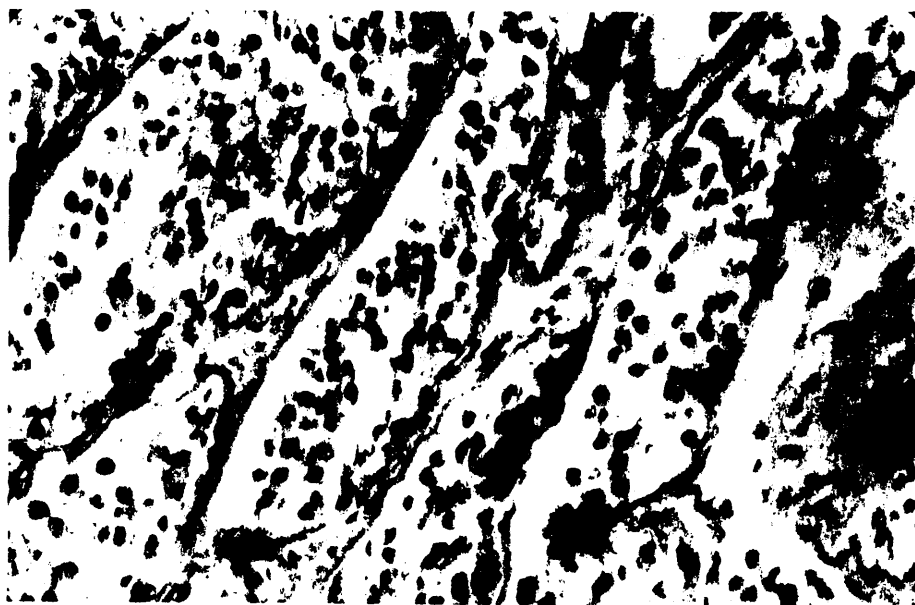


Figura 33.- La biopsia anterior a 25X.



Figura 34.- Biopsia testicular post-tratamiento del Paciente 1 (E.R.S.). Aumento 10X. Se aprecia un aumento de células germinales, de Leydig y de Sertoli, con respecto a las anteriores (32-33). Lige ro edema intersticial.

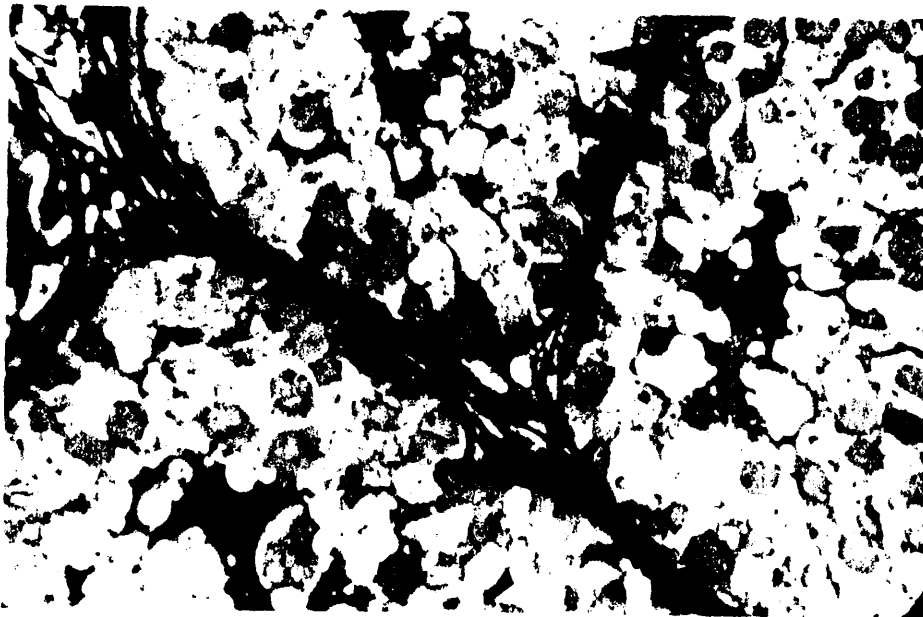


Figura 35.- Microfotografía de la Biopsia post-tratamiento del Paciente 1 (E.R.S.), en la que se ven claramente varias espermátides.



Figura 36.- Biopsia testicular pre-tratamiento del Paciente 2 (R.H.F.). Aumento 10X. Túbulos seminíferos -- disminuídos Células germinales de Leydig y de Sertoli en número menor que lo normal.



Figura 37.- La Biopsia anterior a 25X.

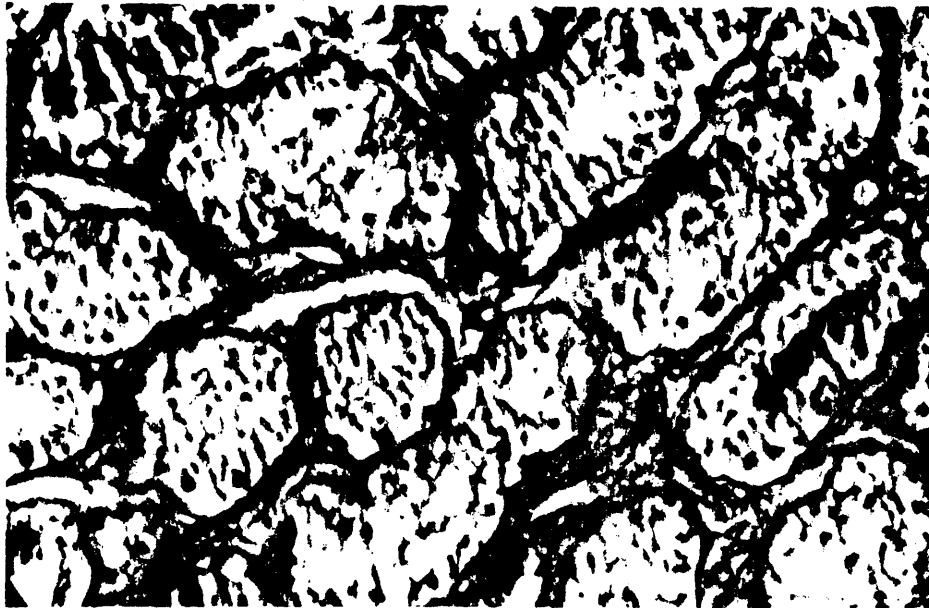


Figura 38.- Biopsia-Testicular post-tratamiento del Paciente 2. Aumento 10X. Túbulos con basal engrosada.- En relación a las anteriores se ve un aumento - de las Células de Leydig. Las células germinales aunque ligeramente aumentadas, se mantienen indiferenciadas.

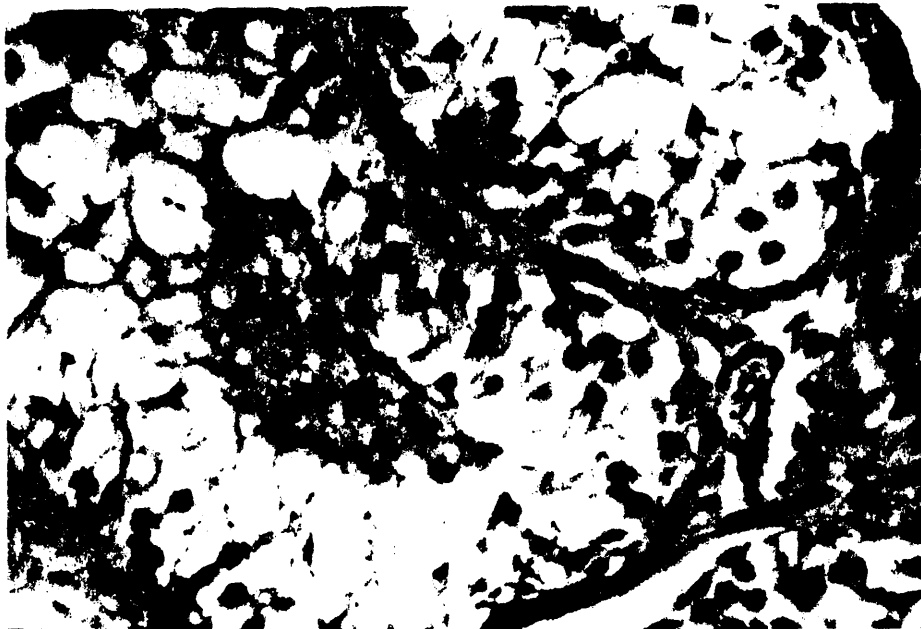


Figura 39.- Detalle de la Biopsia anterior.

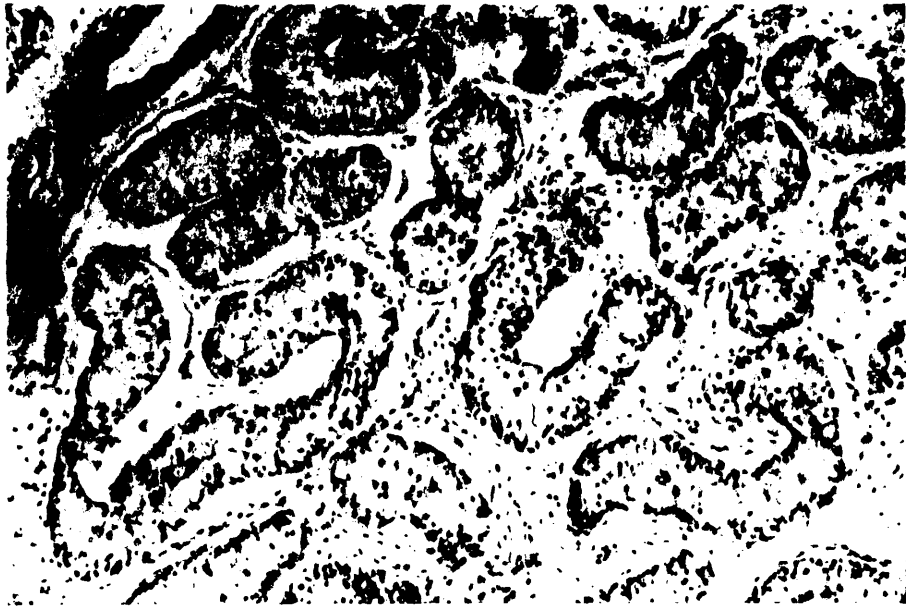


Figura 40.- Biopsia testicular pre-tratamiento del Paciente 3 (G.S.P.). Aumento de 10X. Túbulo con basal - engrosada y muy escaso intersticio. Células de Leydig escacísimas.

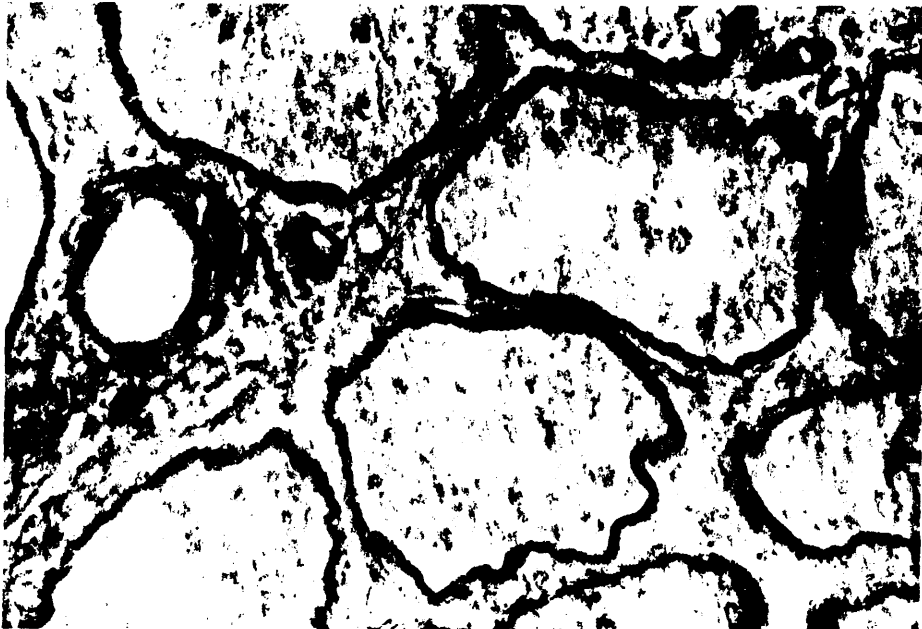


Figura 41.- La Biopsia anterior a 25X.

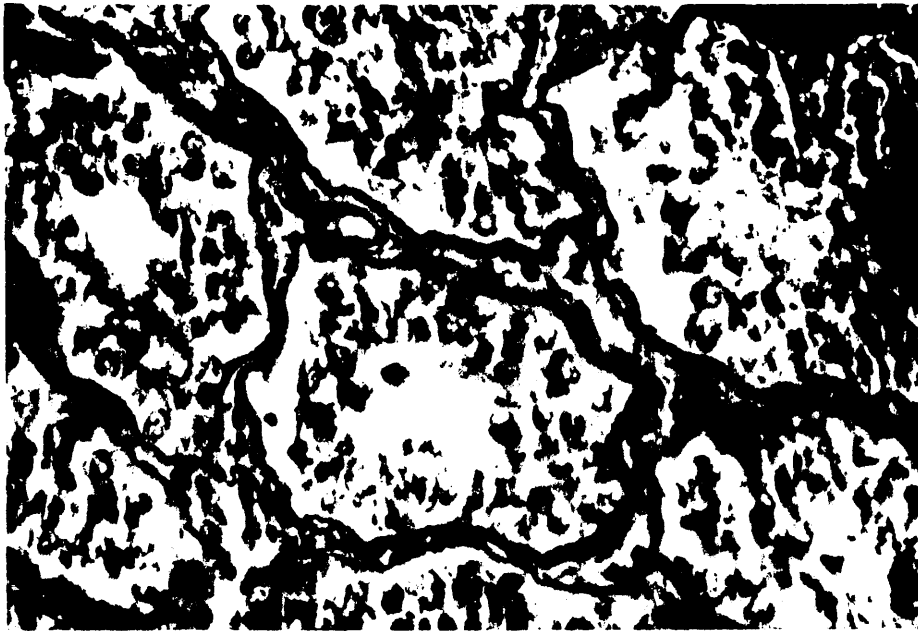


Figura 42.- Biopsia post-tratamiento, aumento 25X. Destaca sobre todo el aumento de las Células de Leydig y en menor grado las de Sertoli. No se aprecian cambios de las células germinales.

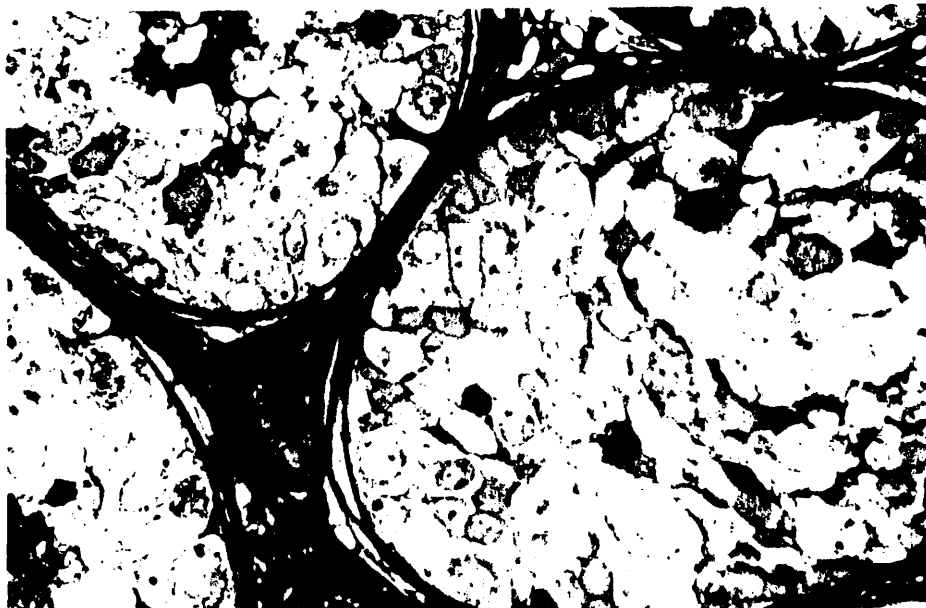


Figura 43.- Detalle de la Biopsia anterior en la que se aprecian un incremento discreto de las células germinales.

las membranas basales aumentaron su espesor después del tratamiento. En el Paciente 1 (E.R.S.), después del tratamiento hay un aumento de las espermatogonias y se pueden observar varias espermátides Figuras 34 y 35. En el Paciente 3 (G.S.P.) después del tratamiento Figuras 42 y 43, se puede considerar que las células de Leydig son normales. Los otros dos pacientes mostraron un crecimiento menor de estas células. Las células de Sertoli, en todos los pacientes, después del tratamiento, muestran un incremento, siendo más evidente en el paciente 1, Figuras 34 y 35. Por último, hemos podido observar un ligero edema en todos los pacientes después del tratamiento.

4. Mujeres anovulatorias

En la Tabla V y en las Figuras 44 a la 52, se muestran las variaciones de la LH, FSH, Temperatura Basal y del Pregnandiol, después del tratamiento con el análogo. En la Tabla VI, se muestra, el número y porcentaje de ovulaciones y embarazos.

En el ciclo de estudio, ninguna de las pacientes tuvo un pico ovulatorio de gonadotropinas, el Pregnandiol siempre fué menor a 0.8 mg/24 hrs y todas ellas presentaron una Temperatura Basal -- (T.B.) monofásica. La citología vaginal fué monofásica, hipoestrogénica y en las mujeres casadas la biopsia endometrial, indicaba un endometrio estrogénico proliferativo.

Los resultados obtenidos en cada paciente, se describen a continuación:

4. 1.- Resultados clínicos y de laboratorio

Paciente 1 (M.G.B.): Tabla V y Figura 44. Durante la infusión del análogo, los niveles de LH aumentan considerablemente, pasando

TABLA V.- RESULTADOS DE LA ESTIMULACION CON D-TRP⁶-LH-RH
EN MUJERES CON CICLOS ANOVULATORIOS

Tratamiento	Incremento Máximo Absoluto (mIU/ml)	Incremento Máximo Porcentual (MxΔ%)	Area Total (8 hrs)	Incremento Máximo Absoluto (mIU/ml)	Incremento Máximo Porcentual (MxΔ%)	Area Total (8 hrs)	Pregnan- diol uri nario des pués Tto. mg/24hrs	Ovulación	Emba
ACIENTES 8hrs+40ug sc	38	950	15694	12,4	775	4644	1,96	+	
.-MGB Si									
.-PAV Si	101,5	548,7	58725	40,0	1000	21600	1,8	+	
.-MJV Si	47,1	5233,3	13053	16,8	525	5947	0,85	-	
.-MCD Si	5,8	290,0	2934	0,6	92,3	375	0,5	-	
.-LRV Si	5,1	566,7	1594,4	1,58	254,8	702,6	0,6	-	
.-VWL Si	7,2	720,0	2931	5,2	400,0	2544,1	0,7	-	
.-MJV Tratada previamente con 10 µg IM 10 días	35,4	804,5	13010	13,5	270	6367,8	1,8	+	
.-VWL Tratada previamente con 10µg IM sobre 8hrs 13 días	3,9	210,8	2088,5	0,7	100	514	1,2	-	
.-PFC Tratada previamente con 10 µg IM 10 días	116,4	3333,3	46888	9,75	1300,0	3847,5	1,9	+	
.-MTS Tratada con Pergonal IM 10 días	26	1380,9	7317	5,9	347,1	2859	1,1	-	
.-SDQ Tratada previamente con Clomifeno per os 100mg/día: 5 días	52,5	700	24505	20,5	372,7	9285	7,4	+	
Mujeres normales, 10 µg infusión en fase ovulatoria 8 horas	23,8	187,4	11576,6	12,5	244,0	5457,5			

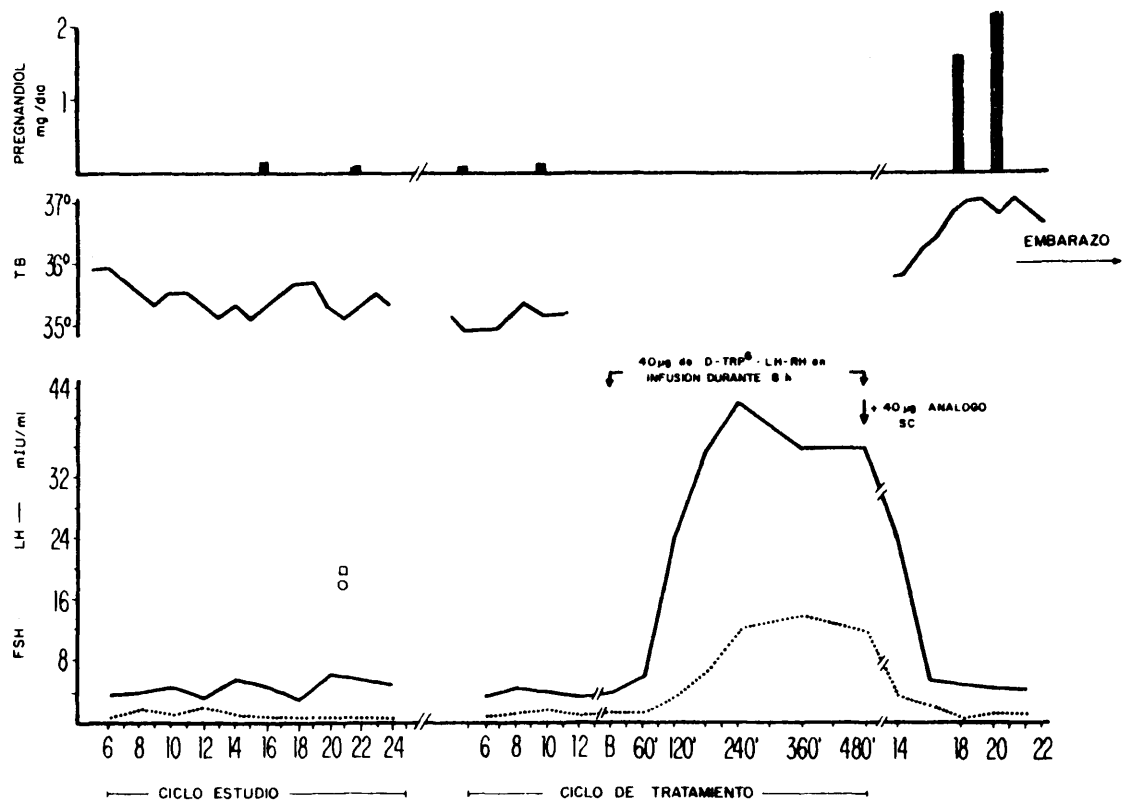


Figura 44.- Ciclos de estudio y de tratamiento de la Paciente 1 (M.G.V.) O= Citología seriada hipoestrogénica. =Biopsia endometrial en proliferación persistente.

de unos niveles basales de 4 mIU/ml a 42 mIU/ml a las 4 horas.- A las 24 horas, los niveles de gonadotropinas se encuentran muy elevados, siendo de 24 mIU/ml. Los valores basales de FSH fueron de 1.6 mIU/ml y alcanzan su pico máximo a las 4 horas con 14 mIU/ml. A las 24 horas los valores de FSH, estaban en 3.2 mIU/ml. El Area Total de LH fué de 15664 y el de la FSH fué de 4644. Las cifras de pregnandiol antes del tratamiento alcanzaron un valor de 0,5 mg/día y, luego del tratamiento, llegaron a ser de 1,9 mg/día. La T.B. post-tratamiento, se hizo bifásica. La paciente se quedó embarazada al mes siguiente y hoy es madre de un niño sano.

Paciente 2 (P.A.V.): Tabla V y Figura 45. Esta paciente previamente al tratamiento con el análogo, recibió Clomifeno. En éste ciclo, con clomifeno, los valores de FSH, pasaron de una basal de 10 mIU/ml a valores superiores a 40 mIU/ml, mientras que la LH se incrementaba de unos valores basales de 5 mIU/ml a 21 mIU/ml. Se presentó la menstruación al mes siguiente. Posteriormente, fué tratada con el análogo. Antes del tratamiento los valores de la LH fueron de 18,5 mIU/ml, los cuáles luego de los 15 minutos pasaron a tener unos niveles por encima de 120 mIU/ml; veinticuatro hora más tarde de haber comenzado la infusión con D-Trp⁶-LH-RH, los niveles de LH, se mantenían en 120 mIU/ml. Los valores basales de la FSH, fueron de 40 mIU/ml, los cuáles inmediatamente alcanzaron valores superiores y se mantuvieron así hasta las 24 horas. El área total de LH liberada, fué superior de 59725 y el de la FSH, superior a 21600. El pregnandiol, de un valor basal de 0,5 mg/día, pasó a 1,8 mg/día. La temperatura después del tratamiento se mantuvo bifásica y la paciente se quedó embarazada. Después de 10 semanas, la paciente tuvo un aborto.

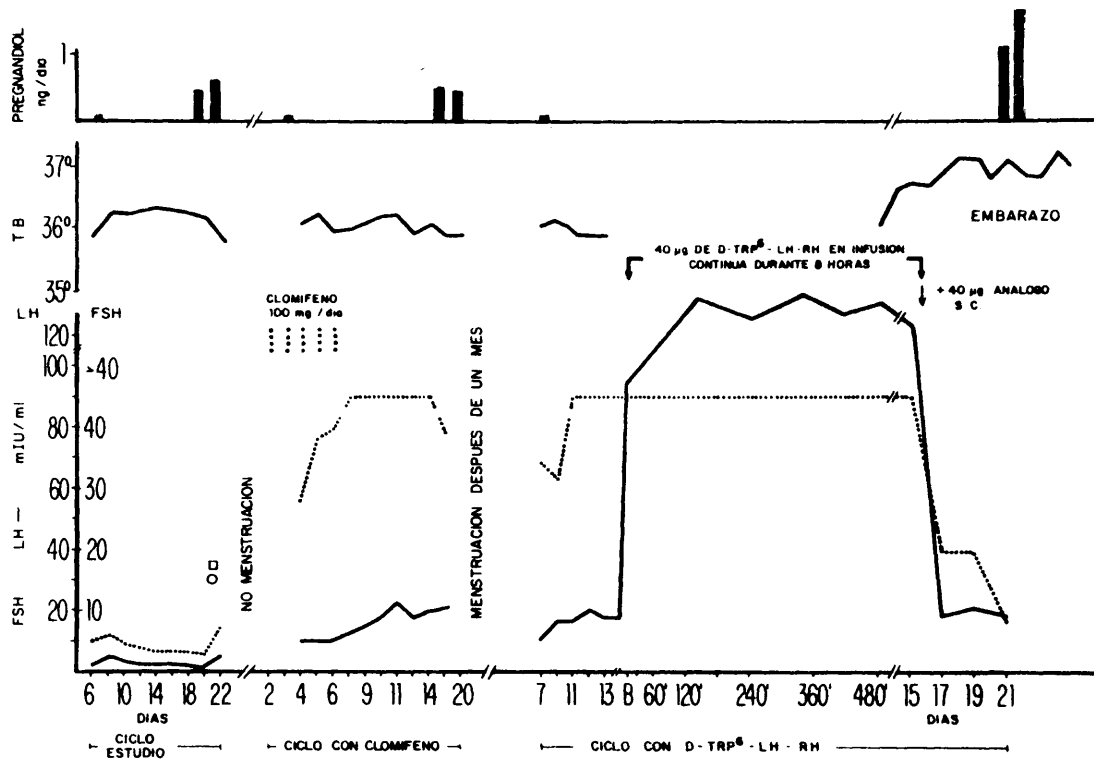


Figura 45.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 2 (P.A.V.) O= Citología seriada hipoestrogénica □ = Biopsia endometrial en proliferación persistente.

Paciente 3 (M.J.V.): Tabla V y Figura 46. En el primer ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH, los valores basales de la LH de 0.9 mIU/ml, pasaron a ser de 48 mIU/ml a las 4 horas. A las 24 horas de haber comenzado la infusión del análogo los valores de LH en plasma se mantenían muy elevados, en 23 mIU/ml. Los valores basales de FSH fueron de 3.2 mIU/ml y el pico fué de 17 mIU/ml a las 6 horas. Después de 24 horas los valores de FSH se mantenían en 16 mIU/ml. El Area Total incrementada fué de 13053 para LH y de 5947 para FSH. El pregnandiól urinario, de un valor basal casi indetectable, pasó a 0.85 mg/día. La temperatura basal se mantuvo monofásica. El segundo ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH lo realizamos 3 meses después de la anterior. En este ciclo, antes de la infusión, la paciente recibió durante 10 días 10 µg IM del análogo. En este período de tiempo las gonadotropinas aumentaron discretamente, (la LH de unos valores de 1,6 pasó a 4,4 mIU/ml y la FSH de 3 a 5 mIU/ml). Inmediatamente después del último día de este tratamiento, a la paciente se le infundió el análogo en la forma indicada anteriormente. Al comienzo de la infusión, los valores de LH fueron de 4,4 mIU/ml, a las cuatro horas fué el pico con un valor de 40 mIU/ml y a las veinticuatro horas se mantenían muy elevados, en 15 mIU/ml. La FSH pasó de unos niveles basales de 5 mIU/ml a 18,5 mIU/ml a las 8 horas, y después de veinticuatro horas los valores se mantenían en 13 mIU/ml. El área total de LH liberada fué de 13010 y la de FSH de 0,5 y luego de 1,8 mg. La temperatura se volvió bifásica. Después de un mes, la paciente quedó embarazada y actualmente es madre de un niño normal.

Paciente 4 (M.C.D.): Tabla V y Figura 47. Inmediatamente después del ciclo de estudio, fué sometida a una infusión de 40

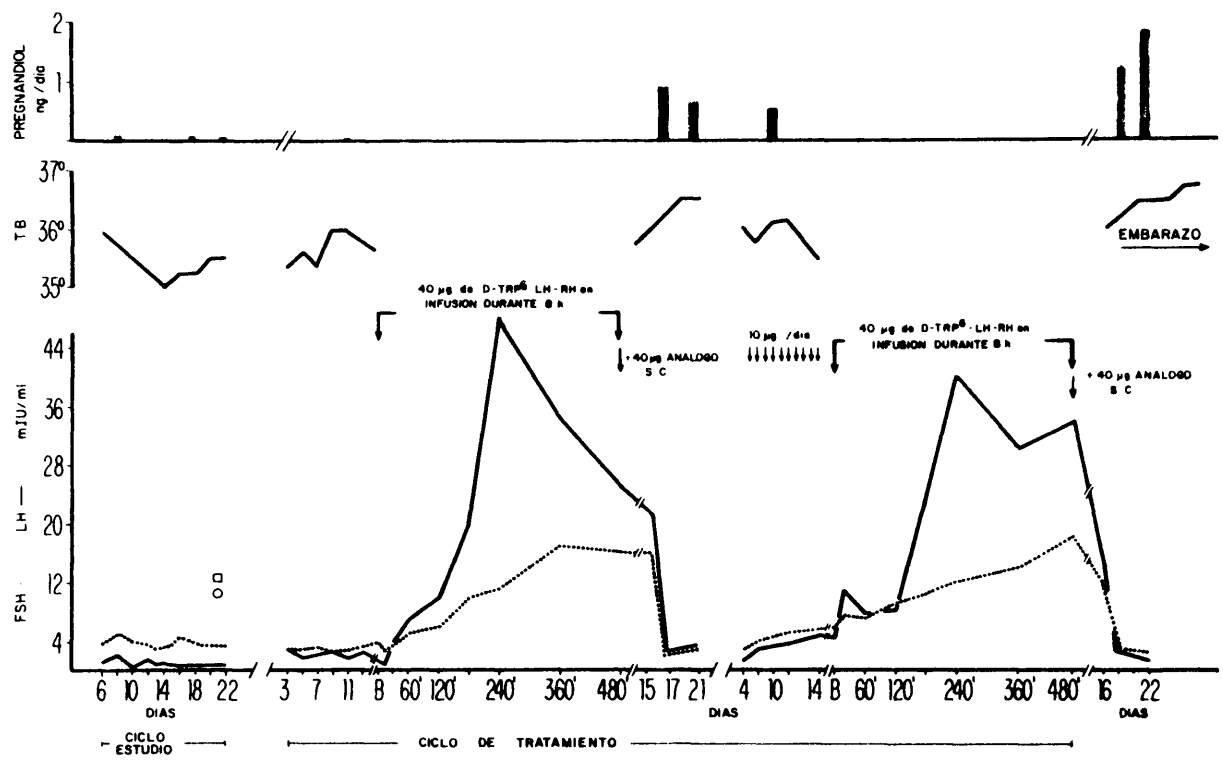


Figura 46.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 3 (M.V.B.) O= Citología seriada hipoestrogénica. - □=Biopsia endometrial en proliferación persistente.

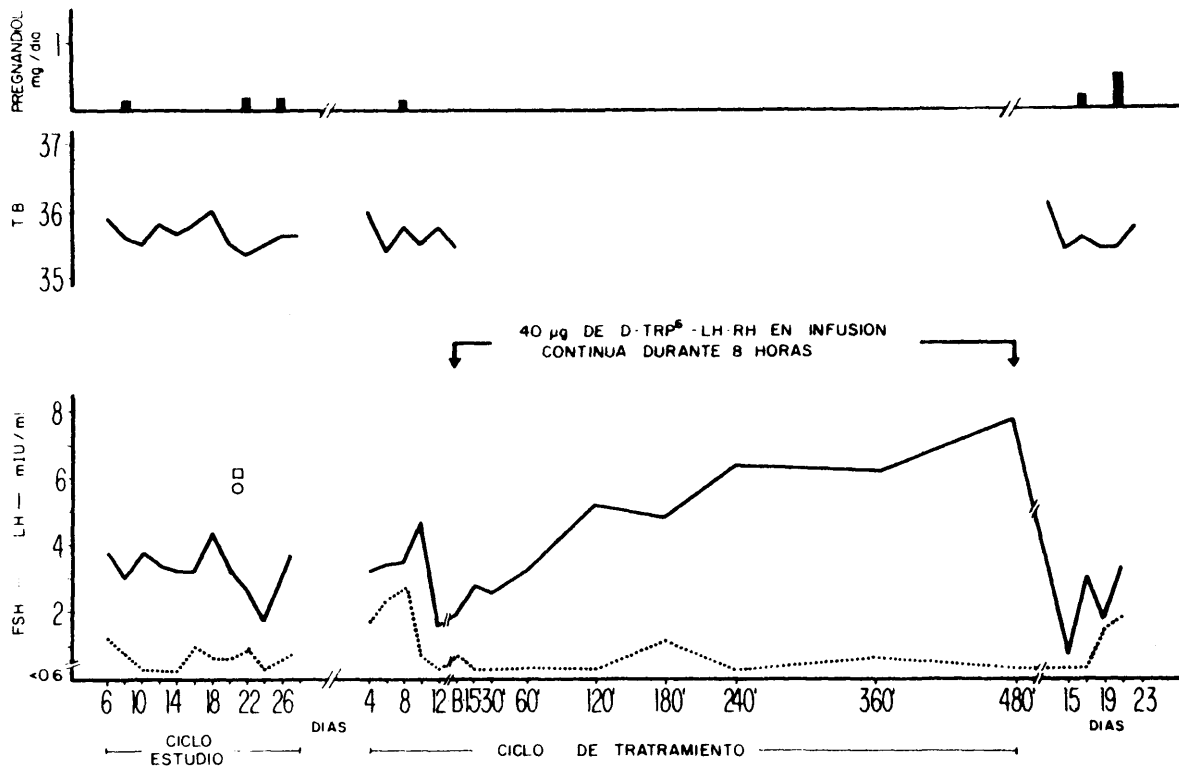
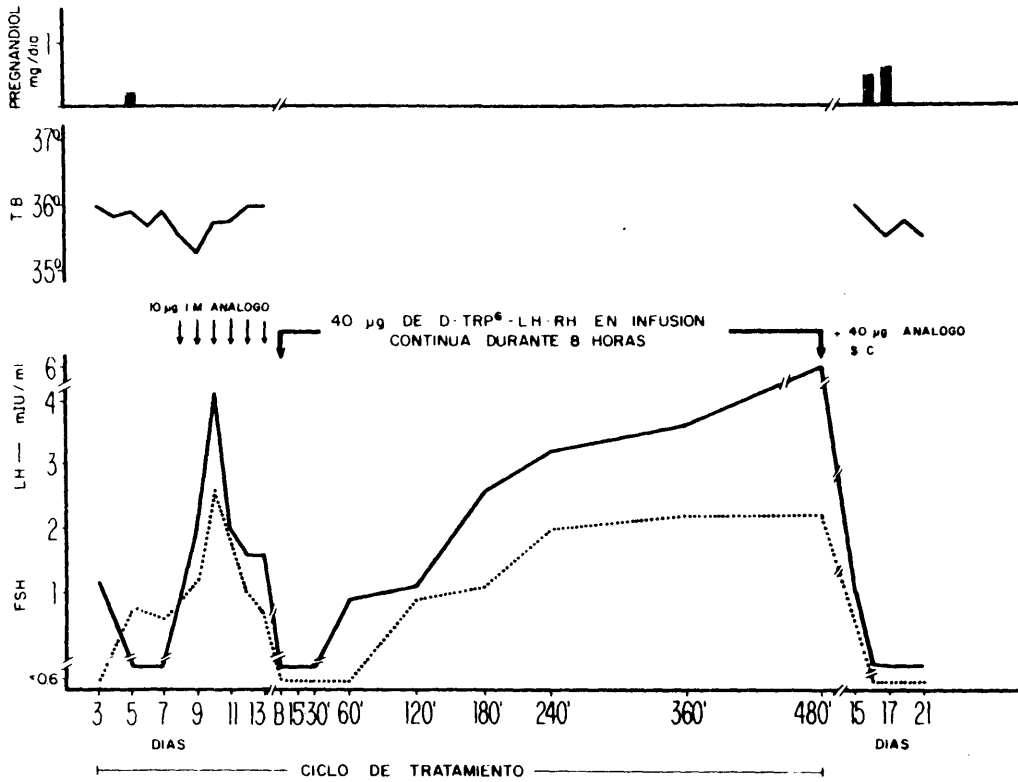


Figura 47.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 4 (C.D.) O= Citología seriada hipoestrogénica. □=Biopsia endometrial en proliferación persistente.

μg de D-Trp⁶-LH-RH. Los valores basales de la LH fueron de 2mIU/ml y el pico de 7,8 mIU/ml a las 8 horas; venticuatro horas más tarde, los valores de LH habían descendido a 0,9 mIU/ml. Los valores basales de FSH de 0,6 mIU/ml pasaron a unos valores máximos de 2,2 a las 8 horas, y a las venticuatro horas estaban en 0,6 -- mIU/ml. El Area Total incrementada fué de 2934 para LH y 375 para FSH. Los valores basales de pregnandiól antes de la infusión fueron de 0,3 mg/día y después de la infusión de 0,5 mg/día. La temperatura se mantuvo monofásica.

Paciente 5 (L.R.V.) Tabla V y Figura 48. En esta paciente, - debido a que había sido estudiada con anterioridad, no se realizó el ciclo previo habitual. Su pauta de tratamiento consistió, en lo siguiente: antes de la infusión, recibió durante 6 días 10 μg IM del análogo, y al 7º. día de la infusión. Durante las primeras inyecciones del análogo, los valores de gonadotropinas pasaron de unas cifras basales menores de 0,8 a 4 para la LH, y para la FSH, de unos valores basales de 0,8 pasó a 2,4 mIU/ml. Antes de la infusión los valores de la LH fueron de 2 mIU/ml y alcanzaron el pico máximo a las 8 horas, con una cifra de 7,8 mIU/ml; - venticuatro horas más tarde los niveles habían descendido a 0,9 mIU/ml. La cinética de la FSH fué la siguiente: valores basales menores de 0,6 mIU/mo, pico máximo a las 8 horas con un valor de 2,2 mIU/ml y, a las 24 horas, éstos niveles habían descendido por debajo de 0,6 mIU/mo. El pregnandiól urinario, que antes del tratamiento, era de 0,3 mg/día, y después del tratamiento pasó a ser de 0,5 mg/día. La temperatura permaneció monofásica.

Paciente 6 (V.W.L.) Tabla V y Figura 49. Durante el primer ciclo de tratamiento con D-Trp⁶-LH-RH, la LH se incrementó de -- unos valores basales de 1 mIU/ml, a 8,2 mIU/ml a las 4 horas y -



48.- Ciclo de tratamiento correspondiente a la Paciente 5 (L.R.V.).

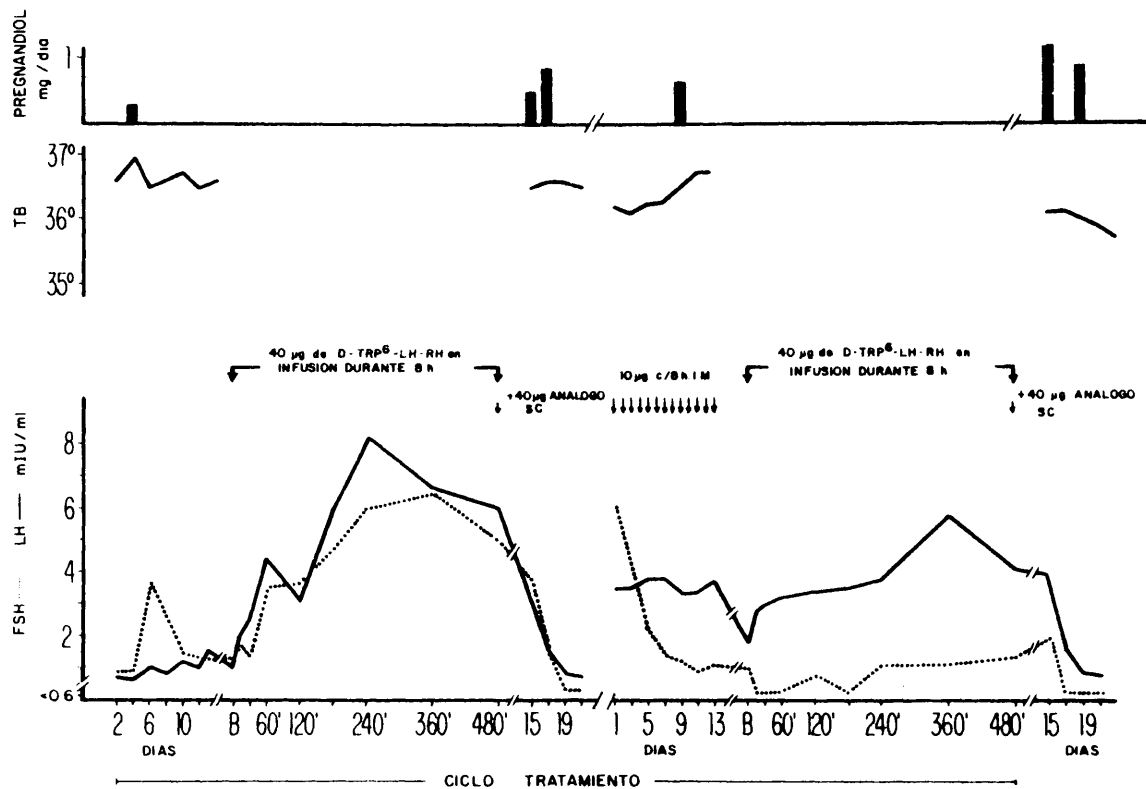


Figura 49.- Ciclos de tratamiento de la Paciente 6 (V.W.L.).

después de 24 horas de haber comenzado la infusión, los valores se mantenían en 3,2 mIU/ml. Los niveles de FSH basales fueron de 1,3 mIU/ml y tuvieron un incremento máximo de 6,5 mIU/ml a las 6 horas. Después de veinticuatro horas, éstos niveles se mantenían en 3,7 mIU/ml. El Area Total para LH fué de 2931 y para FSH de 2544. El pregnandioli urinario de unos valores basales de 0,5 mg pasó, después de la infusión, a 0,7 mg/día. La temperatura se mantuvo monofásica. En el segundo ciclo de tratamiento, recibió 10 µg del análogo IM cada /8 horas durante un período de 13 días e inmediatamente después la infusión de los 40 µg del análogo seguido de 40 µg SC. Curiosamente, los valores de FSH que eran de 6 mIU/ml, disminuyeron mientras recibía la inyección IM, llegando a tener un valor de 1 mIU/ml. En cambio la LH mantuvo sus valores alrededor de 4 mIU/ml durante este período. En el día de la infusión, los valores de LH eran de 1,85 mIU/ml y alcanzaron un pico de 5,75 mIU/ml a las 6 horas; a las 24 horas estos valores eran de 2 mIU/ml. El area total alcanzada de la LH fué de 2088 y de la FSH de 514. Los valores de pregnandioli pasaron de 0,5 mg/día a 1.2 mg/día y la temperatura se mantuvo monofásica.

Paciente 7 (P.F.C.) Tabla V y Figura 50). Los valores basales antes del tratamiento IV en infusión continua del análogo, fueron de 3,6 para la LH, la cuál alcanzó unos valores superiores a las 120 mIU/ml entre las tres y cuatro horas, y veinticuatro horas más tarde se mantenían muy elevados, en 24 mIU/ml. Los niveles basales de FSH fueron de 0,75 mIU/ml y el máximo valor se alcanzó a las 3 horas con 10,5 mIU/ml. Después de 24 horas, estaban en 4 mIU/ml. El Area Total de LH y FSH fué de 46888 y 3847 respectivamente. El valor de pregnandioli basal fué de 0,5 mg/día y, tras el tratamiento, de 1,9 mg/día. La temperatura se hizo bifásica y la ovulación fué evidente, teniendo posteriormente esta mujer una menstruación normal.

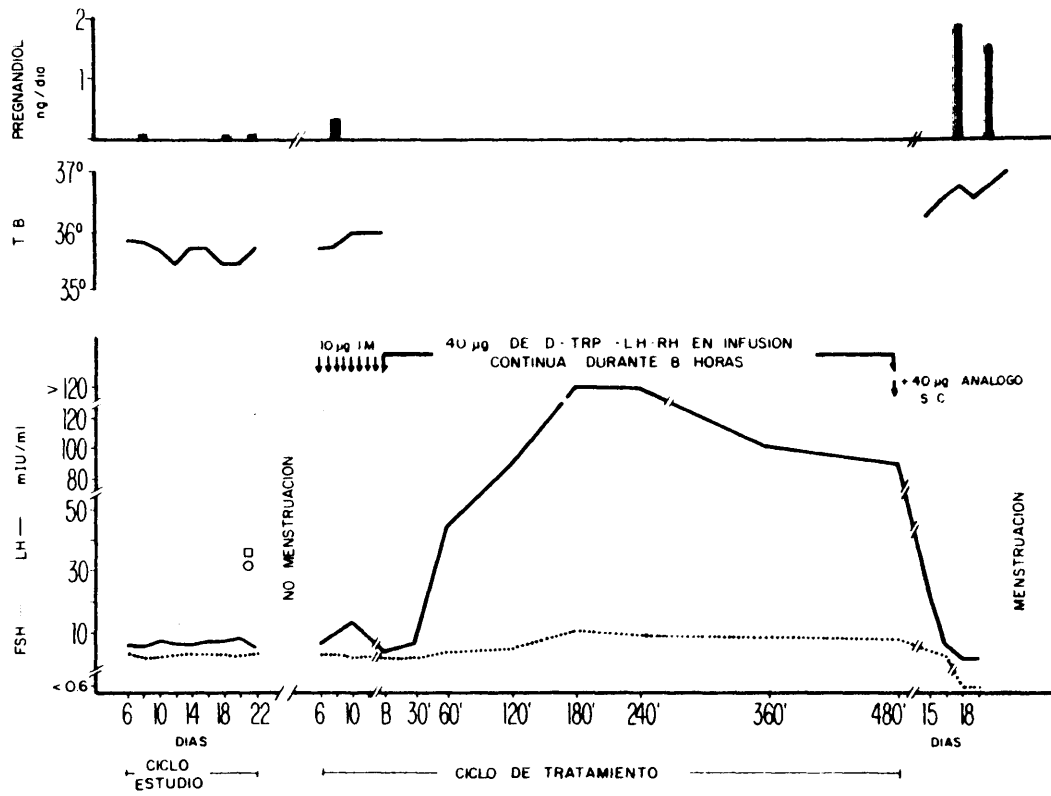


Figura 50.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 7 (P.F.C.).

Paciente 8 (M.T.S.) Tabla V y Figura 51. Tuvo unos valores basales de LH de 2,1 mIU/ml y alcanzó el máximo valor a las 4 horas con 29 mIU/ml. La FSH de unos valores basales de 1,7 llegó a un máximo de 7,6 mIU/ml a las 6 horas. Después de 24 horas, tanto los valores de la LH como de la FSH, fueron iguales (2,3 mIU/ml). El Area Total alcanzada por la LH fué de 7317 y el de la FSH de 2859. El pregnandiól urinario fué de 0,5 mg/día, pasando tras el tratamiento a 1,1 mg/día. La temperatura, sin embargo, se mantuvo monofásica.

Paciente 9 (S.D.Q.) Tabla V y Figura 52). En el ciclo de tratamiento, esta paciente recibió Clomifeno (100 mg/día) durante 5 días y, a los 8 días de la última dosis de Clomifeno, se procedió a la infusión del análogo con el fin de provocar la ovulación. Los valores basales de la LH, antes de la infusión IV, fueron de 7,5 alcanzando un pico máximo a las 6 horas con 6 mIU/ml. Venticuatro horas más tarde estos valores se mantenían muy elevados, (28 mIU/ml). FSH tenía unos valores basales de 5,5 mIU/ml y el pico máximo (26 mIU/ml) ocurrió a las 4 horas de la infusión, siendo a las 24 horas los valores relativamente altos (16 mIU/ml). El Area Total de LH fué de 24505 y el de la FSH - 9285. El pre handiól, de unos valores de 0,7 mg/día pasó a 7,4 mg/día. La temperatura basal se hizo monofásica y la ovulación fué evidente. Posteriormente esta paciente tuvo una menstruación normal.

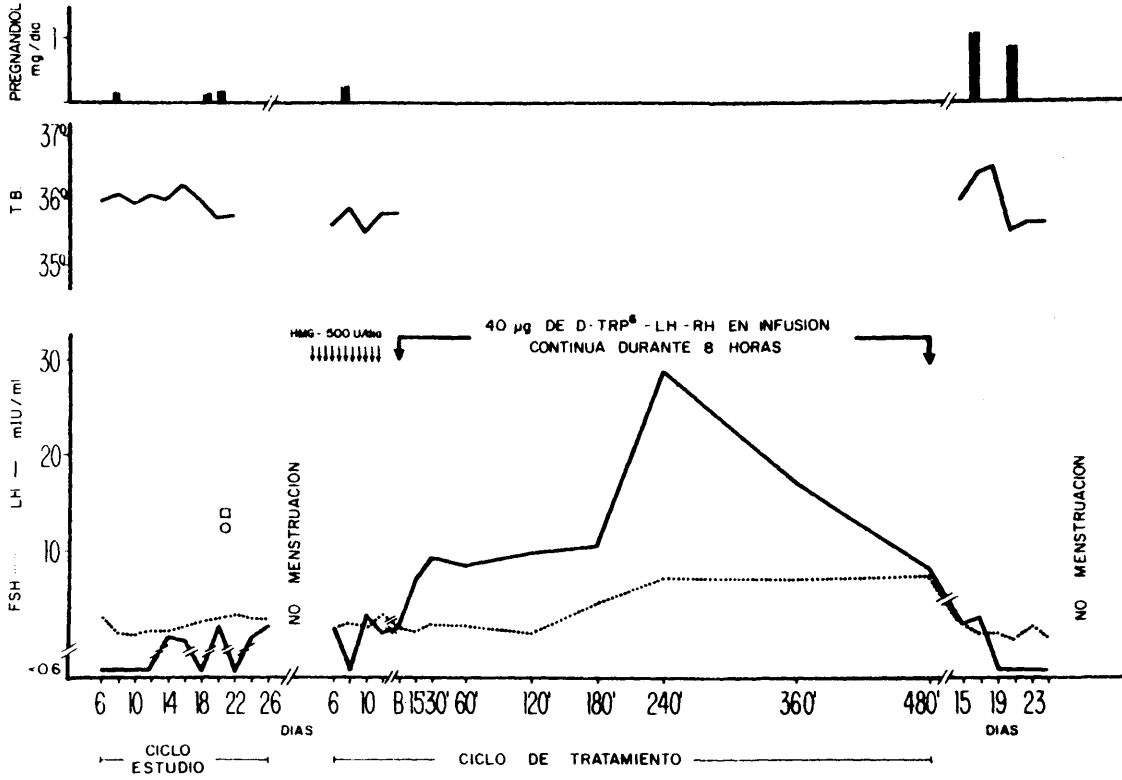


Figura 51.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 8 (M.T.S.) O=Citología seriada hipoestrogénica □ = Biopsia endometrial en fase de proliferación persistente.

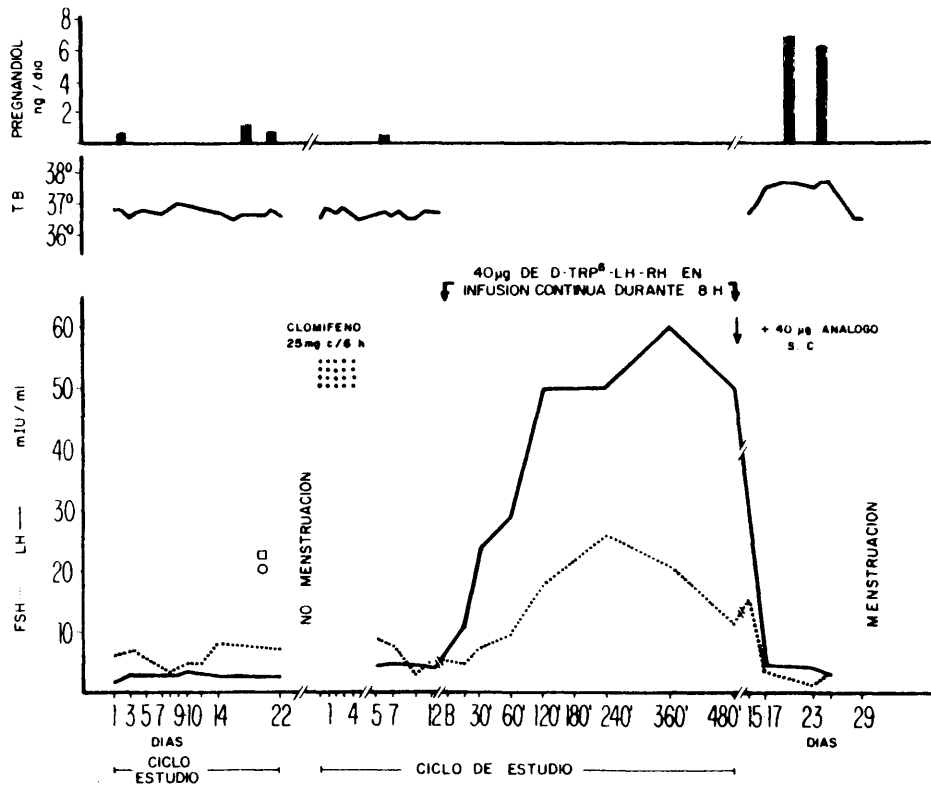


Figura 52.- Ciclos de estudio y tratamiento de la Paciente 9 (S.D.Q.) O=Citología seriada hipoestrogénica □= Biopsia endometrial, fase de proliferación persistente.

TABLA VI.- RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON D-TRP⁶ - LH-RH
EN PACIENTES ANOVULATORIAS

PACIENTES	N°.	OVULACION	EMBARAZO
CASADAS	8	4	3
SOLTERAS	1	1	-
TOTAL	9	5	3
PORCENTAJE		55,56 %	33,3 %

D I S C U S I O N

E.- DISCUSION

En todo nuestro trabajo hemos realizado una serie de experiencias farmadina \acute micas y cl \acute nicas con el fin de poder observar los efectos que el nuevo an \acute logo de s \acute ntesis de la hormona hipotal \acute mica liberadora de gonadotropinas D-Trp⁶-LH-RH, provoca cuando era administrado tanto a hombres como mujeres normales, en diferentes dosis y por varias v \acute as de administraci \acute on.

El estudio no s \acute lo se limit \acute a la estimaci \acute on de los efectos producidos en personas sanas, sino que tambi \acute en abordamos el dif \acute cil terreno de la terap \acute utica en personas afectadas de patolog \acute ia hipogonadal, al objeto de evaluar las mismas y ver sus consecuencias.

Hemos seguido una rigurosa pauta para la observaci \acute on de lo anteriormente expuesto, consistiendo \acute sta en la evaluaci \acute on de las dosis m \acute imas farmacol \acute gicamente activas, o dosis-umbral, as \acute como de las respuestas evocadas con dosis progresivamente crecientes y, por consiguiente intentando establecer la dosis-l \acute mite, con la que parece entrarse en "plateau" de respuesta.

En las mujeres, tratamos de determinar exactamente el d \acute ia del ciclo menstrual, a fin de poder evaluar lo mejor posible las diferentes respuestas que dependan de las variaciones, en las diferentes fases que constituyen el ciclo fisiol \acute gico de la mujer normal.

Como consecuencia de todo ello hemos configurado cuatro cap \acute tulos, independientes pero complementarios, que analizaremos a continuaci \acute on y que son: 1) Hombres normales, 2) Mujeres normales, 3) Pacientes masculinos con Hipogonadismo Hipogonadotr \acute pico y 4) Mujeres anovulatorias.

1.- Hombres normales

Siguiendo la metódica antes expuesta, comenzamos por investigar la dosificación de administración del nuevo preparado, y así la primera parte de nuestro estudio consistió en probar, cuál -- era la dosis más pequeña, capaz de estimular adecuadamente las células hipofisarias y a partir de ella ir aumentando la dosis, -- hasta llegar a tener la más idónea para nuestros intereses, los cuales fundamentalmente buscaban el establecer, a posteriori, -- cual era la terapia más útil para tratar hombres que padecían Hipogonadismo Hipogonadotrópico.

Los trabajos anteriores de SCHALLY y su grupo (150,151,152), habían demostrado que incluso dosis tan pequeñas como 0,2 µg LH-RH/rata o 1 nanogramo por mililitro, eran ya capaces de producir un incremento de la LH y FSH cuando se medían en las pituitarias de las ratas estimuladas. Al disponer nosotros de un análogo, -- del que COY y sus colaboradores (329) habían demostrado en ratas que tenía una potencia 13 y 21 veces mayor que el LH-RH para liberar LH y FSH respectivamente, lo lógico era que empezásemos -- nuestro estudio con dosis bastante bajas.

Así, probamos 1 ug por vía IV en un sólo pulso, y ésta dosis no fué capaz de modificar los niveles de la LH y FSH, a lo largo de las ocho horas que duró la experiencia. Pasamos entonces a -- una dosis de 2,5 ug y con ella, ya encontramos un aumento significativo en la respuesta de la LH. GONZALEZ-BARCENA y sus colaboradores (421) en sus experiencias con D-Ala⁶-LH-RH-9-(EA) (otro -- análogo superactivo de la LH-RH) encuentran también que con esta misma dosis de 2.5 µg ya hay un incremento significativo en la --

respuesta de la LH. Estos autores no han comunicado nada sobre lo que ocurre con FSH, por lo cual presumimos que los resultados suyos sean iguales a los nuestros, es decir, que ellos al igual que nosotros no encuentran variaciones de la FSH, con este estímulo.

Al ir incrementando la dosis del D-Trp⁶-LH-RH, la respuesta de la LH también iba en aumento. Con 10 µg IV en un sólo pulso, pudimos observar que el incremento de la LH, era ligeramente superior a la encontrada con 100 µg de LH-RH, es decir, nos encontramos con una dosis del análogo 10 veces menor que la de LH-RH no sólo producía una respuesta mayor, sino que además podía mantener los niveles de la LH elevados, por un tiempo no menor a las ocho horas, mientras que el preparado original de LH-RH sólo era capaz de mantener sus efectos por un tiempo de 2 horas. En otras palabras, podíamos decir que el D-Trp⁶-LH-RH es 10 veces más potente que el LH-RH, en hombres normales, para incrementar la LH y cuatro veces más potente en prolongar su tiempo de acción.

Si comparamos los diferentes modos de administración, (IV, IM, SC e IV en infusión continua) con una misma dosis de 10 µg, vemos que entre las vías IV en un sólo pulso, IM y SC, no existen prácticamente diferencias, como fué también demostrado en su día para la LH-RH por diferentes autores (171,254,294). Sin embargo nosotros hemos podido comprobar con esta dosis, que la cinética de respuesta de la LH, es totalmente diferente cuando se utiliza la vía IV en infusión continua que cuando se utiliza la vía IV en un sólo pulso. Por ejemplo, el Incremento Máximo Absoluto (ΔMx_A), por vía IV en un sólo pulso se alcanza a los

15', mientras que por vía IV en infusión continua se alcanza a los 480'.

Si comparamos estas dos vías, ya no con 10 µg, sino con una dosis mayor de 50 µg, apreciamos también que la cinética de respuesta de la LH en uno y otro caso son diferentes. Lo primero que observamos con esta dosis, es que los (Δ MxA), cuando se utiliza la vía IV en un sólo pulso, aparecen a los 30', -- mientras que por la vía IV en infusión continua, este valor máximo se alcanza a los 240', para luego descender a los 480'. -- Esto también difiere con los resultados obtenidos con una dosis de 10 µg. Estos hechos tal vez los podríamos explicar, pensando que las células hipofisarias, tienen un umbral de saturación para su capacidad de respuesta, por encima del cual ya no se logra un incremento de la LH, y esta sería la razón del "plateau" entre los 240 y 360 minutos. Estos fenómenos han sido también encontrados cuando se inyecta el LH-RH (369).

Otro dato muy interesante de comentar y que nosotros no hemos podido observar, es el doble pulso de la LH. Los primeros en describir esta observación fueron GONZALEZ-BARCENA y sus colaboradores (254), los cuales vieron que cuando administraban una dosis de 250 µg por vía IV en infusión continua, había un doble pulso de la LH; uno rápido, posiblemente de liberación, y un segundo más tardío, posiblemente de síntesis. Posteriormente esta observación ha sido confirmada por los trabajos de BREMMER y -- PAULSEN (255) y por el mismo GONZALEZ-BARCENA y sus colaboradores (364) después de la administración de un análogo de la LH-RH, el D-Leu⁶-LH-RH(EA), por vía nasal. El hecho de no haber encontrado estos fenómenos en nuestras experiencias, posiblemente se deba

al esquema de extracciones que hemos seguido, el cual no nos ha permitido ver el primer pico y/o en segundo lugar, quizás al hecho de que las dosis utilizadas han sido muy bajas.

Es importante también comentar que los Δ MxA y las AT, obtenidos cuando se utiliza la vía IV en infusión continua tanto con 10 ug como con 50 ug, son superiores a los alcanzados utilizando las otras dos vías de administración y, además, que con dosis de 50 ug los valores alcanzados son el doble que los otros. Esta forma particular de comportamiento de la LH, que por otro lado pensamos que somos los primeros en verlo, creemos se pueda explicar de la siguiente manera: La substancia inyectada por vía IV en un sólo pulso instantáneamente, se expone en su totalidad a la acción de las enzimas degradantes, no llegando a la hipófisis más que una pequeña parte de la misma, que a su vez es depurada rápidamente del torrente circulatorio y tejidos nerviosos. Si por el contrario se inyecta por vía IV en infusión continua, el tiempo de actuación será más prolongado ya que solamente una pequeña parte de la hormona se está poniendo en contacto con los sistemas depuradores (la otra, permanece en el frasco de la perfusión), consiguiéndose con ello un mayor efecto sobre las células hipofisarias.

En lo que se refiere a la FSH, ya ha sido comunicado por otros autores la capacidad que tiene el LH-RH (155) y otros análogos (370,387,421) para liberar FSH en hombres normales, y todos estos estudios coinciden en que dicha propiedad es marcadamente inferior a la de la LH. Y, en nuestro criterio, los que realmente tienen una mayor capacidad que la LH-RH para producir una estimulación de la FSH en humanos son el D-Ala-Gly-LH-RH(EA)

y el Des-Gly-NH₂¹⁰-Pro(EA⁹)-LH-RH. Nuestros resultados nos muestran que las variaciones que tiene la FSH, con dosis menores a 50 ug, son similares a las que hemos obtenido con 100 ug de LH-RH por vía IV en un sólo pulso. Pero, cuando nosotros utilizamos 50 ug por vía IV en infusión continua, la FSH alcanza valores significativamente superiores a los basales a partir de los 120' ($p < 0,05$) manteniéndolos hasta los 480', por lo menos. Este fenómeno tan interesante, ha sido visto por ARIMURA y sus colaboradores (314) In vitro, utilizando LH-RH. Nuestra explicación a este fenómeno, es que posiblemente la FSH para su liberación requiere de una dosis más elevada y de un período de estimulación más prolongado que la LH. La otra hipótesis posible que queda, es pensar que en los hombres el efecto FSH-RH es tan sólo un fenómeno colateral y por dicho motivo requiere dosis más potentes.

En nuestro estudio, uno de los aspectos más difíciles es el interpretar los resultados referentes a la Testosterona, evaluándolos y comparándolos con otros autores. Actualmente conocemos, por muchísimos estudios, que en el hombre normal la Testosterona, no se secreta de forma continua, sino que sufre oscilaciones en plasma del orden de 50 a 300 ng/100 ml y esto en cortos períodos de tiempo como puede ser una hora (315,394,401). Además, que la Testosterona, durante el día tiene un ritmo de producción que se incrementa por la noche (368,404,413). Por otra parte hay autores que han podido comprobar (271,272,278) que después de la administración de la LH-RH, los niveles de la Testosterona en plasma se incrementan. Estos mismos autores, bajo nuestro punto de vista, no nos muestran cuales serían los valores de Testosterona

en sujetos normales a los cuales no se les ha administrado LH-RH, para realmente poder afirmar que ha habido un incremento de la -- Testosterona. Por lo dicho, nosotros medimos la testosterona, primero en sujetos normales, a los cuales únicamente se les infundió solución salina durante 8 horas, al objeto de saber si cuando nosotros administrabamos el análogo, podíamos o no afirmar de una forma más categórica, la existencia de posibles variaciones de la testosterona.

Cuando medimos la Testosterona, después del estímulo con D-Trp⁶-LH-RH, nos encontramos que los valores eran siempre más altos que los controles, y en algún momento fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los 240 minutos. Esto quizás, se explique pensando que el incremento de la testosterona, no es un fenómeno que exclusivamente dependa del aumento de la LH, sino que muy posiblemente se deba a la acción conjunta de varias hormonas, (como pueden ser la FSH, PRL) y de otros factores que en este momento escapan a nuestros conocimientos.

2.- Mujeres normales

Uno de los objetivos fundamentales que nos propusimos en este grupo de estudio fué ver cuál era la cinética de la LH, FSH y 17-estradiol, en las diferentes fases del ciclo menstrual; Fase Follicular (8°.-10° días del ciclo); Fase Pre-ovulatoria (11°.-13° días del ciclo); Fase ovulatoria (14^a. día del ciclo) y Fase Lútea (23°.-24° días del ciclo).

Además de probar cuales eran las dosis mínimas que estimulaban, las gonadotropinas hipofisarias, al igual que en los hombres, el estudio de la dinámica durante las diferentes fases del ciclo -

menstrual, bajo nuestro punto de vista, tenía enorme importancia ya que como sabemos en este período se producen profundos cambios que modifican el comportamiento hipotalámico-hipofisario y que - han sido perfectamente demostrados (76, 142, 166, 171, 172, 197,- 199, 201, 210, y 392) al igual que en el puerperio (389). De la respuesta a estas dos preguntas, posiblemente podíamos sacar algún criterio que nos sirviese para intentar tener una dosis apropiada en una mujer anovulatoria, por causa hipotalámica.

Lo que primero pudimos observar, fué que en fase Folicular, - con una dosis de 1 µg, no modificamos la respuesta de la LH y FSH. Pero a partir de 5 µg el grado de estimulación de la LH y FSH, era superior al que obteníamos con 100 µg de LH-RH y además los niveles de las gonadotropinas, se mantenían elevados por lo menos durante 8 horas. Este fenómeno en nuestra opinión y en la de AMOS - y colaboradores (312), podía, deberse a que estos compuestos, tienen una vida mayor, y/o a que la aparición del pico máximo de estimulación se encuentra retrasado, como opinan KASTIN y colaboradores (370).

En la fase folicular, pudimos comparar la potencia de estimulación con relación a la LH-RH, y así comprobamos que el D-Trp⁶-LH-RH era 40 y 21 veces más potente en liberar LH y FSH respectivamente. Desgraciadamente la potencia real total, tanto en capacidad de liberación como en duración de tiempo, (area total), no pudimos determinarla ya que en nuestro protocolo la medición de las gonadotropinas se restringía a un tiempo de 8 horas solamente, y durante este tiempo las gonadotropinas se mantenían elevadas. Lo que sí - estaba claro, es que el análogo estimulaba en las mujeres la LH y FSH con una potencia muy superior que en los hombres, y esto quizás podría explicarse porque los estrógenos tienen un efecto positivo a nivel hipofisario. También, por lo dicho, o quizás porque

el D-Trp⁶-LH-RH tiene una afinidad especial por los receptores hipofisarios, pudimos comprobar que este análogo actúa con una potencia superior en la especie humana a lo que se ha observado en animales (328).

Curiosamente, al ir incrementando la dosis del análogo, y al pasar de 10 µg a 50 µg, pudimos observar que la LH no se incrementaba mientras que, en cambio, la FSH iba en aumento. Es decir -- que en este caso particular, de mujeres en fase folicular, la LH no guarda una relación dosis respuesta, pero sí la FSH. Nuestra observación no ha sido vista con otros análogos (76,166,172,300,-302,305,307,312,313,326,328,330,339,342,345,410, y 423), y creemos que este hecho, hipotéticamente, puede deberse o explicarse pensando que el nivel de estimulación de FSH requiere una mayor dosis de D-Trp⁶-LH-RH, lo cual significa posiblemente que éste fenómeno, -- más que de una acción cualitativa, depende de un efecto cuantitativo.

Habíamos dicho que tanto GONZALEZ-BARCENA y colaboradores con el LH-RH (262), como nosotros con el D-Trp⁶-LH-RH, hemos podido -- observar que cuando administramos estas hormonas en hombres normales, por vía IV en infusión continua, obtenemos los más altos valores tanto en incremento como en área total. Curiosamente, este fenómeno no fué igual en las mujeres, en ellas la mejor respuesta la obtenemos por vía IV en un sólo pulso, mientras que los valores más bajos los obtenemos por vía IV en infusión continua.

Cuando comparamos las diferentes respuestas de las gonadotropinas en las tres fases del ciclo menstrual, con una misma dosis -- del análogo (10 µg) y por una misma vía (IV en infusión continua), nos llamó la atención varias cosas: la primera fué el observar que

los incrementos máximos, tanto absolutos como porcentuales, de la LH y FSH en fase ovulatoria, eran más altos y aparecían más tempranamente que en las otras dos fases -pre-ovulatoria y folicular-, ocurriendo esto cuando apenas habían pasado 2,5 μ g del análogo, o sea los 120 minutos; mientras que en las otras dos fases, los máximos incrementos aparecían a los 360 minutos. La segunda observación evidente, fué que las AT de la fase ovulatoria eran el doble que en las otras dos fases. De las otras dos fases -pre-ovulatoria y folicular- los valores más altos correspondían a la primera, pero con muy poca diferencia sobre la segunda.

La última observación interesante, fué constatar que, al término de las 8 horas de infusión, las gonadotropinas se mantenían muy elevadas, con valores significativamente superiores a las basales ($p < 0.05$) y que los de la fase ovulatoria tenían los valores más altos en relación a las otras dos fases. ¿De qué manera podíamos explicarnos estos resultados?. El reciente hallazgo de ARIMURA y sus colaboradores (173) de un RIA específico para LH-RH y la medición del mismo a mitad del ciclo en mujeres normales, demuestra que hay una liberación aguda de la LH-RH, debido a una -- progresiva sensibilidad de las células pituitarias a la LH-RH (en nuestro caso se vió claramente este fenómeno, por la inmediata respuesta de las gonadotropinas al D-Trp⁶-LH-RH) y a una aumentada cantidad de LH-RH. Estos datos han sido confirmados por YEN y sus colaboradores (148 y 212). Por lo tanto en nuestra observación había una sumación de fenómenos; por una parte los explicados por ARIMURA, mayor sensibilización y mayor cantidad de LH-RH y, si a todo esto le añadimos un liberador más potente, lo lógico era que observásemos una más rápida y mayor liberación de gonadotropinas en la fase ovulatoria, como ya hemos anotado.

Este hecho podría constituir un punto de partida para estudiar o asegurar la fecha de ovulación en mujeres normales, método ideal en el control de la natalidad ya que si esto sucede, lo único que se necesitaría sería un período de abstinencia de 48 a 72 horas, quedando el resto del período menstrual para ser utilizado sin peligro y, con ello, se obviarían todos los efectos secundarios que producen los otros métodos de control de la natalidad conocidos hasta ahora. Por otra parte, los incrementos máximos, así como las áreas totales, obtenidas con esta dosis en fase ovulatoria, nos podrían servir como índices de evaluación en mujeres anovulatorias a las que intentásemos provocar la ovulación.

Existen estudios con LH-RH, que abordan el problema de la estereoidogenesis (355) pero nos ha llamado la atención, el que numerosos trabajos con análogos (321,337,338,347,348,377,378,396, y 410), no hayan puesto atención a este fenómeno, por lo cual en nuestro estudio medimos, por RIA, el 17β -estradiol.

Los resultados nos indican que después de la administración de 10 ug de D-Trp⁶-LH-RH IV en un sólo pulso, se produce un pico de LH aproximadamente a los 180 minutos, y el pico del 17β estradiol aparece tres horas más tarde, siendo los valores significativamente más altos que los basales a los 480 minutos ($p < 0.05$).

Nos ha llamado profundamente la atención ver que las respuestas de las gonadotropinas, tanto en los hombres como en las mujeres, sean tan significativamente distintas. Esta diferencia es, en cantidad durante las 8 horas y en todos los tiempos evaluados, en que los valores en las mujeres fueron significativamente más

altos ($p < 0.05$) que en los hombres, sino que cualitativamente - eran distintos. Basados en otras experiencias con LH-RH realizadas en nuestro Laboratorio (449) y en estas que acabamos de - enumerar, esto nos hace pensar que existe una diferencia sexual Hipotálamo-Hipofisaria, que imprime estas características y en segundo lugar, y como consecuencia de lo primero, que los receptores femeninos, a este nivel, tienen una mayor especificidad - por el D-Trp⁶-LH-RH y/o porque, los estrógenos permiten una sensibilidad mayor.

Estos dos estudios anteriores, nos habían demostrado perfectamente que el D-Trp⁶-LH-RH, era un potente liberador de LH y FSH y uqe además su tiempo de estimulación, y por lo tanto de - niveles elevados de gonadotropinas, se mantenían al menos durante 8 horas. Se añadía el hecho de que en ninguno de los casos estudiados habíamos sido capaces de detectar el más mínimo efecto secundario, y por lo tanto pensamos que estábamos ante una sustancia idónea para ser utilizada en la clínica, y que por - otra parte nadie hasta ahora lo había estudiado en la especie humana.

Esto por una parte era desventajoso, en el sentido de no tener ningún criterio distinto al nuestro, pero pese a ello creíamos estar fundamentados en nuestros propios estudios de fisiofarmacología en sujetos normales. Desconocíamos cuál iba a ser la acción del análogo en pacientes con patología hipotalámica pero en teoría, todo parecía indicarnos que en el peor de los casos - no habrían efectos secundarios de que lamentarnos, por lo cual - procedimos a buscar un grupo de pacientes masculinos y femeninos, los cuales su alteración gonadal, se pensase que fuese producida

por un fallo hipotalámico. A continuación y separadamente, comentaremos los resultados obtenidos en pacientes masculinos y femeninos, a los cuales hemos tratado con D-Trp⁶-LH-RH.

3.- PACIENTES MASCULINOS CON HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROPICO

Los estudios hormonales en pacientes masculinos con patología hipogonadal (361,381,384 y 416), así como el uso del LH-RH, son numerosos, pero no demostrativos de un efecto positivo absoluto, no por ello dejan de ser interesantes (170,310,354,367,374 y 385).

Nuestros estudios en hombres normales habían demostrado que el D-Trp⁶-LH-RH era efectivo en liberar gonadotropinas y estimular la testosterona.

Para el tratamiento en sujetos hipogonadales, nos decidimos por una dosis de 10 µg c/8 horas IM, ya que sabíamos que con dicha dosis los niveles de LH y FSH se mantenían elevados al menos durante 8 horas, como lo demostramos en el test de 10 µg IV en un solo pulso que realizamos a los tres sujetos con hipogonadismo hipogonadotrófico. La duración del tratamiento, no tenía que ser menor a los 90 días, ya que el ciclo espermático es de 74-4-5 días, según lo han demostrado los estudios de HELLER y CLERMONT (403 y 419).

Usando esta dosis de D-Trp⁶-LH-RH, 50 veces menor que la utilizada por MORTIMER y colaboradores (291) con el LH-RH, pudimos comprobar que los niveles de gonadotropinas a lo largo del tratamiento (13-17 semanas) fueron detectadas por nuestro RIA de gonadotropinas, sin que hubiesen variaciones significativas. Esto --

nos demostraba dos cosas: primero, que con esta dosis no agotábamos las células hipofisarias y, segundo, que no había formación de anticuerpos anti-D-Trp⁶-LH-RH, lo que estaba de acuerdo con los estudios de STONE y colaboradores con el LH-RH (408).

Los niveles de Testosterona, en los tres pacientes motivo de este protocolo, medidos a lo largo de todo el tratamiento en términos de media, duplicaron los obtenidos basalmente, aunque en algunos casos este valor se quintuplicó. Quisiera llamar la atención, sobre un aspecto, es el que la recogida de las muestras de sangre la hacíamos a las 9 de la mañana, es decir a las 8 horas de la última inyección del análogo, lo cuál, al menos en teoría, nos debía hacer pensar que los valores de LH, FSH y Testosterona, posiblemente estarían muy bajos por lo que creemos que los datos de nuestra casuística, tienen intrínsecamente más valor.

La correlación entre incrementos de testosterona y cambios en los caracteres sexuales de los sujetos estudiados fué clara. Así, hubo un incremento del vello axilar y púbico, en todos ellos, aumento de la barba y el bigote, con crecimiento testicular y, en uno de ellos, el pene creció 3 centímetros.

El incremento de la libido, experimentada por todos los pacientes, podría ser explicado por los cambios hormonales, pero quizás esto también podría deberse a una acción directa del análogo en el SNC. Esta hipótesis la basamos por un lado, en el hecho de -- que la aparición de la libido aconteció ya en el primer mes del tratamiento, cuando los cambios sexuales no estaban muy claros, -- ni tampoco el incremento testicular y por otra parte, por lo descrito por Van Loon a quien cita SCHALLY en su trabajo (127), quién

refiere que los niveles de testosterona sérica por encima de 200 ng/100ml pueden ser suficientes para mantener la libido y erecciones, poluciones nocturnas, nos indica que esta pequeña dosis no solamente fué capaz de provocar cambios hormonales, sino que se produjeron cambios importantes en la conducta del individuo, con pérdida en todos ellos de su acentuada timidez.

El estudio de las biopsias testiculares, realizadas, antes y después del tratamiento, nos hacen ver que los cambios hormonales producidos por el análogo y mantenidos durante un período de tiempo entre 13 a 17 semanas, son capaces de inducir un desarrollo testicular importante.

Antes del tratamiento, el estudio histopatológico de las muestras testiculares de los pacientes indicaba que todos ellos tenían escasas células germinales en estado de espermatogonia. Después del tratamiento se pudo apreciar claramente que hubo un incremento notable del número de espermatogonias, del número de células germinales y además, esto era lo más importante, se pudo constatar que había espermátides, es decir células germinales que habían madurado, lo que quería decir que se habían producido cambios cualitativamente muy importantes. En este sentido creemos que hubiese sido conveniente dos cosas: primero, prolongar el tratamiento con el fin de que estos cambios cualitativos prosiguiesen y de esta manera podíamos llegar a una maduración completa del espermatozoide. En segundo lugar, aumentando un poco la dosis, quizás una sola inyección de 50 µg, sería lo indicado, ya que esta dosis como hemos podido estudiar, produce un incremento significativo de la FSH. En todo caso nosotros creemos que estos resultados demuestran que el D-Trp⁶-LH-RH, son una nueva terapéutica en el tratamiento de los Hipogonadismos Hipogonadotrópicos.

4.- Mujeres anovulatorias

Lo primero que realizamos en las mujeres anovulatorias fué - un ciclo de estudio muy extenso, al menos 24 días, en el cuál de mostramos la no existencia de un pico ovulatorio, es decir constatamos la sospecha de que estas pacientes tenían algún fallo -- ovárico y que previamente ya habían sido estudiadas con varios - métodos (323 y 372).

ZARATE y sus colaboradores (296) trataron 42 mujeres en las que sospechaban una anovulación de causa Hipotalámica. Incluyeron 24 casos de Stein-Leventhal. Después del tratamiento 10 ovularon y 7 se quedaron embarazadas. La dosis de 500 µg de LH-RH dada tres veces al día, por períodos que variaron entre 5 y 20 - días produjo el mayor número de ovulaciones. 24 pacientes mostraron signos de crecimiento folicular evidente, lo que se comprobó por el incremento de los estrógenos en orina, pero no hubo ovulación evidente. El tratamiento de 15 mujeres con anovulación y - esterilidad, probablemente debidas a una deficiencia hipotalámica idiopática con LH-RH durante 28 ciclos, indujo signos clínicos de ovulación en 13, pero el embarazo solamente se consiguió - en 3 ciclos durante la terapia y 2 mujeres más quedaron embarazadas en 2 ciclos subsiguientes (304). Estos resultados hacen ver que pequeñas y frecuentes dosis de LH-RH son más efectivas que - grandes dosis con menos frecuencia.

Por otra parte FIGUEROA-CASAS y colaboradores (298) obtuvieron una proporción relativamente alta de ovulaciones y embarazos en 15 mujeres con esterilidad anovulatoria con LH-RH, después - de inducir la maduración folicular con LH-RH, Clomifeno y Pergonal. 25 ciclos de tratamiento dieron como resultado 10 ovulaciones y 5 embarazos. Dos de estos embarazos ocurrieron durante el

primer ciclo, después del tratamiento con LH-RH sólo. Resultados muy convincentes han sido obtenidos por NILLIUS y sus colaboradores (390). Ellos trataron 4 mujeres con "anorexia nervosa" administrando 500 µg de LH-RH, tres veces diarias durante aproximadamente 4 semanas y obtuvieron maduración folicular y ovulación en todas las pacientes.

Todos estos estudios y muchos otros (76,166,171,172,297,298,312,324,327,375,386,422,445 y 447) nos demuestran que la LH-RH -- por sí sola o en combinación con otros compuestos (Clomifeno, -- Pergonal) es capaz de inducir ovulación en la mujer.

Por otra parte, COMARU y POVOA y sus colaboradores (331 y -- 332) y ZARATE y sus colaboradores (398) han probado dos análogos superactivos del LH-RH, muy semejantes al compuesto utilizado por nosotros, que son el D-Ala⁶-LH-RH(EA) y el D-Leu⁶-LH-RH(EA). Zárate y sus colaboradores encontraron 2 ovulaciones en 14 pacientes, y ninguna de ellas se quedó embarazada. De Medeiros-Comaru y sus colaboradores, trataron a 7 mujeres anovulatorias con D-Ala⁶-LH-RH(EA), y de estas 3 ovularon y además, por un período de 17 meses, mantenían unas menstruaciones normales, quedando una de ellas embarazada. Cuando empleó el D-Leu⁶-LH-RH(EA) no encontró signos de ovulación.

Nuestros estudios fisiofarmacológicos en mujeres normales con el D-Trp⁶-LH-RH, nos indicaban que este compuesto era significativamente más potente que el LH-RH en liberar LH y FSH ($p < 0.05$), sin que en ningún momento hubiésemos podido detectar efecto colateral alguno. Por lo tanto, nosotros contábamos con tres criterios lógicos para aplicar el D-Trp⁶-LH-RH en mujeres anovulatorias.

El primero, que el LH-RH era capaz de inducir ovulación, por sí sólo o en combinación con otros estimulantes, siendo la mejor forma de obtener resultados positivos con dosis relativamente pequeñas. Segundo, que dosis altas de análogos muy semejantes al nuestro no habían sido capaces de producir los efectos benéficos que en teoría se pensaba y, en tercer lugar, habíamos demostrado nosotros que con dosis bajas podíamos mantener las gonadotropinas elevadas por un tiempo no menor de ocho horas.

Se nos planteaba entonces un difícil problema ¿cuál era la dosis apropiada para la inducción de la ovulación en mujeres -- anovulatorias?. Ningún trabajo de los que nosotros hemos podido leer en la literatura mundial, nos daba criterio alguno para buscar la dosis adecuada. Por ello, tuvimos que remitirnos a -- nuestros propios resultados. Había un dato que nos llamaba -- profundamente la atención, nosotros habíamos visto que con 5 µg IV en un sólo pulso, se lograba un incremento de la FSH y LH -- mantenido y superior al que se obtenía con 100 µg de LH-RH; era evidente entonces que si nosotros pensábamos continuar una infusión durante 8 horas, tuviésemos que pasar, cada hora, 5 µg. -- En conclusión, la dosis total a infundirle en ocho horas a una paciente era de 40 µg, y para asegurarnos una duración más prolongada de las gonadotropinas elevadas podíamos añadir una dosis similar vía SC al término de la infusión. Este criterio fué -- cumplido en todas las pacientes estudiadas, y lo que variamos -- fué la manera de madurar el folículo.

Nuestros resultados indican que la terapéutica utilizada fué efectiva para inducir la ovulación en el 55% de los casos estudiados, añadiéndose un 33% de embarazos. Este dato cobra su verdadero significado, sabiendo que las pacientes, con antelación a --

nuestro estudio, fueron tratadas con HCG, HMG y Clomifeno sin que con ninguno de esos tratamientos se obtuviesen resultados positivos.

Al objeto de obtener una maduración folicular tres mujeres -- fueron tratadas con dosis entre 10 y 30 μ g diarias, previas a la infusión. De las tres dos ovularon y una se quedó embarazada; la otra paciente que ovuló era la anorexia nervosa, que tuvo una magnífica respuesta de LH y FSH, con LH-RH al contrario de lo observado por Vigersky y colaboradores (409) en esta enfermedad.

Una paciente tomó Clomifeno durante 5 días a dosis de 100 mg/día con el fin de madurar el folículo, y ocho días más tarde de la última dosis del Clomifeno, se le practicó la infusión del análogo. Posteriormente las cifras del Pregnandiol fueron las más altas que hemos podido ver de todas las pacientes, y la ovulación fué evidente.

Curiosamente, la paciente a la que tratamos con Pergonal, el día de la infusión no tuvo un incremento considerable de las gonadotropinas, lo que está de acuerdo con lo estudiado por BRECKWOLD y sus colaboradores (397) y MIYAKE y sus colaboradores (383).

Un dato que es muy interesante bajo nuestro punto de vista, es que todas las pacientes anovulatorias que ovularon, tenían un Area Total, igual o superior a aquellas pacientes normales que nosotros habíamos estudiado en fase ovulatoria y a las cuales -- les inyectamos 10 μ g IV en infusión continua. Este podría ser en nuestro criterio otro parámetro a tener en cuenta en la ovulación, sobre todo en pacientes anovulatorias en las que se sospecha que la causa de su alteración está a nivel Hipotalámico.

CONCLUSIONES

E.- CONCLUSIONES

- 1.- El D-Trp⁶-LH-RH, es un análogo más potente para estimular las gonadotropinas hipofisarias que el LH-RH, en la especie humana.
- 2.- El D-Trp⁶-LH-RH, es 10 veces más potente que el LH-RH en los hombres normales.
- 3.- Este análogo en las mujeres normales y fase folicular tiene una potencia 40 y 21 veces mayor que el LH-RH para estimular LH y FSH.
- 4.- En hombres, la vía IV en infusión continua, es la que produce una mayor y más prolongada liberación de las gonadotropinas hipofisarias, cuando se utiliza este análogo.
- 5.- La vía óptima para estimular la LH y FSH, en mujeres normales en todas las fases del ciclo menstrual, con el D-Trp⁶-LH-RH, es la IV en un sólo pulso.
- 6.- En hombres, cuando se inyectan 50 ug de este análogo vía IV - en infusión continua se obtiene un incremento significativo de la FSH ($p < 0.05$).
- 7.- Este análogo, en las mujeres normales, produce un incremento significativamente superior ($p < 0.05$) de la LH y FSH, si se compara con lo obtenido en hombres normales.
- 8.- En pacientes masculinos con Hipogonadismo Hipogonadotrópico, este análogo es capaz de:

- Mantener niveles adecuados de LH y FSH por largos períodos de tiempo (13-17 semanas).
- Incrementar los niveles de Testosterona en sangre periférica.
- Producir cambios cualitativos en los caracteres sexuales.
- Producir cambios cuantitativos y cualitativos de las células germinales testiculares.
- Producir un aumento del tamaño testicular.

9.- En las mujeres anovulatorias, este análogo es capaz de producir:

- Maduración folicular.
- Ovulación en un 55% de los casos.
- Embarazos en un 33%.

10.- Creemos que este nuevo compuesto, análogo de la LH-RH, el D-Trp⁶-LH-RH, puede ser un nuevo camino en el tratamiento de la Esterilidad ya que en las mujeres anovulatorias es capaz de producir ovulación y embarazo sin complicaciones secundarias y en los hombres que padecen de hipogonadismo hipogonadotrópico, cambios cualitativos en las células germinales y en las células intersticiales.

B I B L I O G R A F I A

G.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- GREEN, J.D.: The Comparative Anatomy of the Portal Vascular System and of the Innervation of the Hypophysis. In: The Pituitary Gland. (Eds.) G.W. Harris and B.T. Donovan. pp: 240-268. Butterworths. London. 1966.
- 2.- HEAPE, W.: Ovulation and Degeneration of Ova in the Rabbit. Proc Roy Soc B 76: 260, 1905.
- 3.- BAYLEY, P. and BREMER, F.: Experimental Diabetes Insipidus. Arch Int Med 28: 773, 1921.
- 4.- MARAÑON, G. et PINTOS, J.: Nouvelle Iconographie de la Salpetriene 28: 185, 1917.
- 5.- SCHALLY, A.V., LIPSCOMB, H.S. and GUILLEMIN, R.: Isolation and Amino Acid Sequence of α_2 -Corticotropin-Releasing Factor (α_2 -CRF) from Hog Pituitary Glands. Endocrinology 71: 164, 1962.
- 6.- TALEISNIK, S. and ORIAS, R.: A Melanocyte-stimulating Hormone-releasing Factor in Hypothalamic Extracts. Am J Physiol 208: 293, 1965.
- 7.- KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., GUAL, C. and ARIMURA, A.: Release of LH and FSH after Administration of Synthetic LH-Releasing Hormone. J Clin Endocrinol Metab 34: 753, 1972.
- 8.- SAFRAN, M., SCHALLY, A.V. and BENFEY, B.G.: Stimulation of the Release Corticotropin from the Adenohypophysis by a Neurohypophysial Factor. Endocrinology 57: 439, 1955.
- 9.- IGARASHI, M. and McCANNS, M.: A Hypothalamic Follicle Stimulating Hormone-Releasing Factor. Endocrinology 74: 446, 1964.
- 10.- McCANN, S.M., TALEISNIK, A. and FRIEDMAN, H.M.: LH-Releasing Activity in Hypothalamic Extracts. Proc Soc Exp Biol Med 104: 432, 1960.

- 11.- SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BABA, Y., NAIR, R.M.G., MATSUO, H., REDDING, T.W., DEBELJUK, L. and WHITE, W. F.: Isolation and Properties of the FSH and LH Releasing Hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393, 1971.
- 12.- KRAGT, C.L. and MEITES, I.: Stimulation of Pigeon Pituitary Prolactin Release by Pigeon Hypothalamic Extract in Vitro. *Endocrinology* 76: 1169, 1965.
- 13.- MEITES, J., NICOLI, C.S. and TALWALKER, P.K.: The Central Nervous System and the Secretion and Release of Prolactin. In: *Advances in Neuroendocrinology* (Ed) A.V. Nalbandau. pp. 238-277. University of Illinois. Pres, Urbana. 1963.
- 14.- FRANZ, J., HASELBACH, C.H. and LIBERT, O.: Studies of the Effect of Hypothalamic Extracts on Somatotrophic Pituitary Function. *Acta Endocr (Kobenhaun)* 41: 336, 1962.
- 15.- KRULICH, L. and McCANN, S.M.: Influence of Stress on the Growth Hormone (GH) Content of the Pituitary of the Rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 612, 1966.
- 16.- SCHALLY, A.V., BABA, V., NAIR, R.M.G. and BENNETT, C. D.: The Amino Acid Sequence of a Peptide with Growth Hormone-releasing Activity Isolated from Porcine Hypothalamus. *J Biol Chem* 246: 6647, 1971.
- 17.- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N., BUTCHER, M., RIVIER, J. and GUILLEMIN, R.: Hypothalamic Polypeptide that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science* 179: 77, 1973.
- 18.- GREEN, J.D. and HARRIS, G.W.: The Neurovascular Link -- Between the Neurohypophysis and Adenohypophysis. *C R Acad Sci* 250: 4462, 1960.

- 19.- POPA, G.T. and FIELDING, J.: Hypophysis-portal Vessels and their Colloid Accompaniment. J Anat (London) 67: 227, 1930.
- 20.- ACHUCARRO, N.: Notas sobre la estructura y funciones de la Neuroglia y en Particular de la Neuroglia de la Corteza Cerebral Humana (con nueve gravados). Trab Invest Biol (Madrid) 11: 187, 1912.
- 21.- HARRIS, G.W.: The Function of the Pituitary Stalk. Bull Johns Hopkins Hosp 97: 358, 1955.
- 22.- HOUSSAY, B.A., BIASOTTI, A. et SANMARTINO, R.: Modifications Fonctionelles de L'hypophyse Après les Lesion Infundibulo-tuberiennes Chez le Chapeud. Compt Rend Soc Biol 120: 725, 1935.
- 23.- WISLOCKI, G.B. and KING, I.S.: The Permeability of the Hypophysis and Hypothalamus to Vital Dyes, with Study of the Hypophysial Vascular Supply. Amer Anat 58: 421, 1936.
- 24.- GREEN, J.D. and HARRIS, G.W.: Observation of the Hypophysis-portal Vessels of the Living Rat. J Physiology 105: 359, 1949.
- 25.- DANIEL, P.M. and PRICHARD, M.M.L.: Anterior Pituitary Necrosis. Infartation of the Pars Distalis Produced Experimentally in the Rat. Quart J Exp Physiol 41: 215, 1956.
- 26.- HARRIS, G.W.: Oestrus Rhythm, Pseudopregnancy and the Pituitary Stalk in the Rat. J Physiol (London) 111: 347, 1950.
- 27.- NIKITOVICH-WINER, M.B. and EVERETT, J.W.: Functional Restitution of Pituitary Grafts Retrasplanted from Kidney to Median Eminence. Endocrinology 63: 916, 1958.
- 28.- SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SAMANO, A. and REEDING, T.W.: Hypothalamic Neurohormones Regulating Pituitary Function. Rec Progr Hormone Res 24: 497, 1968.

- 29.- REICHLIN, S.: Neuroendocrinology. In: Textbook of Endocrinology (Ed) R.H. Williams. pp 774-831. Saunders Company, - Philadelphia, 1974.
- 30.- REICHLIN, S.: Function of the Hypothalamus. Amer J Med 43: 477, 1967.
- 31.- BOWERS, C.Y., SCHALLY, A.V., SCHALCH, D.S., GUAL, C., KASTIN, A.J. and FOLKERS, K.: Activity and Specificity of Synthetic Thyrotropin Releasing Hormone in Man. Biochem Biophys Res Commun 39: 352, 1970.
- 32.- GREER, M.A., YAMADA, T., ILMO, S.: Ann N.Y. Acad Sci 86: - 388, 1962.
- 33.- SCHREIBER, B., RYBACK, M., ECKERTOVA, A., JIRGL, V., KOCI, - J., FRANS, Z. and KINENTOVA, V.: Effect of Fraction of Bovine Hypothalamic Extract on the Release of TSH by Rat Adenohypophysis "in vitro". Biochem Biophys Res Commun 25: 165, 1966.
- 34.- SCHREIBER, B., RYBACK, M., ECKERTOVA, A., JIRGL, V., KOCI, J., FRANC, Z. and KINETOVA, V.: Isolation of a Hypothalamic Peptide with TRF (Thyrotropin Releasing Factor) Activity, "in vitro". Experientia 18: 338, 1962.
- 35.- GREER, M.A., YAMADA, T., ILMO, S.: The Participation of the - Nervous System in the Control of Thyroid Function. Ann N.Y. - Acad Sci 86: 667, 1960.
- 36.- GUILLEMIN, R., YAMASAKI, E., JUTISZ, M. et SAKIS, E.: Presence dans un Extrait de Tissus Hypothalamiques D'une Substance Stimulant la Secretion de L'hormone Hypophysaire Thyreotrope (TSH). Premiere Purification par Filtration Sur Gel Sephadex. Contes Rend Acad Sciences (Paris) 255: 1018, 1962
- 37.- SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y. and REDDING, T.W.: Purification - of Thyrotropic Hormone-releasing Factor from Bovine Hypothalamus. Endocrinology 78: 726, 1966.

- 38.- BURGUS, R., DUNN, T.F., DESIDERIO, D., WARD, D.N., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Characterization of Ovine Hypothalamic Hypophysiotropic TSH-releasing Factor. *Nature* 226: 321, -- 1970.
- 39.- AVERILL, R.L.W., SALAMAN, D.F. and WORTHINGTON, Jr. W.C.: Thyrotropin Releasing Factor in Hypophyseal Portal Blood. - *Nature* 211: 144, 1966.
- 40.- AVERILL, R.L.W., and KENNEDY, T.H.: elevation of Thyrotropin Release by Intrapituitary Infusion of Crude Hypothalamic -- Extracts. *Endocrinology* 81: 113, 1967.
- 41.- PORTER, J.C., VALE, W., BURGUS, R., MICAL, R.S. and GUILLEMIN, S.: Release of TSH by TRF Infused Directly Into a Pituitary Portal Vessel. *Endocrinology* 89: 1054, 1971.
- 42.- SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SAWANO, S. and READING, T.W.: Hypothalamus Neurohormones Regulating Anterior Pituitary Function. *Recent Progr Horm Res* -- 24: 497, 1968.
- 43.- BOWERS, C.Y. SCHALLY, A.V., ENZMANN, F., BABER, J. and FOLKERS, K.: Porcine Thyrotropin Releasing Hormone is (Pyro) - Glu-His-Pro(NH₂). *Endocrinology* 86: 1143, 1970.
- 44.- REEDDING, T.W. and SCHALLY, A.V.: Studies on the Thyrotropic Releasing Hormone (TRH) Activity in Peripheral Blood. *Proc - Soc Exp Biol Med* 131; 420, 1969.
- 45.- BASIRI, R.M. and UTINGER, R.D.: The Preparation and Specificity of Antibody to Thyrotropin Releasing Hormone. *Endocrinology* 90: 722, 1972.
- 46.- BASIRI, R.M., and UTINGER, R.D.: Serum Inactivation of the Immunological and Biological Activity of Thyrotropin-releasing Hormone (TRH). *Endocrinology* 91: 657, 1972.

- 47.- REDDING, T.W. and SCHALLY, A.V.: The Distribution of Radioactivity Following the Administration of Labeled Thyrotropin - Releasing Hormone (TRH) in Rats and Mice. *Endocrinology* 89: 1075, 1971.
- 48.- MITNICK, M.A. and REICHLIN, S.: Enzymatic Synthesis of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) by hypothalamic "RH Synthetase". *Endocrinology* 91: 1143, 1972.
- 49.- WILBER, J.F.: Stimulation of ¹⁴C-glucosamine and ¹⁴C-alanine Incorporation Into Thyrotropin by Synthetic Thyrotropin-releasing Hormone. *Endocrinology* 89: 873, 1971.
- 50.- TASHJIAN, A.H., BAROWSKI, N.J. and JENSEN, D.K.: Thyrotropin Releasing Hormone: Direct Evidence for Stimulation of Prolactin Production by Pituitary Cells in Culture. *Biochem Biophys Res Comm* 43: 516, 1971.
- 51.- BOWERS, C.Y., FRIESEN, H.G., HWANG, P., GUYDA, H.J. and FALKERS, K.: Prolactin and Thyrotropin Release in Man by Synthetic Pyroglutamic Histidyl-Prolineamide. *Biochem Biophys Res Comm* 45: 1033, 1971.
- 52.- JACOBS, L.S., SRYDER, P.J., WILBER, J.F., UTIGER, R.D. and DAUGHADAY, W.H.: Increased Serum Prolactin After Administration of Synthetic Thyrotropin-releasing Hormone (TRH) in Man. *J Clin End Metab* 33: 996, 1971.
- 53.- RIVIER, J., BURGUS, R. and VALE, W.: 3-Methyl-TRF, a Synthetic Analogue with Specific Activity Greater than TRF. Program of the 53th Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, 1971. Resumen 88.
- 54.- BOWERS, C.Y., SCHALLY, A.V., HAWLEY, W.D., GUAL, C. and PARLOW, A.: Effect of Thyrotropin-Releasing Factor in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 28: 978, 1968.

- 55.- ANDERSON, M., BOWERS, C.Y., KASTIN, A.J., SCHALCH, D., --
SCHALLY, A.V., SNYDER, P., UTIGER, R., WILBER, J.F. and -
WISE, A.J.: Synthetic Thyrotropin-Releasing Hormone a Potent
Stimulator of Thyrotropin Secretion in Man. N Engl J Med 285:
1279, 1971.
- 56.- HAIGLER, E.D., Jr., PITMAN, Jr., J.A., HERSHMAN, J. and BAUGH,
C.M.J.: Direct Evaluation of Pituitary Thyrotropin Reserve -
Utilizing Synthetic Thyrotropin Releasing Hormone. J Clin En-
docrinol Metab 33: 573, 1971.
- 57.- FRANGE, Jr., A.J., WILSON, I.C., LARA, P.P., ALTOP, L.B. and
BREESE, G.R.: Effect of Thyrotropin Releasing Hormone in De-
pression. Lancet 2: 999, 1972.
- 58.- KASTIN, A.J., EHRESING, R.H., SCHALCH, D.S. and ANDERSON, M.
S.: Improvement in Mental Depression with Decreased Thyrotro-
pin Response After Administration of Thyrotropin Releasing -
Hormone. Lancet 2: 740, 1972.
- 59.- KRAGT, C. and MEITES, J.: Dose-Response Relationships Between
Hypothalamic PIF and Prolactin Release by Rat Pituitary -
Tissue "in vitro". Endocrinology 80: 1170, 1967.
- 60.- PASTEELS, J.L.: Secretion of Prolactin by the Pituitary in -
Tissue Culture. C R Acad Cci (Paris) 253: 2140, 1961.
- 61.- PASTEELS, J.L.: Administration of Hypothalamic Extracts to the
Rat Pituitary "in vitro", with a view to Controlling the Se-
cretion of Prolactin. C R Acad Cci (Paris) 254: 2664, 1962.
- 62.- DHRIMAL, A.P.S., GROSVENOR, C.E., ANTUNES-RODRIGUEZ, J. and
McCANN, S.M.: Studies on the Purification of Ovine Prolactin-
Inhibiting Factor. Endocrinology 82: 1236, 1968.

- 63.- NETTER, F.H.: The Ciba Collection of Medical Illustration. Vol. IV. Endocrine System and Selected Metabolic Diseases. R.R. Donnelley & Company. New York, 1974. Pag. 5.
- 64.- SCHALLY, A.V., KURSHIMA, A., ISHIDA, Y., REEDING, T.W. and BOWERS, C.Y.: The Presence of Prolactin Inhibiting Factor (PIF) in Extracts of Beef, Sheep and Pig Hypothalami. Proc Soc Exp Biol Med 118: 350, 1965.
- 65.- PASTEELS, J.L.: Recherches Morphologiques et Experimentales Sur la Secretion de Prolactine. Arch Biol (Liege) 74: 439, 1963.
- 66.- DESCLIN, L.: A Propus du Mecanisme D'action des Oestrogènes Sur le Lobe Anterieur de L'hypophyse Chez le Rat. Ann Endocrinol (Paris) 2: 656, 1950.
- 67.- EVERETT, J.W.: Luteotrophic Function of Autografts of the - Rat Hypophysis Endocrinology 54: 685, 1954.
- 68.- EVERETT, J.W.: Functional Corpora Lutea Maintained for Months by Autografts of Rat Hypophyses. Endocrinology 58: 786, 1956.
- 69.- MEITES, J. and HOPKINS, T.F.: Induction of Lactation and -- Mammary Growth by Pituitary Grafts in Intact and Hipophysectomized Rats. Proc Soc Exp Biol Med 104: 263, 1960.
- 70.- GROVESNOR, C.E., McCANN, J.M. and NALLOR, R.: Inhibition of Nursing-Induced and Stress-Induced Fall in Pituitary Prolactin Concentration in Lactating Ratas by Injection of Acid - Extracts of Bovine Hypothalamus. Endocrinology 76: 883, 1965.
- 71.- DANON, A., DIKSTEIN, S. and SULMAN, F.G.: Stimulation of Prolactin Secretion by Perphenazine in Pituitary-Hypothalamus organ Culture. Proc Soc Exp Biol Med 114: 336, 1963.

- 72.- SCHALLY, A.V., MEITES, J., BOWERS, C.Y. and RATNER, A.: - Identity of Prolactin Inhibiting Factor (PIF) and Luteinizing Hormone-Releasing Factor (LRF) Proc Soc Exp Biol Med 117: 252, 1964.
- 73.- KRAGT, C.L. and MEITES, J.: Stimulation of Pigeon Pituitary Prolactin Release by Pigeon Hypothalamic Extract "in vitro". Endocrinology 76: 1169, 1965.
- 74.- MISHKINSKY, J., KHAZEN, K. and SULMAN, F.G.: Prolactin-Releasing Activity of the Hypothalamus in Post-partum Rats. Endocrinology 82: 611, 1968.
- 75.- NICOLL, C.S., PERSONS, J.A., FIORINDO, R.P., NICHOLS, C.W.Jr. and SAKUMA, M.: Evidence of Independent Secretion of Prolactin and Growth Hormone "in vitro" by Adenohypophyses of Rhesus Monkeys. J Clin Endocr 30: 512, 1970.
- 76.- SCHALLY, A.V., ARIMURA, A. and KASTIN, A.J.: Hypothalamic Regulatory Hormones. Science 179: 341, 1973.
- 77.- ARIMURA, A., DEBELJUK, L. and SCHALLY, A.V.: LH Release by - LH-Releasing Hormone in Golden Hamsters at Various Stages of Strous Cycle. Proc Soc Exp Biol Med 140: 609, 1972.
- 78.- MOGUILEVSKY, J.A. y SCHIAFFINI, O.: Hipófisis. pág. 102. López Libreros Editores. Buenos Aires. 1972.
- 79.- MOGUILEVSKY, J.A. y SCHIAFFINI, O.: Hipófisis. pág. 9. López Libreros Editores. Buenos Aires. 1972.
- 80.- SAFRAN, M., SCHALLY, A.V. and BENFEY, B.G.: Stimulation of the Release of Corticotropin from the Adenohypophysis by a Neurohypophysial Factor. Endocrinology: 57: 439, 1955.
- 81.- AMOSS, M., RIVIER, J and GUILLEMIN, R.: Release of Gonadotropins by Oral Administration of Synthetic LRF or a Tripeptide Fragment of LRF. J Clin Endocrinol Metab 35: 175, 1972.

- 82.- BURGUS, R. and GUILLEMIN, R.: Hypothalamic Releasing Factors. *Animal R Biochem* 39: 499, 1970.
- 83.- MULLER, E.E., SAITO, T., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: - Hypoglycemia, Stress and Growth Hormone Release: Blockade of Growth Hormone Release by Drugs Acting on the Central - Nervous System. *Endocrinology* 80: 109, 1967.
- 84.- RAMIREZ, V.D. and McCANN, J.M.: A Highly Sensitive Test for LH-Releasing Activity: the Ovariectomized, Estrogen Progesterone-Blocket Rat. *Endocrinology* 73: 193, 1963.
- 85.- HILTON, J.C.: Adrenocorticotropic Action of Antidiuretic Hormone. *Circulation* 21: 1038, 1960.
- 86.- ANDERSON, E.: Adrenocorticotrophin-Releasing Hormone in Peripheral Blood: Increase During Stress. *Science* 152: 379, - 1966.
- 87.- HEDGE, G.A., YATES, M.B., MARCUS, R. and YATES, F.E.: Site of Action of Vasopressin Causing Corticotropin Release. *Endocrinology* 79: 328, 1966.
- 88.- MULDER, A.H., GRUNZE, J.J. and DeWIED, D.: Studies on the - Subcellular Localization of Corticotrophin Releasing Factor (CRF) and Vasopressin in the Median Eminence of the Rat. *Endocrinology* 87: 61, 1970.
- 89.- SEIDEN, G. and BRODISH, A.: Persistence of a Diurnal Rhythm in Hypothalamic Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) in - the Absence of Hormone Feedback. *Endocrinology* 90: 1401, - 1972.
- 90.- SCHALLY, A.V. and GUILLEMIN, R.: Isolation and Chemical -- Characterization of Beta-CRF from Pig Posterior Pituitary Glands. *Proc Soc Biol Med* 112: 1014, 1964.

- 91.- SCHALLY, A.V. and BOWERS, C.Y.: Corticotrophin-releasing -
Factor and Others Hypothalamic Peptides. *Metabolism* 13: 1190,
1964.
- 92.- PARKER, D.C., SASSIN, J., MOCE, J., GOTLIN, R. and ROSSMAN,
L.: Human Growth Hormone Release During Sleep: Electroence-
phalographic Correlation. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 871, -
1969.
- 93.- BLACKARD, W.G. and HEIDINEPFELDER, S.A.: Adrenergic Receptor
Control Mechanism for Growth Hormone Secretion. *J Clin Invest*
47: 1407, 1968.
- 94.- FROMAN, L.A. and BERMORDIS, L.L.: Growth Hormone and Insulin
Levels in Weanling Rats with Ventromedial Hypothalamic Lesions.
Endocrinology 82: 125, 1968.
- 95.- ROTH, J., GLICK, S.M., YALOW, R.S. and BERSON, S.A.: Hypogly-
cemia: A Potent Stimulus to Secretion of Growth Hormone. -
Science 140: 987, 1963.
- 96.- ABRAMS, R.L., PARKER, M.L., BLANCO, J., REICHLIN, J. and --
DAUGHADAY, W.H.: Hypothalamic Regulation of Growth Hormone -
Secretion. *Endocrinology* 78: 605, 1966.
- 97.- DEUBEN, R. and MEITES, J.: Stimulation of Pituitary Growth -
Hormone Release by a Hypothalamic Extract "in vitro". *Endocri-
nology* 74: 408, 1964.
- 98.- SCHALLY, A.V., MULLER, E. and SAWANO, S.: Effect of Porcine
Growth Hormone-Releasing Factor on the Release and Synthesis
of Growth Hormone "in vitro". *Endocrinology* 82: 271, 1968.
- 99.- DICKERMAN, E., NEGRO-VILLAR, A. and MEITES, J.: In Vitro, -
Assay for Growth Hormone Releasing-Factor (CHRF). *Neuroendo-
crinology* 4: 75, 1969.

- 100.- WILBER, J. and PORTER, J.: Thyrotropin and Growth Hormone Releasing Activity in Hypophysial Portal Blood. *Endocrinology* 87: 807, 1970.
- 101.- SAKUMA, M. and KNOBIL, E.: Inhibition of Endogenous Growth Hormone Secretion by Exogenous Growth Hormone Infusion in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* 86: 899, 1970.
- 102.- FROHMAN, L., MARAN, J. and DHARWAL, A.P.S.: Plasma Growth -- Hormone Responses to Intrapituitary Injections of Growth -- Hormone Releasing Factor (GRF) in the Rat. *Endocrinology* 88: 1483, 1971.
- 103.- MALACARA, J.M. and REICHLIN, S.: Growth and Growth Hormone (Eds) E. Muller and A. Percile. *Excerpta Medica Amsterdam*, 1972.
- 104.- SCHALLY, A.V., SAWANO, S., ARIMURA, A., BAWETT, J., WAKAYASHI. I. and BOWERS, C.Y.: Isolation of Growth Hormone-Releasing Hormone (GRH) from Porcine Hypothalamic. *Endocrinology* 84: 1493, 1969.
- 105.- SCHALLY, A.V., BABA, Y., NAIR, R.M.G. and BENNETT, E.: The Amino Acid Sequence of a Peptide with Growth Hormone-Releasing Activity Isolated from Porcine Hypothalamus. *J Biol - Chem* 246: 6647, 1971.
- 106.- VEBER, D., BENNETT, C., MILKOWSKI, J., GAL, G., DENKEWALTER, R. and HIRSCHMANN, R.: Synthesis of a Proposed Growth Hormone Releasing Factor. *Biochem Biophys Res Commun* 45: 235, - 1971.
- 107.- KRULICH, L., DHAVIWAL, A.P.S. and McCANN, J.M.: Stimulatory and Inhibitory Effects of Purified Hypothalamic Extracts on Growth Hormone Release from Rat Pituitary "in vitro". *Endocrinology* 83: 783, 1968.

- 108.- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, R., LING, N., BUTCHER, M., RIVIER, J. and GUILLEMIN, R.: Hypothalamic Polypeptide - that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary - Growth Hormone. *Science* 179: 77, 1973.
- 109.- HALL, R., BESSER, G.M. and SCHALLY, A.V.: Action of Growth-Hormone-Release Inhibitory Hormone in Healthy Men and in Acromegaly. *Lancet* 2: 581, 1973.
- 110.- MORTIMER, C.H., TUMBRIDGE, W.M.G., LAW, D., YEOMANS, L. -- LIND, T., COY, D.H., BLOOM, J.R., KASTIN, A., MALLINSON, C. N., BESSER, G.M., SCHALLY, A.V. and HALL, R.: Effects of Growth-Hormone Release-Inhibiting Hormone on Circulating - Glucagon, Insulin, Growth Hormone in Normal, Diabetic, Acro megalic and Hypopituitary Patients. *Lancet* 1: 697, 1974.
- 111.- ALBERTI, K.G.M.M., CHRISTENSEN, N.J., CHRISTENSEN, S.E., -- HANSEN, A., PRANGE, A., IVERSEN, J., LUNDBAEK, K., SEYER-HANSEN, K. and ORSKOV, H.: Inhibition of Insulin Secretion by Somatostatin. *Lancet* 2: 1299, 1973.
- 112.- INVERSEN, J.: Inhibition of Pancreatic Glucagon Release by Somatostatin: "in vitro". *Scan J Clin Lab Invest* 33: 125, - 1974.
- 113.- BLOOM, S.R., MORTIMER, C.H., YHORNER, M.O., BESSER, G.M., HALL, R., GOMEZ-PAN, A., ROY, V.M., RUSSELL, R.C.G., COY, D.H., KASTIN, A.H. and SCHALLY, A.V.: Inhibition of Gastrin and Gastric-Acid Secretion by Growth-Hormone Release-Inhibiting Hormone. *Lancet* 2: 1106, 1974.
- 114.- LE GROS CLARK, N.E.: *J Anat* 64: 371, 1930.
- 115.- KASTIN, A.J. and SCHALLY, A.V.: MSH Activity in Pituitaries of Rats Treated with Hypothalamic Extracts from Various Animals. *Gen Comp Endocrinol* 8: 344, 1967.

- 116.- ETKIN, W.: Hypothalamic Inhibition of Pars Intermedia Activity in the Frog. Gen Comp Endocrinol Suppl 1: 148, 1962.
- 117.- KASTIN, A.J. and ROSS, G.F.: Melanocyte-Stimulating Hormone Activity in Pituitaries of Frogs with Hypothalamic Lesions. Endocrinology 77: 45, 1965.
- 118.- CELIS, M.W., TALEISNIK, S. and WALTER, R.: Regulation of Formation and Proposed Structure of the Factor Inhibiting the Release of Melanocyte-Stimulating Hormone (oxytocin/c-terminal tripeptide/estrous-Cycle/rat). Proc Natl Acad Sci USA 68: 1428, 1971.
- 119.- NAIR, R.M.G., KASTIN, A.J., and SCHALLY, A.V.: Isolation and Structure of Hypothalamic MSH Release Inhibiting-Hormone. Bioch Biophys Res Comm 43: 1376, 1971.
- 120.- CELIS, M.W., TALEISNIK, S. and WALTER, R.: Release of Pituitary Melanocyte-Stimulating Hormone by the Oxytocin Fragment H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-CH. Bioch Biophys Res Commun 45: 564, 1971.
- 121.- BOWER, A., Jr., HADLEY, M.E. and HRUBY, V.J.: Comparative MSH Release-Inhibiting Activities of Tocinic Acid (The Ring of Oxytocin) and L-Pro-L-Leu-Gly-NH₂ (The side Chain of Oxytocin). Biochem Biophys Res Commun 45: 1185, 1971.
- 122.- CRITCHLOW, B.V.: Ovulation Induced by Hypothalamic Stimulation in the Anesthetized Rat. Am J Physiol 195: 171, 1958.
- 123.- MARTINI, L., FRASCHINI, E. and MOTTA, M.: Neural Control of Anterior Pituitary Functions. Recent Progress in Horm Res 24: 439, 1968.

- 124.- MESS, B., ZANISI, M. and TIMA, L.: Site of Production of -
Releasing and Inhibiting Factors. In: The Hypothalamus -
(Eds) L. Martini, M. Motta, and F. Fraschini. 259-276 Aca-
demic Press Inc New York. 1970.
- 125.- WEINER, R.I., PATTOU, E., KERDELHUE, B. and KORDON, C.: -
Differential Effects of Hypothalamic Deafferentation Upon
Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Median Eminen-
ce and Organum Vasculosum of the Lamina Terminalis. Endocri-
nology 97: 1597, 1975.
- 126.- WHITE, W.F., HEDLUND, M.T., WEBER, G.F., RIPPEL, R.H., --
JOHNSON, E.S. and WILBER, J.F.: The Pineal Gland: A Supple-
mental Source of Hypothalamic-Releasing Hormones. Endocrinol-
ogy 94: 1422, 1974.
- 127.- SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and COY, D.H.: LH-Releasing Hor-
mone and its Analogues: Recent Basic and Clinical Investiga-
tions. Int J Fertil 21: 1-30, 1976.
- 128.- GIBBONS, J.M. Jr., MITNICK, M. and CHIEFFO, V.: In Vitro -
Biosynthesis of TSH and LH-Releasing Factors by the Human
Placenta. Am J Obstet Gynecol 121: 127, 1975.
- 129.- MOGUILEVSKY, J.A., ENERO, M.A. and SZWARCFARB, B.: Luteini-
zing Hormone Releasing Hormone-Biosynthesis by Rat Hypotha-
lamus "in vitro". Influence of Castration. Proc Soc Exp --
Biol Med 147: 434, 1974.
- 130.- JOHANSSON, N.G., CURRIE, B.L., FOLKERS, K. and BOWERS, C.Y.:
Biosynthesis of the Luteinizing Hormone Releasing Hormone -
in Mitochondrial Preparations and by a Possible Pantetheine-
Template Mechanism. Biochem Biophys Res Commun 53: 502, 1973.

- 131.- GRIFFITHS, E.C., HOOPER, K.C., JEFFCOATE, S.L. and HOLLAND, D.T.: The presence of Peptidases in the Rat Hypothalamus - Inactivating Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH). Acta Endocrinol 77: 435, 1974.
- 132.- KOCH, Y., BARAM, T., CHOBSENG, P. and FRIDKIN, M.: Enzymic Degradation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) by Hypothalamus Tissue, Biochem Biophys Res Commun 61: 95, 1974.
- 133.- KUHL, H. and TAUBERT, H.D.: Short-Loop Feedback Mechanism of Luteinizing Hormone: LH Stimulates Hypothalamic L-cystine - Arylamidase to Inactivate LH-RH in the Rat Hypothalamus. -- Acta Endocrinol 78: 649, 1975.
- 134.- YOSHIMOTO, Y., MORIDERA, J. and IMURA, H.: Restoration of - Normal Pituitary Gonadotropin Reserve by Administration of Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone in Patients with Hypo gonadotropic Hypogonadism. N Engl J Med 292: 242, 1975.
- 135.- WAKABAYASH, K., DATE, Y. and TAMAOKI, B.T.: On the Mechanism of Action of Luteinizing Hormone-Releasing Factor and Prolactin Release Inhibiting Factor. Endocrinology 92: 698, 1973.
- 136.- DEERY, D.J., and HOWELL, S.L.: Rat Anterior Pituitary Adenyl Cyclase Activity: GTP Requirement of Prostaglandin E₁ and E₂ and Synthetic Luteinizing Hormone-releasing Hormone Activation. Biochem Biophys Acta 329: 17, 1973.
- 137.- BORGEAT, P., GARNEAU, P. and LABRIE, F.: Calcium Requirement for Stimulation of Cyclic AMP Accumulation in Anterior Pituitary Gland by LH-RH. Molec Cell Endocrinol 2: 117, 1975.
- 138.- MAKINO, T.: Study on the Intracellular Mechanism of LH Release in the Anterior Pituitary. Am J Obstet Gynecol 115: 606, 1973.

- 139.- BERGEAT, P., CHAVANCY, G., DuPONT, A., LABRIE, F., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Stimulation of Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphate Accumulation in Anterior Pituitary Gland In Vitro by Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone.- Proc Nat Acad Sci 69: 2677, 1972.
- 140.- JUTISZ, M., KERDELHOE, G., BERAULT, A. and DE LA LLOSA, P.: Gonadotropins. New York, Wiley Interscience, pág. 64, 1972.
- 141.- FRANCHIMONT, P., DEMOULIN, A. and BOURGUIGNON, J.P.: The LH-RH Test for Clinical Diagnosis. In: Basic Applications - and Clinical Uses of Hypothalamic Hormones. (Eds). A Charro Salgado, R. Fernández-Durango and J.G. López del Campo. pág. 244-252. Excerpta Medica. Amsterdam, 1976.
- 142.- YEN, S.C.C., VANDENBERG, G., REBAR, R. and EHARA, Y.: Variation in the Pituitary Responsiveness to Synthetic LRF - During Different Phases of the Menstrual Cycle. J Clin Endocr 35, 931-934, 1972.
- 143.- BOTELLA LLUSIA, J., CHARRO SALGADO, A.L. GUADALIX, F.J. and FERNANDEZ-DURANDO, R.: Sequential Stimulation with Clomiphe- ne and LH-RH as a Diagnostic Aid in Amenorrhea and Sterility. In: Basic Applications and Clinical Uses of Hypothalamic Hormones. (Eds) A. Charro Salgado, R. Fernández-Durango and J.G. López del Campo. pág. 253-260. Excerpta Medica, -- 1976.
- 144.- PEREZ INFANTE, V., JARAMILLO, C., FERNANDEZ-DURANGO, R., - LOPEZ MACIA, A. y CHARRO SALGADO, A.: Respuesta de las Gona- dotropinas al LH-RH en Mujeres y Hombres Normales Tratados con Estrógenos y Testosterona. Reproducción 2: 306, 1975.
- 145.- McCANN, S.M., TALEISNIG, S. and FRIEDMAN, H.M.: LH-Releasing Activity in Hypothalamic Extracts. Proc Soc Exp Biol Med 104: 432, 1960.



- 146.- COURRIER, R., GUILLEMIN, R., JUTISZ, M., SAKIS, E. and --
ASCHEIM, P.: Presence in an Extract of Hypothalamus of a
Substance Stimulating the Secretion of the Luteinizing --
Hormone of the Anterior Pituitary (LH). C R Acad Sci (Paris)
253: 922, 1961.
- 147.- SCHALLY, A.V. and BOWERS, C.Y.: In Vitro and In Vivo Sti-
mulation of the Release of Luteinizing Hormone. Endocrino-
logy 75: 312, 1964.
- 148.- MITTLER, J.C. and MEITES, J.: In Vitro Simulation of Pitui-
tary Follicle-Stimulating Hormone Release by Hypothalamic
Extracts. Proc Soc Exp Biol Med 117: 309, 1964.
- 149.- KUROSHIMA, A., ISHIDA, V., BOWERS, C.Y. and SCHALLY, A.V.:
Stimulation of Release of Follicle-Stimulating Hormone by
Hypothalamic Extracts In Vitro and In Vivo. Endocrinology
76: 614, 1965.
- 150.- SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W. and ARIMURA, A.:
Isolation of the LH and FSH-Releasing Hormone from Porcine
Hypothalamic. J Biol Chem 246: 7230, 1971.
- 151.- MATSUO, H., BABA, Y., NAIR, R.M.G., ARIMURA, A. and SCHALLY,
A.V.: Structure of the Porcine LH and FSH-Releasing Hormone.
I: the Proposed Amino Acid Sequence. Biochem Biophys Res -
Commun 43: 1334, 1971.
- 152.- BABA, Y., MATSUO, H. and SCHALLY, A.V.: Structure of Porci-
ne LH and FSH Releasing Hormone. II. Confirmation of the -
Proposed Structure by Conventional Sequential Analysis. --
Biochem Biophys Res Commun 44: 459, 1971.
- 153.- MATSUO, H., ARIMURA, A., NAIR, R.M.G. and SCHALLY, A.V.: -
Synthesis of the Porcine LH and FSH Releasing Hormone by -
the Solid-Phase Method. Biochem Biophys Res Commun 45: 822,
1971.

- 154.- SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and ARIMURA, A.: The Hypothalamus and Reproduction. Am J Obstet Gynecol 114: 423, 1972.
- 155.- KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., GUAL, C., MIDGLEY, A.R. Jr., BOWERS, C.Y. and DIAZ-INFANTE, A., Jr.: Stimulation of LH Release in Men and Women by LH-Releasing Hormone Purified - by LH-Releasing Hormone Purified from Porcine Hypothalami. J Clin Endocrinol 29: 1046, 1969.
- 156.- KASTIN, A., SCHALLY, A.V., GUAL, C., MIDGLEY, R., BOWERS, C.Y. and GOMEZ PEREZ, F.: Administration of LH-Releasing - Hormone to Selected Subjects. Amer J Obst and Gynec 108: - 177, 1970.
- 157.- SCHALLY, A.V., BABA, V. and REDDING. T.W.: Studies on the Enzymatic and Chemical Inactivation of Hypothalamic Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Hormone. Neuroendocrinology 8: 70, 1971.
- 158.- NISWENDER, G.D., MIDGLEY, A.R., Jr., MONROE, J.E. and REICHERT, L.E.: Radioimmunoassay for Rat Luteinizing Hormone with Antiobine LH Serum and Ovine LH-I¹³¹. Proc Soc Exp - Biol Med 128: 807, 1968.
- 159.- DAANE, T.A., and PARLOW, A.F.: Periovulatory Patterns at - Rat Serum Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone During the Normal Estrous Cycle: Effects of Pentobarbital. Endocrinology 88: 653, 1971.
- 160.- SCHALLY, A.V., BABA, Y., MATSUO, H., ARIMURA, A. and REDDING, T.W.: Further Studies on the Enzymatic and Chemical Inactivation of Hypothalamic FSH-RH. Neuroendocrinology 8: 347, - 1971.
- 161.- BABA, Y., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Studies on the Properties of Hypothalamic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. J Biol Chem 246: 7581, 1971.

- 162.- MOTTA, M., PIVA, F., TIMA, L., ZANISI, M. and MARTINI, L.:
Intrahypothalamic Localization of the Nuclei Synthesizing
the Gonadotropin Releasing Factors. *J Neural Trans Suppl* -
X: 32, 1971.
- 163.- 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.: Gonadotropin Releasing Hormone: One Polypeptide Regula-
tes Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulatin Hormo-
nes. *J Obstetrics Gynecologi* 114: 423, 1972.
- 164.- ARIMURA, A., MARSUO, H., BABA, Y., DEBELJUK, L., SANDOW, J.
and SCHALLY, A.V.: Stimulation of Release of LH by Synthetic
LH-RH In Vivo: I. A Comparative Study of Natural and Synthe-
tic Hormones. *Endocrinology* 90: 163, 1972.
- 165.- MERRIFIELD, R.B.: New Approaches to the Chemical Sinthesis
of Peptides. *Recent Progr Horm Res* 23: 431, 1967.
- 166.- SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and ARIMURA, A.: The Hypothala-
mus and Reproduction. *Am J Obstet Gynecol* 114: 423, 1972.
- 167.- MONAHAN, M., RIVIER, J., BURGUS, R., AMOSS, M., BLACKWELL,
R., VALE, W. and GUILLEMIN, R.: Synthèse Totale par Phase
Solide d'un Décapeptide qui Stimule la Secretion des Gona-
dotropines Hypophysaires LH et FSH. *C R Acad Sci (Paris)* -
273: 508, 1971.
- 168.- SIEVERTSSON, H., CHANG, J.K., BOGENTOFT, C., CURRIE, B.L.,
FOLKERS, K. and BOWERS, C.Y.: Synthesis of Luteinizing Re-
leasing Hormone of the Hypothalamus and its Hormonal Acti-
vity. *Biochem Biophys Res Commun* 44: 1566, 1971.
- 169.- AMOSS, M., BURGUS, R., BLACKWELL, R., VALE, W., FELLOWS, R.
and GUILLEMIN, R.: Purification, Amino Acid Composition and
N-terminus of the Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing
Factor (LRF) of Ovine Origin. *Biochem Biophys Res Commun* -
44: 205, 1971.

- 170.- GENNSER, G., LIEDHOLM, P. and THORELL, J.: Pituitary Responses to Continuous Administration of LRH in Human Males with Oligozoospermia. *Horm Metab Res* 6: 79, 1974.
- 171.- KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., ZARATE, A., ARIMURA, A., GONZELEZ-BARCENA, D., MEDEIROSNETO, G.A. and SCHALCH, D.S.: Analysis of Clinical Studies with Natural and Synthetic - Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Man. *Israel J Med Sci* 10: 1305, 1974.
- 172.- SCHALLY, A.V., KASTIN, A.J. and ARIMURA, A.: Addendum the Hypothalamus and Reproduction. *Am J Obstet Gynecol* 122: - 857, 1975.
- 173.- ARIMURA, A., KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., SAITO, M., KUMASAKA, T., YAOL, Y., NISHI, N. and OHKURA, K.: Immunoreactive LH-Releasing Hormone in Plasma: Midcycle Elevation in Women. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 510, 1974.
- 174.- ARIMURA, A., SATO, H., KUMASAKA, T., WOROBEK, R.B., DEBELJUK, K., DUNN, J.D. and SCHALLY, A.V.: Production of Antiserum to LH-RH Associated with Marked Atrophy of the Gonads in Rabbits; Characterization of the Antibody and Development of a Radioimmunoassay for LH-RH. *Endocrinology* 93: - 1092, 1973.
- 175.- ARIMURA, A., DEBELJUK, L. and SCHALLY, A.V.: Blockade of - Preovulatory Surge of Gonadotropins LH and FSH and of Ovulation by Anti-LH-RH Serum in Rats. *Endocrinology* 95: 323, 1974.
- 176.- FRASER, H.M., JEFFCOATE, S.L., HOLLAND, D.T., GUNN, A.: - Detection of Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the - Peripheral Blood of the Rat on the Afternoon of Pro-Oestrus. *M Endocr* 59: 375, 1973.

- 177.- CRIGHTON, D.B., FOSTER, J.P., HOLLAND, D.T. and JEFFCOATE, S.L.: Simultaneous Determination of Luteinizing Hormone - Releasing Hormone in the Jugular Venous Blood of the Sheep at Oestrus. *J Endocr* 59: 373, 1973.
- 178.- PELLETIER, G., LABRIE, F., PUVIANI, R., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Immunohistochemical Localization of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Rat Median Eminence. *Endocrinology* 95: 314, 1974.
- 179.- SETALO, G., VIGH, S., SCHALLY, A.V., ARIMURA, A. and FLERKO, B.: LH-RH Containing Neural Elements in the Rat Hypothalamus. *Endocrinology* 96: 135, 1975.
- 180.- KIZER, J.S., ARIMURA, A., SCHALLY, A.V. and BROWNSTEIN, M. J.: Absence of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) from Catecholaminergic Neurons. *Endocrinology* 96: 523, 1975.
- 181.- WINTERS, A.J., ESKAY, R.L. and PORTER, J.C.: Concentration and Distribution of TRH and LRH in the Human Fetal Brain. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 960, 1974.
- 182.- REDDING, T.W., KASTIN, A.J., GONZALEZ-BARCENA, D., COY, D. H. COY, E.J., SCHALCH, D.S. and SCHALLY, A.V.: The Half-Life, Metabolism and Excretion of Tritiated Luteinizing Hormone (LH-RH). *J Clin Endocrinol Metab* 37: 626, 1973.
- 183.- CHANG, J.K., SIEVERTSSON, H., BOYENTOFT, C., CURRIE, B.L., FOLKERS, J. and BOWERS, C.Y.: Discovery of a New Synthetic Tetrapeptide Having Luteinizing Releasing Hormone (LRH) Activity. *Biochem Res Commun* 44: 409, 1971.
- 184.- FAWCETT, C.P., BEEZLEY, A.E., WHEATON, J.E.: Chromatographic Evidence for the Existence of Another Species of Luteinizing Hormone-Releasing Factor (LRF). *Endocrinology* 96: 311, 1975.

- 185.- SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.J., REDDING, T.W., CARTER, W.H., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., DE LA CRUZ, A., -- DUPONT, A., COY, D.H., COY, E.J. and NISHI, N.: On the Existence of Another FSH Releasing Hormone. *Obstet Gynecol Survey* 30: 122, 1975.
- 186.- KOCH, Y., CHOBSIENG, P., ZOR, U., FRIDKIN, M. and LINDNER, H.R.: Suppression of Gonadotropin Secretion and Prevention of Ovulation in the Rat by Antiserum to Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 55: 623, 1973.
- 187.- DE LA CRUZ, A., ARIMURA, A., DE LA CRUZ, K.G. and SCHALLY, A.V.: Effect of Administration of Anti-LH-RH Serum on Gonadal Function During the Estrus Cycle in the Hamster. *Endocrinology* in press.
- 188.- SCHALLY, A.V., REDDING, T.W. and ARIMURA, A.: Effect of Sex Steroids on Pituitary Responses to LH and FSH-Releasing Hormones In Vitro. *Endocrinology* 93: 893, 1973.
- 189.- SMITH, E.R. and DAVIDSON, J.M.: Location of Feedback Receptors: Effects of Intracranially Implanted Steroids on Plasma LH and FSH Response. *Endocrinology* 95: 1556, 1974.
- 190.- JONES, G.E. and BOYNS, A.R.: Effect of Sex Steroids on the Pituitary Responsiveness to Synthetic Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Male Dog. *J Endocrinology* 59: XV, 1973.
- 191.- GALLOWAY, D.B. COTTA, Y., PELLETIER, J. and TERQUI, M.: - Circulating Luteinizing Hormone and Testosterone Response in Rams After Luteinizing Hormone Releasing Hormone Treatment. *Acta Endocrinologica* 77: 1, 1974.

- 192.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., ARIMURA, A., DEBELJUK, L. and -
SCHALLY, A.V.: Biphasic Effect of Estradiol Benzoate on
the Pituitary Responsiveness to LH-RH. *Endocrinology* 94:
1300, 1974.
- 193.- AIYER, M.S. and FINK, G.: The Role of the Sex Steroid Hor-
mones in Modulating the Responsiveness of the Anterior Pi-
tuitary Gland to Luteinizing Hormone Releasing Factor in
the Female Rat. *J Endocrinol* 62: 553, 1974.
- 194.- AIYER, M.S., FINK, G. and GREIG, F.: Changes in the Sensi-
tivity of the Pituitary Gland to Luteinizing Hormone Relea-
sing Factor During the Oestrous Cycle of the Rat. *J Endo-
crinol* 60: 47, 1974.
- 195.- TANG, L.K.L. and SPIES, H.G.: Effects of Gonadal Steroids
on the Basal and LRF Induced Gonadotropin Secretion by -
Cultures of Rat Pituitary. *Endocrinology* 96: 349, 1975.
- 196.- BROWN-GRANT, K., EXLEY, D. and NAFTOLIN, F.: Peripheral -
Plasma Oestradiol and Luteinizing Hormone Concentrations
During the Oestrous Cycle of the Rat. *J Endocrinol* 48: -
295, 1970.
- 197.- TAYMOR, M.L., THOMPSON, I.E., BERGER, M.J. and PATTON, W.:
Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH \rightarrow RH) as a Diagnos-
tic and Research Tool in Gynecologic Endocrinology. *Am J
Obstet Gynecol* 120: 721, 1974.
- 198.- HOTCHKISS, J., ATKINSON, L.E. and KNOBIL, E.: Time Course
of Serum Estrogen and Luteinizing Hormone (LH) Concentra-
tions During the Menstrual Cycle of the Rhesus Monkey. *En-
docrinology* 89: 177, 1971.

- 199.- FRANCHIMONT, P., BECKER, H., ERNOULD, C., THYS, C., DEMOULIN, A., BOURGUIGNON, J.P., LEGROS, J.J. and VALCKE, J.C.: The Effect of Hypothalamic Luteinizing-Hormone-Releasing - Hormone (LH-RH) on Plasma Gonadotrophin Levels in Normal - Subjects. Clin Endocrinol 3: 27, 1974.
- 200.- GOEBELSMANN, V., MIDGLEY, A.R. Jr. and JAFFER, R.B.: Regulation of Human Gonadotrophins: VII Daily Individual Urinary Estrogens, Pregnanediol and Serum Luteinizing and Follicle Stimulating Hormones During the Menstrual Cycle. Clin Endocrinol 29: 1222, 1969.
- 201.- NILLIUS, S.J. and WIDE, L.: Variation in LH and FSH Response to LH-Releasing Hormone During the Menstrual Cycle. J Obstet Gynaecol Brit Comm 79: 865, 1972.
- 202.- BURGER, H.G., CATT, K. and BROWN, J.R.: Relationship Between Plasma Luteinizing Hormone and Urinary Estrogen Excretion During the Menstrual Cycle. J Clin Endocrinol Metab 28: 1508, 1968.
- 203.- SHAW, R.W., BUTT, W.R., LONDON, D.R. and MARSHALL, J.C.: Variation in Response to Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) at Different Phases of the Same Menstrual Cycle in Normal Women. J Obstet Gynaecol Brit Comm 81: 632, 1974.
- 204.- YEN, S.S.C., VANDENBERG, G. and SILER, T.M.: Modulation of Pituitary Responsiveness to LRF by Estrogen. J Clin Endocrinol Metab 39: 170, 1974.
- 205.- THOMPSON, I.E., ARFANIA, J. and TAYMOR, M.L.: Effects of Estrogen and Progesterone on Pituitary Response to Stimulation by Luteinizing Hormone-Releasing Factor. J Clin Endocrinol - Metab 37: 152, 1973.
- 206.- KEYE, W.R.Jr. and JAFFE, R.B.: Modulation of Pituitary Gonadotrophin Response to Gonadotrophin-Releasing Hormone by Estradiol. J Clin Endocrinol Metab 38: 805, 1974.

- 207.- SILER, T.M. and YEN, S.S.C.: Augmented Gonadotropin Response to Synthetic LRF in Hypogonadal State. J Clin Endocrinol Metab 37: 491, 1973.
- 208.- SEYLER, L.E.Jr. and REICHLIN. S.: Feedback Regulation of Circulating LRF Concentrations in Men. J Clin Endocrinol Metab 39: 906, 1974.
- 209.- SHERINS, R.J. and LORIAUX, D.L.: Studies on the Role of Sex Steroids in the Feedback Control of FSH Concentrations in Men. J Clin Endocrinol Metab 36: 886, 1973.
- 210.- PEREZ-INFANTE, V., LOPEZ-MACIA, A., JARAMILLO, C., PUENTE, M. BORDIU, E. y CHARRO SALGADO, A.: Efecto de los Esteroides Periféricos y del ACTH Sobre la Respuesta de LH y FSH al LH-RH en Humanos Normales. Endocrinología 24: 11, 1977.
- 211.- LEE, P.A., JAFFE, R.B., MIDGLEY, A.R.Jr., KOHEN, F. and NISWENDER, G.D.: Regulation of Human Gonadotropins. VIII. Suppression of Serum LH and FSH in Adult Males Following Exogenous Testosterone Administration. J Clin Endocrinol Metab 35: 636, 1972.
- 212.- ISURUGI, K., WAKABAYASHI, K., FUKUTANI, K., TAKAYASU, H., TAMAOKI, B.I. and OKADA, M.: Responses of Serum Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Levels to Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Various Forms of Testicular Disorders. J Clin Endocrinol Metab 37: 533, 1973.
- 213.- SAKAKURA, J., ENZMANN, F., SCHIMPEL, H., ARIMURA, A., REDDING, T.W. and SCHALLY, A.V.: Purification and Characterisation of Two Porcine Hypothalamic Fractions with LH-Releasing Activity: Evidence for a Single LH and FSH-Releasing Hormone. Acta Endocrinologica 80: 209, 1975.

- 214.- BOCCUZZI, G., ANGELI, A., BISBOCCI, D., FONZO, D. and GAI-DANO, G.P.: Effects of Synthetic Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) on the Release of Gonadotropins in Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 892, 1975.
- 215.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., PONDE, R.C. and SCHALLY, A.V.: Differential Effect of Various Doses of Mestranol on the Release of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Fertil Steril* 25: 439, 1974.
- 216.- HASHIMOTO, T., MIYAI, K., IZUMI, K. and KUMAHARA, Y.: Isolated Gonadotropin Deficiency with Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *N Engl J Med* 287: 1059, 1972.
- 217.- MARTIN, J.E., TYREY, L., EVERETT, J.W. and FELLOWS, R.E.: Variation in Responsiveness to Synthetic LH Releasing Factor (LRF) in Proestrous and Diestrous Rats. *Endocrinology* 94: 556, 1974.
- 218.-GORDON, J.H. and REICHELIN, S.: Changes in Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Factor During the Rat Estrous Cycle. *Endocrinology* 94: 974, 1974.
- 219.- KANEMATSU, S., SCARAMUZZI, R.J., HILLIAR, J. and SAWYER, C.H.: Patterns of Ovulation Inducing LH Release Following Coitus, Electrical Stimulation and Exogenous LH-RH in the Rabbit. *Endocrinology* 95: 247, 1974.
- 220.- BEN-JONATHAN, N., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.: Transport of LRF from CSF to Hypophysial Portal and Systemic Blood and the Release of LH. *Endocrinology* 95: 18, 1974.
- 221.- ONDO, J.G., ESKAY, R.L., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.: -- Effect of Synthetic LRF Infused Into a Hypophysial Portal Vessel on Gonadotropin Release. *Endocrinology* 93: 205, - 1973.

- 222.- GREELEY, G.H.Jr., ALLEN, M.B. and MAHESH, V.B.: FSH and LH Response in the Rat After Intravenous, Intracarotid or Subcutaneous Administration of LH-RH. Proc Soc Exp Biol - Med 147: 859, 1974.
- 223.- AIYER, M.S., FINK, G. and GREG, F.: Changes in the Sensitivity of the Pituitary Gland to Luteinizing Hormone Releasing Factor During the Oestrous Cycle of the Rat. J Endocr 60: 47, 1974.
- 224.- WHITE, W.F., HEDLUND, M.T., RIPPEL, R.H., ARNOLD, W. and FLOURET, G.R.: Chemical and Biological Properties of Gonadotropin-Releasing Hormone Synthetized Hormones. Endocrinology 94: 1422, 1974.
- 225.- FERIN, M., WARREN, M., DYRENFURTH, I., VANDE WIELE, R.L. and WHITE, W.F.: Response of Rhesus Monkeys to LRH Throughout the Ovarian Cycle. J Clin Endocrinol Metab 38: 231, 1974.
- 226.- SPIES, H.G. and NISWENDER, G.D.: Levels of Serum LH in -- Rhesus Monkeys After Intrapituitary Infusion of Synthetic LH-RH or Median Eminence Extract. Endocrinology 93: 814, 1973.
- 227.- BOTELLA LLUSIA, J.: Comunicación Personal.
- 228.- CHAKRABORTY, P.K., REEVES, J.J., ARIMURA, A. and SHCALLY, A.V.: Serum LH Levels in Prepubertal Female Pigs Chronically Treated with Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone/Follicle Stimulating Hormone (LH-RH/FSH-RH). Endocrinology 92: 55, 1973.
- 229.- SYMONS, A.M. CUNNINGHAM, N.F. and SABA, N.: The Gonadotrophic Hormone Response of Anoestrous and Cyclic Ewes to - Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. J Reprod Fert 39: 11, 1974.

- 230.- SEGERSON, E.C.Jr., ULBERG, L.C., MARTINI, J.E. and --
FELLOWS, R.E.: Fertility in Ewes treated with Luteinizing
Hormone-Releasing Factor. Proc Soc Exp Biol Med 146: 518,
1974.
- 231.-POMERANTZ, D.K., ELLENDORFF, F., ELSAESSER, F., KONIG, A.
and SMIDT, D.: Plasma LH Changes in Intact Adult, Castrated
Adult and Pubertal Male Pigs Following Various Doses of -
Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH).
Endocrinology 94: 330, 1974.
- 232.- MONGKONPUNYA, K., HAFS, H.D., CONVEY, E.M., OXENDER, W.D.
and LOUIS, T.M.: Luteinizing Hormone Release by Gonadotro-
pin Releasing Hormone Before and After Castration in Bulls.
Proc Soc Exp Biol Med 147: 873, 1974.
- 233.- CUNNINGHAM, F.J., BONNEY, R.C., FURR, B.J.A. and ONUORA, -
G.I.: The Effect of Synthetic Luteinizing Hormone Releasing
Factor on Plasma Levels of Luteinizing Hormone in the Do-
mestic Fowl. Proc Soc Endocrinol (England) 59: XIV, 1973.
- 234.- FURR, B.J.A., ONUORA, G.I., BONNEY, R.C. and CUNNINGHAM, -
F.J.: The Effect of Synthetic Hypothalamic Releasing Fac-
tors on Plasma Levels of Luteinizing Hormone in the Cocke-
rel. J. Endocr 59: 495, 1973.
- 235.- VAITUKAITIS, J., BECKER, R., HANSEN, J. MECKLENBURG, R.:
Altered LRF Responsiveness in Amenorrheic Women. J Clin -
Endocrinol Metab 39: 1005.
- 236.- GINSBURG, J., ISAACS, A.J., GORE, M.B.R. and HAVARD, C.W.H.:
Serum LH Levels in Bulls Treated with Synthetic Luteinizing
Hormone-Releasing Hormone Follicle Stimulating Hormone-Re-
leasing Hormone LH-RH/FSH-RH. J Anim Sci 37: 123, 1973.

- 237.- YEN, S.S.C., REBAR, R., VANDENBERG, G. and JUDD, H.: Hypothalamic Amenorrhea and Hypogonadotropinism: Responses to Synthetic LRF. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 811, 1973.
- 238.- VANDERKERCKHOVE, D., DHONT, M. and VAN EYCK, J.: Diagnostic Value of the LH-Releasing Hormone Stimulation Test in Functional Amenorrhea. *Acta Endocrinol* 78: 625, 1975.
- 239.- NILLIUS, S.J. and WIDE, L.: The LH-Releasing Hormone Test in 31 Women with Secondary Amenorrhea. *J Obstet Gynaecol Brit Comm* 79: 874, 1972.
- 240.- SCHNEIDER, H.P.G. and DAHLEN, H.G.: Studies with Synthetic LH-Releasing Hormone in the Human II: Evaluation on Anterior Pituitary Gonadotropic Function in Various Endocrine States. *Neuroendocrinology* 11: 328, 1973.
- 241.- WARREN, M.P., JEWELWICZ, R., DYRENFURTH, I., ANS, R., -- KHALAF, S. and VANDE WIELE, R.L.: The Significance of Weight Loss in the Evaluation of Pituitary Response to LH-RH in Women with Secondary Amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 601, 1975.
- 242.- AONO, T., MINAGAWA, J., KINUGASA, T., TANIZAWA, O. and KURACHI, K.: Response of Pituitary LH and FSH to Synthetic LH-Releasing Hormone in Normal Subjects and Patients with Sheehan's Syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 117: 1046, 1973.
- 243.- PATTON, W.C., THOMPSON, I.E., BERGER, M.J., CHONG, A.P. and TAYMOR, M.L.: Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Obstet and Gynecol* 44: 823-829, 1974.
- 244.- DONALD, R.A. and ESPINER, E.A.: The Plasma Gonadotropin - Response to Gonadotropin-Releasing Hormone in Patients with Primary Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 364, - 1974.

- 245.- KELLER, E., DAHLEN, H.G., FRIEDRIGH, E., BOHNET, H.G., RIDITER, R., JOEL, E.W., SCHOBING, G., KLEMT, W., STAENMLER, H., WYSS, H.J., SCHIUDLER, A.E. and SCHUEIDER, P.G.: Human Pituitary Gonadotropin Index I. Standardized LRH Test Criteria for Evaluation of Functional Amenorrhea. J. Clin Endocr and Metab 40: 959-969, 1975.
- 246.- MORTIMER, C.H., BESSER, G.M., Mc NEILLY, A.S., MARSHALL, J.C., HARSOULIS, P., TUNBRIDGE, W.M.G., GOMEZ-PAN, A. and HALL, R.: Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating - Hormone Releasing Hormone Test in Patients with Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Dysfunction. Br Med J 4: 73, 1973.
- 247.- ZARATE, A., JACOBS, L.S., CANALES, E.S., SCHALLY, A.V., DE LA CRUZ, A., SORIA, J. and DUAGHADAY, W.H.: Functional Evaluation of Pituitary Reserve in Patients with the Amenorrhea-Galactorrhea Syndrome Utilizing Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH), L-Dopa, and Chlorpromazine. J Clin Endocrinol Metab 37: 855, 1973.
- 248.- KATZ, M. and CARR, P.J.: Plasma Oestradiol Response to Synthetic LH-RH in Patients with Secondary Amenorrhea. J Obstet and Gynec Brit Comm 81: 791, 1974.
- 249.- RANNEVIK, G. and THORELL, J.: Effects of Synthetic LH-/FSH-Releasing Hormone (LRH) on Plasma LH and FSH in Amenorrhoeid Women. Acta Endocrinol 75: 647, 1974.
- 250.- JEPSSON, S., KULLANDER, S. and RANNEVIK, G.: Intranasal Administration of Synthetic Gonadotrophin-Releasing Hormone. Br Med J 4: 231, 1973.
- 251.- BOTELLA LLUSIA, J., CHARRO SALGADO, A., GUADALIX, F.J. and FERNANDEZ-DURANGO, R.: Sequential Stimulation with Clomiphene and LH-RH as a Diagnostic Aid in Amenorrhea and Sterility. In: Basic Applications and Clinical Uses of --

- Hypothalamic Hormones (Eds). Charro Salgado, A.L., Fernández-Durango, R. and López del Campo, J.G., pág. 253-260, - Excerpta Médica, Amsterdam-Osford, 1976.
- 252.- FERNANDEZ-DURANGO, R., CHARRO SALGADO, A., GUADALIX, F.J., GARRIDO-TERUEL, R. y BOTELLA LLUSIA, J.: La reserva Gonadotrópica Hipofisaria en Mujeres Esterelís por Ciclo Anovulador. Acta Ginecol (Madrid) 27: 255, 1975.
- 253.- CHARRO SALGADO, A.L., LOPEZ MACIA, A., FERNANDEZ-DURANGO, R., PUENTE CUEVAS, M., PEREZ-INFANTE, V. and FERNANDEZ-CRUZ, A.: LH and FSH Response to LH-RH in Exogenous and Endogenous Hyper-adrenocortisism. In: Basic Applications and Clinical Uses of Hypothalamic Hormones (Eds). A. L. Charro - Salgado, R. Fernández-Durango and J.G. López del Campo. - pág. 270-280, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 1976.
- 254.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., BERMUDEZ, J.A., LEE, D., ARIMURA, A., RUELAS, J., ZEPEDA, I. - and SCHALLY, A.V.: Synthetic LH-Releasing Hormone (LH-RH) Administered to Normal Men by Different Routes. J Clin Endocrinol Metab 37: 481, 1973.
- 255.- BREMMER, W.J. and PAULSEN, C.A.: Two Pools of Luteinizing Hormone in the Human Pituitary: Evidence from Constant Administration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. J Clin Endocrinol Metab 39: 811, 1974.
- 256.- MOSS, R. and Mc CANN, S.M.: Induction of Mating Behavior in Rats by Luteinizing Hormone-Releasing Factor. Science 181: 177, 1973.
- 257.- SANDOW, J., ENZMANN, F., SCHIMPEL, H., ARIMURA, A., REDDING, T.W. and SCHALLY, A.V.: Purification and Characterisation of Two Porcine Hypothalamic Fractions with LH-Releasing -

- Activity: Evidence for a Single LH and FSH-Releasing Hormone. *Acta Endocrinologica* 80: 209, 1975.
- 258.- DEBELJUK, L., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A. ARIMURA, A. and -- SCHALLY, A.V.: Effect of Gonadal Steroids on the Response to LH-RH in Intact and Castrated Male Rats. *Endocrinology* 94: 1519, 1974.
- 259.- COOPER, K.J., FAWCETT, C.P. and Mc CANN, S.M.: Variations in Pituitary Responsiveness to a Luteinizing Hormone/Follicle Stimulating Hormone Releasing Factor (LH-RF/FSH-RF) - Preparation During the Rat Estrois Cycle. *Endocrinology* - 95: 1293, 1974.
- 260.- MARTIN, J.E., TYREY, L., EVERETT, J.W. and FELLOWS, R.E.: Estrogen and Progesterone Modulation of the Pituitary Response to LRF in the Cycle Rat. *Endocrinology* 95: 1664, -- 1974.
- 261.- LEGAN, S.J. and KARSCH, F.J.: Modulation of Pituitary Responsiveness to Luteinizing Hormone-Releasing Factor During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology* 96: 571, 1975.
- 262.- FRASER, H.M., JEFFCOATE, S.L., GUNN, A. and HOLLAND, D.T.: Effect of Active Immunization to Luteinizing Hormone Releasing Hormone on Gonadotrophin Levels in Ovariectomized -- Rats. *J Endocr* 64: 191, 1975.
- 263.- JONAS, H.A., BURGER, H.G., CUMMING, I.A., FINDLAY, J.K. - and DE KRETZER, D.M.: Radioimmuno Assay for Luteinizing - Hormone-Releasing Hormone (LH-RH): Its Application to the Measurement of LH-RH in Ovine and Human Plasma. *Endocrinology* 96: 384, 1975.
- 264.- NETT, T.M. AKBAR, A.M. and NISWENDER, G.D.: Serum Levels of Luteinizing Hormone and Gonadotropin-Releasing Hormone in Cycling, Castrated and Anestrous Ewes. *Endocrinology* 94: 713, 1974.

- 265.- ARIMURA, A., SATO, H., COY, D.H., WOROBEK, R.B., SCHALLY, A.V., YANAIHARA, N., HASHIMOTO, T., YANAIHARA, C. and - and SUKURA, N.: The antigenic Determinant of the LH-Releasing Hormone for Three Different Antisera. *Acta Endocrinol* 78: 22, 1975.
- 266.- ZIMMERMAN, E.A., HSU, K.C., FERIN, M. and KOZLOWSKI, G.P.: Localization of Gonatotropin-Releasing Hormone (Gn-RH) in the Hypothalamus of the Mouse by Immunoperoxidase -- Technique. *Endocrinology* 95: 1, 1974.
- 267.- MORTIMER, C.H., BESSER, G.M., HOOK, J. and Mc NEILLY, A.-S.: Intravenous Intramuscular, Subcutaneous and Intranasal Administration of LH/FSH-RH: the Duration of Effect and Occurrence of Asynchronous Pulsatile Release of LH and FSH. *Clin Endocrinol* 3: 19, 1974.
- 268.- LONDON, D.R., BUTT, W.R., LYNCH, S.S., MARSHALL, J.C., - OWUSU, S., ROBINSON, W.R. and STEPHENSON, J.M.: Hormonal Responses to Intranasal Luteinizing Hormone Releasing Hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 829, 1973.
- 269.- SOLBACH, H.G. and WIEGELMANN, W.: Intranasal Application of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Lancet* 1: 1259, 1973.
- 270.- BOURGUIGNON, J.P., BURGER, H.G. and FRANCHIMONT, P.: Radioimmunoassay of Serum Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) After Intra-Nasal Administration and Evaluation of the Pituitary Gonadotrophic Response. *Clin Endocrinol* 3: 437, 1974.
- 271.- SCHWARZSTEIN, L., DE LABORDE, N.P., APARICIO, N.J., TURNER, D., MIRKIN, A., RODRIGUEZ, A., RODRIGUEZ-LHULLIER, F., -- and ROSNER, J.M.: Daily variations of FSH, LH and Testosterone Response to Intravenous Luteinizing Hormone-Releasing

- Factor (LRF) in Normal Men. J Clin Endocrinol Metab 40: 313, 1975.
- 272.- JUDD, H.L., REBAR, R., VANDENBERG, G. and YEN, S.S.C.: Effect of Lutenizing Hormone-Releasing Factor on Leydig Cell Function. J Clin Endocrinol Metab 38: 8, 1974.
- 273.- BELL, J., SPITZ, I., SLONIM, A., PERLAMN, A., SEGAL, S., PALT, Z. and RABINOWITZ, D.: Heterogeneity of Gonadotropin Response to LH-RH in Hypogonadotropic Hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 36: 791, 1973.
- 274.- MARSHALL, J.C., HARSOULIS, P., ANDERSON, D.C., Mc NEILLY, A.S., BESSER, G.M. and HALL, R.: Isolated Pituitary Gonadotrophin Deficiency: Gonadotrophin Secretion After Synthetic Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone Releasing Hormone. Br. Med J 4: 643, 1972.
- 275.- SCHONAU JORGENSEN, F., KAMPMANN, J., MICIC, S., ROOS, J. and JOHNSE, S.G.: LH and FSH in Serum After Intramuscular Administration of LH/FSH Releasing Hormone in Normal and Hypogonadal Men. Acta Endocrinol 78: 1, 1975.
- 276.- HASHIMOTO, T., MIYAI, K., IZUMI, K., and KUMAHARA, Y.: - Isolated Gonadotropin Deficiency with Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. N Engl J Med 287: 1059, 1972.
- 277.- FRANCHIMONT, P., VALCKE, J.C., SCHELLENS, A.M.C., DEMOULIN, A. and LEGROS, J.J.: Action du LH-RH Sur Les Taux de Gonadotrophines Dans Differentes Affections Endocriniennes. Ann d'Endocrinol 34: 491-501, 1973.
- 278.- KLEY, H.K., WIEGELMANN, W., NIESCHLAG, E., SOLBACH, H.G., ZIMMERMANN, H. and KRUSKEMPER, H.L.: LH FSH and Testosterone in Plasma Following LH-RH Infusion: a Combined Test

- for Pituitary and Leydig Cell Function. *Acta Endocrinol.* 75: 41, 1974.
- 279.- MECKLENBURG, R.S. and SHERINS, R.J.: Gonadotropin Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Men with Germinal Aplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 1005, 1974.
- 280.- SCHALCH, D.A., GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., LANDA, L., LEE, L.A., ZAMORA, M.T. and SCHALLY, A.V.: Levels of Plasma Gonadotropins After Administration of LH-RH in Patients with Renal or Hepatic Failure. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 291, 1975.
- 281.- ROTH, J.C., KELCH, R.P., KAPLAN, S. L. and GRUMBACH, M. M.: FSH and LH Response to Luteinizing Hormone-Releasing Factor in Prepubertal and Pubertal Children, Adult Males, and Patients with Hypogonadotropic and Hypergonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 926, 1972.
- 282.- ROTH, J.C., GRUMBACH, M.M. and KAPLAN, S.L.: Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Factor on Serum Testosterone and Gonadotropins in Prepubertal, Pubertal and Adult Males. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 680, 1973.
- 283.- JOB, J.C., GARNIER, P.E., CHAUSSAIN, J.L. and MILHAUD, G. Elevation of Serum Gonadotropins (LH and FSH) After Releasing Hormone (LH-RH) Injection in Normal Children and in Patients with Disorders of Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 473, 1972.
- 284.- CHAUSSAIN, J.L., GARNIER, P.E., BINET, E., VASSAL, J., - SCHOLLER, R. and JOB, J.C.: Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) on the Release of Gonadotropins in Hypophysio-Gonadal Disorders of Children and Adolescents. III. Hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 58, 1974.

- 285.- JOB, J.C., GARNIER, P.E., CHAUSSAIN, J.L., SCHOLLER, R., TOUBLANC, J.E. and CANLORBE, P.: Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) on the Release of Gonadotropins in Hypophysogonadal Disorders of Children and Adolescents. V. Agonadism. J Clin Endocrinol Metab 38: 1109, 1974.
- 286.- KALRA, S.P., KALRA, P.S. and MITCHELL, E.O.: Differential Response of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Basal Hypothalamus and Preoptic Area Following Anterior - Hypothalamic Differentiation and/or Castration in Male -- Rats. Endocrinology 100: 20, 1977.
- 287.- WILBER, J.F., MONTOYA, E., PLUTNIKOFF, N.P., WHITE, W.F., GENDRICH, R., RENAUD, L. and MARTIN, J.B.: Gonadotrophin-Releasing Hormone and Thyrotropin-Releasing Hormone: Distribution and Effects in the Central Nervous System. In: Recent Progress in Hormone Research. (Ed). R.O. Greep. Academic Press Vol 32, pág. 117-159, 1976.
- 288.- KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., SCHALCH, D.S., KORENMAN, S.G., MILLER, M.C. III, GUAL, C. and PREZ-PASTEN, E.: Characterization of the Hormonal Responses to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Prepubertal and Adult Subjects. Pediat Res 6: 481, 1972.
- 289.- BERMUDEZ, J.A., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., LEE-BENITEZ, D. and PEREZ-PASTEN, E.: Hormonal Response to Synthetic - LH-Releasing Hormone (LH-RH) in Prepubertal, Pubertal, and Adult Human Males. Endocr Res Commun 1: 477, 1974.
- 290.- RUBIN, A.L., LEVIN, S.R., BERNSTEIN, R., TYRRELL, J.B., - NOACCO, C. and FORSHAM, P.H.: Stimulation of Growth Hormone by Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Active - Acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 37: 160, 1973.

- 291.- MORTIMER, C.H., Mc NEILLY, A.S., FISHER, S.A., MURRAY, M.A.F. and BESSER, G.M.: Gonadotrophin-Releasing Hormone Therapy in Hypogonadal Males with Hypothalamic or -- Pituitary Dysfunction. Br Med J 4: 617, 1974.
- 292.- MEDEIROS-NETO, G.A., TOLEDO, S.P.A., PUPO, A.A., SUCUPIRA, M.S., FRAIGEFILHO, F., MATTAR, E., KASTIN, A.J. and SCHALLY, A.V.: Characterization of the LH Response to - Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Isolated and Multiple Tropic Hormone Deficiencies. J. Clin - Endocrinol Metab 37: 972, 1973.
- 293.- RANNEVIK, G., JEPPSSON, S., KULLANDER, S. and THORELL, J.: Effect of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing - Hormone on Plasma Luteinizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone in Amenorrheic Women. Fertil Steril 25: - 547, 1974.
- 294.- TAYMOR, M.L., THOMPSON, I.E., BERGER, M.J. and PATTON, - W.: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) as a Diagnostic and Research Tool in Gynecologic Endocrinology. Am J Obstet Gynecol 120: 721, 1974.
- 295.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., MILLER, M.C., LEE, L., RIVAS-LLAMAS, R. and SCHALLY, A.V.: Differential Effect of Various Doses of Mestranol on the Release of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone.: Fertil Steril 25: 439, 1974.
- 296.- ZARATE, A., CANALES, E.S., SORIA, J., GONZALEZ, A., SCHALLY, A.V. and KASTIN, A.J.: Further Observations on the - Therapy of Anovulatory Infertility with Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. Fertil Steril 25: 3, 1974.

- 297.- NAKANO, R., KATAYAMA, K., MITZUNO, T. and TOJO, S.: Induction of Ovulation with Synthetic LH-RH. Fertil and Steril 25: pág. 271-477. 1974.
- 298.- FIGUEROA CASAS, P., BADANO, A.R., APARICIO, N., LENCIONI, L.J., BERLI, R.R., BADANO, H., BICOCCA, C. and SCHALLY, A.V.: Luteinizing Hormone in the Treatment of Anovulatory Infertility. Fertil and Steril 26, 549, 1975.
- 299.- SCHWARZSTEIN, L., APARICIO, N.J., TURNER, D., CALAMERA, J. C., MANCINI, R. and SCHALLY, A.V.: Use of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Treatment of Oligospermic Men: a Preliminary Report. Fertil Steril 26: 331, 1975.
- 300.- DE LA CRUZ, A., DE LA CRUZ, K.G., ARIMURA, A., COY, D.H., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, E.J. and SCHALLY, A.V.: Gonadotropin-Releasing Activity of Two Highly Active and Long-Acting Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone - After Subcutaneous, Intravaginal, and Oral Administration. Fertil Steril 26: 894, 1975.
- 301.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, D.H., COY, E.J., SCHALLY, A. V. and ARIMURA, A.: Anti-Luteinizing Hormone (LH)-Releasing Activity of Several Analogues of LH-Releasing Hormone. Fertil Steril 26: 554, 1975.
- 302.- FERNLAND, L., LABRIE, F., COY, D.H., COY, E.J. and SCHALLY, A.V.: Inhibitory Activity of Four Analogs of Luteinizing Hormone In Vivo. Fertil and Steril 26: 889-893, 1975.
- 303.- HASHIMOTO, T., MIYAI, K., UOZUMI, T., MORI, S., WATANABE, M. and KUMAHARA, Y.: Effect of Prolonged LH-Releasing Hormone Administration on Gonadotropin Response in Patients with Hypothalamic and Pituitary Tumors. J Clin Endocrinol Metab 41: 712, 1975.

- 304.- ZAÑARTU, J., DABANCENS, A., KASTIN, A.J. and SCHALLY, A. V.: Effect of Synthetic Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone (FSH/LH-RH) in Anovulatory Sterility. *Fertil Steril* 25: 160, 1974.
- 305.- NISHI, N., ARIMURA, A., COY, D.H., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A. and SCHALLY, A.V.: The Effect of Oral and Vaginal Administration of Synthetic LH-RH and (D-Ala⁶ des Gly¹⁰, NH₂)²-LH-RH Ethylamide on Serum LH Levels in Ovariectomized, Steroid-Blocked Rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 1009, 1975.
- 306.- RIPPEL, R.H., JOHNSON, E.S., WHITE, W.F., FUJINO, M., FUKUDA, M. and KOBAYASHI, S.: Ovulation and Gonadotropin Releasing Activity of (D-Leu⁶, des Gly NH₂¹⁰, pro-Ethylamide⁹) -GNRH. *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 1193, 1975.
- 307.- ARIMURA, A., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A. and SCHALLY, A.V.: In Vivo Comparison of LH-RH and FSH-RH Activities of (Des-Gly¹⁰) (Pro⁹-Ethylamide) -LH-RH, (Des-Gly¹⁰) (Pro⁹-Propylamide) - LH-RH, and LH-RH Using Immature Male Rats. *Proc Soc Eurp Biol Med* 146: 17, 1974.
- 308.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Influence of Estradiol Benzoate on Pituitary Responsiveness to LH-RH at Different Stages of the Estrous Cycle in Rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 146: 859, 1974.
- 309.- ROOT, A.W. and DUCKETT, G.E.: In Vivo and In Vitro Effects of Synthetic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) Upon the Secretion of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) in Intact and Castrated, Fed and Starved Adult Male Rats. *Proc Soc Eup Biol Med* 144: 30, 1973.

- 310.- JOB, J.C., GARNIER, P.E., CHAUSSAIN, J.L., SOCHOLLER, R., TOUBLANC, J.E. and CANLORBE, P.: Effect of Synthetic LH-RH on the Release of Gonadotropins in Hypophysealgonadal Disorders of Children and Adolescents. V. Agonadism. *J Clin Endocr* 38: 1009-114, 1974.
- 311.- COOPER, K.J., FAWCETT, C.P. and Mc CANN, S.M.: Inhibitory and Facilitory Effects of Estradiol 17 β on Pituitary Responsiveness to a Luteinizing Hormone-Follicle Stimulating Hormone Releasing Factor (LH-RF/FSH-RF) Preparation in the Ovariectomized Rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 145: -- 1422, 1974.
- 312.- AMOSS, M.S.Jr., MONAHAN, M.W. and VERLANDER, M.S.: A Long-acting Polymer-Coupled LRF Analog. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 187, 1974.
- 313.- ARIMURA, A., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, D.H., COY, E.J., HIROTSU, Y. and SCHALLY, A.V.: (D-Ala⁶, des Gly-NH₂¹⁰)-LH-RH-Ethylamide: A New Analogue with Unusually High LH-RH/FSH-RH Activity. *Endocrinology* 95: 1174, 1974.
- 314.- ARIMURA, A., DEBELJUK, L. and SCHALLY, A.V.: Stimulation of FSH Release In Vitro by Prolonged Infusion of Synthetic LH-RH. *Endocrinology*, 91: 529, 1972.
- 315.- BAIER, H., BIRO, G. and WEINGES, K.F.: Serum Levels of - FSH, LH and Testosterone in Human Males. *Horm Metab Res* - 6: 514, 1974.
- 316.- BEATTIE, C.W., CORBIN, A., FOELL, T.J., GARSKY, V., Mc KINLEY, W.A., REES, R.W.A., SARANTAKIS, D. and YARDLEY, J. P.: Luteinizing-Hormone Releasing Hormone. Antiovolatory Activity of Analogs Substituted in Positions 2 and 6. *J Med Chem* 18: 1247, 1975.

- 317.- BEATTIE, C.W., CORBIN, A., FOELL, T.J., GARSKY, V., REES, R.W.A., REES, R.W.A., SARANTAKIS, D. and YAROLLEY, J.: -- Anti-Ovulatory/Anti--Pre nancy Effects of (D-Phe²-)-LRH - Analogs Administered Early in the Rat Estrous Cycle. Contraception 13: 341, 1976.
- 318.- JEQUIER, A.M., VANTHUYNE, C. and JACOBS, H.S.: Gonadotrophin Secretion in Lactating Women: Response to Luteinizing Hormone Releasing Hormone/Follicle-Stimulating Hormone Releasing Hormone in the Puerperium. Proc Soc Endocrinol -- (England) 59: XIV, 1973.
- 319.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, D.H., COY, E.J., DE LA CRUZ, A., NISHI, N. and SCHALLY, A.V.: Prolonged Inhibition of - Gonadotropin Release and Supression of Ovulation by Synthetic Antagonists of LH-RH. Abstract Program of the 57th -- Meeting of The Endocrine Society, pág. 354, 1975.
- 320.- BEUMONT, P.J.V., GEORGE, G.C.W., PIMSTONE, B.L. and VINIK, A.I.: Body Weight and the Pituitary Response to Hypothalamic Releasing Hormone in Patients with Anorexia Nervosa. J Clin Endocrinol Metab 43: 487, 1976.
- 321.- BOWERS, C.Y., CHANG, J.K. and FOLKERS, K.: Studies on the LH and FSH Releasing Activity of the Hypothalamic Hormone, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (Decapeptide) its Analogs and Other Small Peptides. in: Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones (Physiological and Clinical Studies). pág. 68-88. Excerpta Medica, 1972.
- 322.- GROWNSTEIN, M., ARIMURA, A., SATO, H., SCHALLY, A.V. and KIZER, J.S.: The Regional Distribution of Somatostatin in the Rat Bosis. Endocrinology 96: 1456, 1975.

- 323.- BOTELLA LLUSIA, J., CHARRO SALGADO, A. FERNANDEZ DURANGO, R. and GUADALIX, F.J.: The Pituitary Reserve in FSH and LH in Amenorrhoeic and Anovulatory Women. Acta Eur Fertil 6: - 117, 1975.
- 324.- BRECKWOLDT, M., CZYGAN, P.J., LEHMANN, F. and BETTENDORF, G.: Synthetic LH-RH as a Therapeutic Agent. Acta Endocrinologica 75: 209, 1974.
- 325.- COOPER, K.J., FAWCETT, C.P. and Mc CANN, S.M.: Variations in Pituitary Responsiveness to a Luteinizing Hormone/Follicle Stimulating Hormone Releasing Factor (LH-RF/FSH-RF) Preparation During the Rat Estrois Cycle. Endocrinology 95: - 1293, 1974.
- 326.- CORBIN, A. and BEATTIE, C.W.: Inhibition of the Pre-Ovulatory Proestrous Gonadotropin Surge, Ovulation and Pregnancy with a Peptide Analogue of Luteinizing Hormone Releasing Hormone. Endocr Res Commun 2: 1, 1975.
- 327.- COUTINHO, E.M., MARA, H.S. and SCHALLY, A.V.: Changes in Intra-Ovarina Pressure in Woman Following the Administration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) Int J Fertil 19: 89, 1974.
- 328.- COY, D.H., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, E.J. and SCHALLY, A. V.: Analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) with Increased Biological Activity Produced by D-Amino Acid Substitutions in Position 6. J Med Chem 19: 423, 1976.
- 329.- COY, D.H., COY, E.J., SCHALLY, A.V., VILCHEZ-MARTINEZ, J., HIROTSU, Y. and ARIMURA, A.: Synthesis and Biological properties of (D-Ala-6, Des-Gly-NH₂¹⁰)-LH-RH Ethylamide, a -- Peptide with Greatly Enhanced LH- and FSH-Releasing Acitivity. Biochem Biophys Res Commun 57: 335, 1974.

- 330.- COY, D.H., LABRIE, F., SAVARY, M., COY, E.J. and SCHALLY, A.V.: LH-Releasing Activity of Potent LH-RH Analogs In Vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 67: 576, 1975.
- 331.- COMARU DE MEDEIROS, A.M., RODRIGUEZ, J., POVOA, L. C., FRANCO, S., DIMETZ, T., COY, D.H., KASTIN, D.J. and SCHALLY, A. V.: Clinical Studies with Long-Acting Superactive Analogs of LH-RH in Women with Secondary Amenorrhea. *Int J Fertil* - 21: 239, 1976.
- 332.- POVOA, L.C., MEIRELLES, R., LEMBRUBER, I., COMARU, A.M. and SCHALLY, A.V.: Induction of Ovulation with Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) and D-Ala⁶-LH-RH Ethylamide. *Proceedings of The First Congress on Human Reproduccion*, - Rio de Janeiro, *Excerpta Medica*, 1974.
- 333.- DUFAU, M.L. BAITINS, I.Z., Mc ARTHUR, J.W. and CATT, K.J.: Effects of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) - Upon Bioactive and Immunoreactive Serum LH Levels in Normal Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 43: 658, 1976.
- 334.- ENRIQUEZ, T., DIAZ-RUZIO, L., GARCIA, M., ZAMARRON, A., GONZALEZ PARAMO, I. y NISTAL, M.: Hipogonadismo Hipogonadotropico con Anosmia. *Revista Clínica Española* 131: 383, 1973.
- 335.- FAGLIA, G., BECK-PECCOZ, P., TRAVAGLINI, P., PARACCHI, A., SPADA, A. and LEWIN, A.: Elevations in Plasma Growth Hormone Concentration After Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LRH) in Patients with Active Acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 37: 338, 1973.
- 336.- FRANCHIMONT, P., BECKER, H., ERNOULD, Ch., THYS, Ch., DEMOULIN, A., BOURGUIGNON, J.P., LECROS, J.J. and VALCKE, J.C.: The Effects of Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing - Hormone (LH-RH) on Plasma Gonadotrophin Levels in Normal - Subjects. *Clin Endocrinol* 3: 27, 1974.

- 337.- FRASER, H.M., GUNN, A., JEFFCOATE, S.L. and HOLLAND, D.:
Effect of Active Immunization to Luteinizing Hormone Releasing Hormone on Serum and Pituitary Gonadotrophins Testes and Accessory Sex Organs in the Male Rat. J Endocr 63: 1399, 1974.
- 338.- FRASER, H.M.: Effects of Antibodies to Luteinizing Hormone Releasing on Reproductive Functions in Rodents. In: Immunization with Hormones in Reproduction Research (Ed.) E.Nieschlag. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975.
- 339.- FUJINO, M., YAMAZAKI, I., KOBAYASHI, S., FUKUDA, T., SHINAGAWA, S., NAKAYAMA, R., WHITE, W.F. and RIPPEL, R.H.: Some Analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) - Having Intense Ovulation-Inducting Activity. Biochem Biophys Res Commun 57: 1248, 1974.
- 340.- FUJINO, M., FUKUDA, T., SHINAGAWA, S., KOBAYASHI, S., YAMAZAKI, I., NAKAYAMA, R., SEELY, J.H., WHITE, W.F. and RIPPEL, R.H.: Synthetic Analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) Substituted in Position 6 and 10. Biochem Biophys Res Commun 60: 406, 1974.
- 341.- FUJINO, M., KOBAYASHI, S., OYAYASHI, M., SHINAGAWA, S., FUKUDA, T., KITADA, C., NAKAYAMA, R., YAMAZAKI, I., WHITE, W.F. and RIPPEL, R.H. Structure-Activity Relationships in the C-Terminal Part of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH). Biochem Biophys Res Commun 49: 863, 1972.
- 342.- FUJINO, M., KOBAYASHI, S., OYAYASHI, M., FUKUDA, T., SHINAGAWA, S., YAMAZAKI, I., NAKAYAMA, R., WHITE, W.F. and RIPPEL, R.H.: Synthesis and Biological Activities of Analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH). Biochem Biophys Res Commun 49: 698, 1972.

- 343.- FARUYAMA, S., MAYES, D.M. and NUGENT, C.A.: Radioimmunoassay for Plasma Testosterone. Steroids 16: 415, 1970.
- 344.- GEIGER, R., KONIG, Y., PELLETIER, J. and TERQUI, M.: Circulating Luteinizing Hormone and Testosterone Response in Rams - After Luteinizing Hormone Releasing Hormone Treatment. Acta Endocrinológica 77: 1, 1974.
- 345.- GEIGER, R., WISSMANN, H., KONIG, W., GEISEN, K. and ENZMANN, F.: Synthetis and Biological Evaluation of 4-Alanine-Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (Ala⁴ -LH-RH). Biochem Biophys Res Commun 49: 1467, 1972.
- 346.- GENNSER, G., LIEDHOLM, P. and THORELL, J.: Pituitary Hormone Levels in Plasma of the Human Fetus After Administration of -LRH. J Clin Endocrinol Metab 43: 470, 1976.
- 347.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., MILLER, M.C., SCHALCH, D.S., COY, D.H., SCHALLY, A.V. and ESCALANTE HERRERA, A.: Stimulation of an Analogue of L.H. Releasing Hormone. The Lancet 6: 1126, 1975.
- 348.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., MILLER, M. C., HENRIQUEZ-ESPINOZA, R. and SCHALLY, A.V.: Response to LH-RH in Men Infused with Theophylline. Int J Fertil 19: 207, 1974.
- 349.- GREENWOOD, F.C. and HUNTER, W.M.: The Preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. Biochem J 89: 114, 1963.
- 350.- GREELEY, E.H., ALLEN, M.B. and MAHESH, V.B.: Potentiation of -Luteinizing Hormone Release by Estradiol at the Levels of the Pituitary. Neuroendocrinology 18: 233, 1975.

- 351.- HALAZ, B., FLORSHEIM, H., CORCORRAN, N.L. and GORSKI, R.A.: Thyrotrophic Hormone Secretion in Rats After Partial or Total Interruption of Neural Afferents to the Medial Basal Hypothalamus. *Endocrinology* 80: 1075, 1967.
- 352.- HALAZ, B. and POPP, L.: Hormone Secretion of the Anterior Pituitary Gland After Physical Interruption of an Nervous Pathways to the Hypophysiotrophic Area. *Endocrinology* 77: 553, - 1965,
- 353.- HANSEN, P., ØRSKOV, H., SEYER-HANSEN, K., LUNDBAK, K.: Some Actions of Growth Hormone Release Inhibiting Factor. *Br Med J*, 3: 523, 1973.
- 354.- KELCH, R.P., CONTE, F.A., KAPLAN, S.L. and GRUMBACH, M.M.: Episodic Secretion of Luteinizing Hormone (LH) in Adolescent Patients with the Syndrome of Gonadal Dysgenesis. *J Ch Endocrinol Metab* 36: 424, 1973.
- 355.- HAWKINS, R.A. and OAKEY, R.E.: Estimation of Oestrophe Sulphate, Oestradiol-17- β and Oestrone in Peripheral Plasma: Concentration During the Menstrual Cycle and in Men. *J Endocri* 60: 3, - 1974.
- 356.- ILLIG, R., BAMBACH, M., PLUZNIK, S., ZACHMANN, M. and PRADER, A.: Die Wirkung von Synthetischem LH-RH auf die Freisetzung von LH and FSH bei Kindern und Jugendlichen. *Schweiz Med Wschr* 103: 840, 1973.
- 357.- IMMER, H., NELSON, V.R., REVESZ, C., SESTANJ, K. and GOTZ, M.: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Analogs. Synthesis - and Biological Activity. *J Med Chem* 17: 1060, 1974.
- 358.- ISIDORI, A., SPERA, G., COSTA, T., D'ALESSION, A. and FRAIOLI, f.: Distribution of Radioactivity After Administration of ^{125}I -Labelled Luteinizing. *Experientia* 30: 1211, 1974.

- 359.- ISMAIL, A.A.A., NISWENDER, G.D. and MIDGLEY Jr. A.R.: Radioimmunoassay of Testosterone Without Chromatography. J Clin Endocr 34: 177, 1972.
- 360.- JEWELWICS, R., DYRENFURTH, I., WARREN, M., FERIN, M., ANS, R., KHALAF, S. and VANDE WIELE, R.: Effect of Single Injections and Continuous I.V. Infusions of Synthetic Gonadotropin Releasing Hormone in Normal Women and Patients with Primary and Secondary Amenorrhea. Europ J Obstet Gynec Reprod Biol 1974,4/1 Supplement S175-S183.
- 361.- JOHNSEN, S.G.: Evaluation of Gonadotrophin Analyses in Male Hypogonadism. Acta Endocrinol (Copenhagen) 67: 756, 1971.
- 362.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A. COY, D.H., COY, E.J., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.: Prolonged anti-LH/FSH Activities of Some Synthetic Antagonists of LH-RH. Fertil Steril 27: 628, 1976.
- 363.- ZARATE, A., CANALES, E., SORIA, J., FORSBACH, G., KASTIN, A.J. and SCHALLY, A.V.: Therapeutic Use of Gonadoliberin (Follicle-Stimulating Hormone/Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) in Women. Fertil Steril 27: 1233, 1976.
- 364.- GONZALEZ BARCENA, D., KASTIN, A.J., SCHALCH, D.S., COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Prolonged Elevation of Luteinizing Hormone (LH) After Intranasal Administration of an Analog of LH-Releasing Hormone. Fertil Steril 27: 1246, 1976.
- 365.- JOHNOSON, E.S., GENDRICH, R.L. and WHITE, W.F.: Delay of Puberty and Inhibition of Reproductive Processes in the Rat by a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Analog. Fertil Steril 27: 853, 1976.
- 366.- TURNER, D., TURNER, E.A., de, APARICIO, N.J., SCHAWARZSTEIN, L. COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Response of Luteinizing Hormone to Different Doses of D-Leucine-6-LH-RH Ethylamide in Oligospermic Patients. Fertil Steril 27: 543, 1976.

- 367.- APARICIO, N.J., SCHWARZSTEIN, L., TURNER, E.A., TURNER, D., MANCINI, R. and SCHALLY, A.V.: Treatment of Idiopathic Normogonadotropic Oligoasthenospermia with Synthetic LH-RH. Fertil Steril 27: 549, 1976.
- 368.- JUDD, H.L., PARKER, D.C., RAKOFF, J.S., HOPPER, B.R. and YEN, S.S.C.: Elucidation of Mechanism(s) of Nocturnal Rise of Testosterone in Men. J Clin Endocrinol Metab 38: 134, 1973.
- 369.- KASTIN, A.J., SCHALLY, A.V., GONZALEZ-BARCENA, D., COY, D.H., MILLER, M.C., PORIAS, H. and SCHALCH, D.S.: Clinical Comparison of Natural LH-RH, Synthetic LH-RH, and Two Analogues of LH-RH. J Clin Endocrinol Metab 38: 801, 1974.
- 370.- KASTIN, A.J., ARIMURA, A., GONZALEZ-BARCENA, D., COY, D.H., MILLER, M.C. NISHI, N., LEE, L., DURON-HUERTA, H., SCHALCH, D. S. and SCHALLY, A.V.: Increased Potency of Four Analogues of LH-Releasing Hormone in Man. Int J Fertil 19: 202, 1974.
- 371.- KANEMZTOSO, S. and SAWYER, C.H.: Effects of Hypothalamic and Hypophysial Estrogen Implants on Pituitary and Plasma LH in Ovariectomized Rabbits. Endocrinology 75: 579, 1964.
- 372.- KELLER, P.J.: A Pituitary Function Test with Synthetic LH-Releasing Hormone. J Obst & Gyn Brit Comm 80: 72-74, 1973.
- 373.- KATZ, M., PIMSTONE, B.L., CARR, P.J. and HENDRICKS, S.: Plasma Gonadotropin and Gonadotropin-Releasing Hormone Levels After Intranasal Administration of Gonadotropin Releasing Hormone. J Clin Endocrinol Metab 43: 215, 1976.
- 374.- KELCH, R.P., CLEMENS, L.E., MARKOV, M., WESTHOFF, M.H. and HAWKINS, D.W.: Metabolism and Effects of Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone (Gn RH) in Children and Adults. J Clin Endocrinol Metab 40: 53, 1975.

- 375.- KELLER, P.: Treatment of Anovulation with Synthetic LH-RH. - Amer J Obst & Gynec 116: 698-705, 1973.
- 376.- KLINGENSMITH, G.J., WENTZ, A.C., MEYER, W.J. and MIGEON, C.J.: Gonadotropin Output in Congenital Adrenal Hyperplasia Before and After Adrenal Suppression. J Clin Endocrinol Metab 43: 933, 1976.
- 377.- LEYENDECKER, G., WARDLAW, S. and NOCKE, W.: Experimental Studies on the Endocrine Regulations During the Perioovulatory Phase of the Human Menstrual Cycle. Acta Endocrinologica 71: 160, 1972.
- 378.- MALES, J.L. and SCH EIDER, S.A.: Hypergonadotrophic Hypogonadism with Anosmia. Acta Endocrinologica 71: 7, 1972.
- 379.- MASKEN, J.F., KRAGT, G.L., GALLO, R.V. and GARONG. N.F.: Release of Luteinizing Hormone by Electrical Stimulation of the Medial Preoptic Area and Arcuate Nucleus in the Male Rat. Neuroendocrinology 15: 249, 1974.
- 380.- MATSUO, H., BABA, Y., NAIR, R.M.G., ARIMURA, A. and SCHALLY, A. V.: Structure of the Porcine LH- and FSH-Releasing Hormone. I. The Proposed Amino Acid Sequence. Biochem Biophys Res Commun - 43: 1334, 1971.
- 381.- MILLET, D., FRANCHIMONT, P., NETTER, J.P., THEVENET, M., THIEBLOT, P., VENDRELY, E. et NETTER, A.: Corrélations Histo-Hormonales (FSH, LH, Stéroïds) Dans les Stériles Masculines Sécrétoires. Ann Endocrinol (Paris) 34: 377, 1973.
- 382.- MIDGLEY, A.R.: Radioimmunoassay for Human Follicle-Stimulating Hormone. J Clin Endocrinol Metab 27: 295, 1967.
- 383.- MIYAKE, A., TANIZAWA, O., AONO, T., YASUDA, M. and KURACHI, K.: Suppression of Luteinizing Hormone in Castrated Women by the Administration of Humans Chorionic Gonadotropin. J Clin Endocrinol Metab 43: 928, 1976.

- 384.- NAJJAR, S.S., TAKLA, R.J. and NASSAR, V.H.: The Syndrome of Rudimentary Testes: Occurrence in Five Siblings. J Pediatric 84: 119, 1974.
- 385.- NAFTOLIN, F. and HARRIS, G.W.: Effect Luteinizing Hormone Releasing Factor on Normal and Hypogonadotrophic Anosmic Men Nature 232: 496, 1971.
- 386.- NAKANO, R., MIZUNO, T., KOTSUJI, F., KATAYAMA, K., WASHIO, M. and TOJO, S.: Tiggering of Ovulation After Infusion of Synthetic LH-RH. Acta Obst & Gynecol Scand 52: 269-272, 1973.
- 387.- NAKANO, R., TAKEKIDA, H., KOTSUJI, F. MIYAZAKI, Y. and TOJO, S.: Gonadotropin Response to a New Analogue of Luteinizing Hormone-Releasing Factor (Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-Ethylamide⁹)-LRF in Men. J Clin Endocrinol Metab 39: 802, 1974.
- 388.- NAKANO, R., TAKEKIDA, H., KOTSUJI, F. and TOJO, S.: Pituitary Response to a New Analog of Luteinizing Hormone Releasing Factor During the Menstrual Cycle. Obstet & Gynecol 45: 263, 1975.
- 389.- NAKANO, R., KAYASHIMA, F., KATAYAMA, K., MIZUNO, T., WASHIO, M. and TOJO, S.: The Radio-Immunoassay of Follicle-Stimulating - Hormone (FSH) During Human Pregnancy: Serum Concentration and Response to Luteinizing Hormone Releasing Factor (LRF). Acta - Obstet & Gynecol Scand 53: 259, 1974.
- 390.- NILLIUS, S.J., FRIES, H. and WIDE, L.: Successful Induction of Follicular Maturation and Ovulation by Prolonges Treatment wiht LH-RH in Women with Anorexia Nervosa. Amer J Obst and Gynec - 122: 921-928, 1975.
- 391.- PAREDES-SUAREZ, M., VAREA, J., ARROYO, E., GARCES, G., AVILA, C. y SCHALLY, A.V.: Respuesta Hipofisaria a la Administración del LH-RH Sintética y a un Análogo de la LH-RH en Sujetos Normales de Nivel del Mar y de la Altura. Conferencia en el X Curso Internacional de Endocrinología Clínica. Madrid, 1977.

- 392.- PEREZ-PALACIOS, G., IRAMAIN, C.A., CASTAÑEDA, E., ROJO, B., -
LONG, D.W., SCAGLIA, H. and GUAL, C.: Plasma Profile of Pitui-
tary Gonadotropins and Ovarian Steroides in the Normal Menstrual
Cycle. Rev Invest Clin 25: 305, 1973.
- 393.- RUIZ-GONZALEZ, M.C.: Determinación Semicuantitativa de Preg-
nandiol Urinario por Cromatografía Gas Líquido. Rev Clin Esp
134: 17, 1974.
- 394.- ROWE, P.H., RACEY, P.A., LINCOLN, G.A., ELLWOOD, M., LEHANE, J.
and SHENTON, J.C.: The Temporal Relationship Between the Secre-
tion of Luteinizing Hormone and Testosterone in Man. J Endocr
64: 17, 1975.
- 395.- SANBORN, B.M., ELKINGTON, J.S.H., CHOWDHURY, M., TCHOLAKIAN, R.
K. and STEINBERGER, E.: Hormonal Influences on the Level of Tes-
ticular Androgen Binding Activity: Effect of FSH Following Hy-
pophysectomy. Endocrinology 96: 304, 1975.
- 396.- SERRA, G.B., MUSCATELLO, P., MENINI, E., LAFUENTI, G. and CANI-
GLIA, R.: Enhancement of Deficient Pituitary Response to LH-RH
in Patients with Primary Amenorrhea After Treatment with LH-RH.
Obst & Gynec 45: 523-526, 1975.
- 397.- BRECKWOLDT, M., CZYGAM, P.J., LEHMANN, F. and BETTENDORF, G.:
Synthetic LH-RH as a Therapeutic Agent. Acta Endocrinol 75: 209,
1974.
- 398.- ZARATE, A., CANALES, E.S., AYALA, A., SORIA, J., SCHALLY, A.V.,
KASTIN, A.J., COY, D.H. and COY, E.J.: Use of Long-Acting LH-RH
Analogues in the Treatment Female Infertility. In: Basic Applica-
tions and Clinical Uses of Hypothalamic Hormones (Eds) A.L. Cha-
rro-Salgado, R. Fernández-Durango and J.G. López del Campo. pp.
288-290. Excerpta Medica, Amsterdam, 1976.

- 399.- SCHALLY, A.V., ANDERSEN, R.N., LIPSCOMB, H.S., LONG, J.M. GUI-
LLEMIN, R.: Evidence for the Existente of Two Corticotrophin-Re-
leasing Factors, and . Nature 188: 1192, 1960.
- 400.- SCHALLY, A.V.: Hypothalamic Regulatory Hormones: Experimental
and Clinical Studies. In Basic Aplications and Clinical Uses -
of Hypothalamic Hormones (Eds). Charro Salgado, A.L., Fernán-
dez-Durango, R., and López del Campo, J.G. pp. 3-16, 1976, Ex-
cerpta Medica, Amsterdam.
- 401.- SMITH, K.D., RCHOLAKIAN, R.K., CHOWDHURY, M. and STEINBERGER,
E.: Rapid Oscillations in Plasma Levels of Testosterone, Lutei-
nizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Men. Ferti-
lity and Sterility, 26: 965, 1974.
- 402.- SORIA, J., ZARATE, A., CANALES, E.S., AYALA, A., SCHALLY, A.V.,
COY, D.H., COY, E.J. and KASTIN, A.J.: Increased and Prolonged
LH-RH/FSH-RH Activity of Synthetic (D-Ala⁶, des Gly NH₂)-LH-RH
Ethylamide in Normal Women. Am J Obstet Gynecol 123: 145, 1975.
- 403.- SORIA, J., ZARATE, A., CANALES, E.S., VELAZQUEZ, N. y CARBALLO,
O.: Activacion Prematura Hipotalámica Liberadora de Gonadotro-
pinas (LH-RH) y del y del Clomifeno sobre la Secreción de FSH
y LH. Rev Invest Clin (Mex) 26: 35-40, 1974.
- 404.- SOUTHREN, A.L. and GORDON, G.G.: Rhythms and Testosterone Meta-
bolism. J Steroid Biochem 6: 809, 19745.
- 405.- SPONA, J.: LH-RH-Sensitive Adenylate Cyclase in Isolated Plas-
ma Membranes of Rat Adenohypophyses. Endocrinol Exp (Bratisl)
9: 27, 1975.
- 405.- SPONA, J.: LH-RH Receptor Interaction is Inhibited by Des-His-
2-Des-Gly-10-LH-RH Ethylamide. FEBS Lett 48: 88, 1974.

- 407.- SPONA, J.: LH-RH Interaction with the Pituitary Plasma Membrana. FEBS Lett 34: 24, 1973.
- 408.- STONE, S.C., JARAMILLO, F., KASTIN, A.J., ARIMURA, A., VARGAS, J.R., SCHALLY, A.V. and DICKEY, R.P.: Effect of LH-RH on Antibody Formation, Sperm Count and Plasma Levels of Gonadotropins and Testosterone in Normal Men. Int J Fertil 19: 192, 1974.
- 409.- VIGERSKY, R.A., LORIAUX, L.D., ANDERSEN, A.E., MECKLEMBURG, R. S. and VAITUKAITIS, L.J.: Delayed Pituitary Hormone Response - to LRF and TRF in Patients with Anorexia Nervosa and with Secondary Amenorrhea Associated with Simple Weight Loss. J Clin Endocrinol Metab 43: 893, 1976.
- 410.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., SCHALLY, A.V., COY, D.H., COY, E.J., MILLER, C.M. III, and ARIMURA, A.: An In Vivo Assay for Anti-LH-RH and Anti-FSH-RH Activity of Inhibitory Analogues of LH-RH. Endocrinology 96: 1130, 1975.
- 411.- TANNER, J.M.: Growth at Adolescence. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1962. 2nd Edition.
- 412.- MIDEGLEY, A.R.: Radioimmunoassay: A Method for Human Chorionic Gonadotropin and Human Luteinizing Hormone. Endocrinology 79: 10, 1966.
- 413.- WIELAND, R.G., MARVIN, C., HALLBERG, B.S., KEITH, R., KOEKE, M.D. and ZORN, M.E.: Pituitary-Gonadal Rhythm in the Eugonadal Adult Male. Fertil Steril 24: 644, 1973.
- 414.- ZAÑARTU, J., DABANCENS, A., RODRIGUEZ, B.R., BRAVO, R., BARSBY, F. and SCHALLY, A.V.: Ovulation Induction: Ovarian Response to Human Gonadotropins and Synthetic LH-RH. Obst and Gynec 45: 443-450, 1975.
- 415.- FERNANDEZ-DURANGO, R.: Radioinmunoensayo de Gonadotropinas Humanas y su Aplicación en la Clínica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas. Madrid 1975.

- 416.- ZARATE, A., GARRIDO, J., CANALES, E.S., SORIA, J. and SCHALLY, A.V.: Disparity in the Negative Gonadal Feedback Control for - LH and FSH Secretion in Cases of Germinal Aplasia or Sertoli-Cell-Only Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 1125, 1974.
- 417.- GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. and GLOVER, J.S.: The Preparation of I¹³¹ Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem j* 89: 114, 1972.
- 418.- ZARATE, A., CANALES, E.S. DE LA CRUZ, A., SORIA, J. and SCHALLY, A.V.: Pituitary Response to Synthetic LH-RH in Stein-Leventhal Syndrome and Functional Amenorrhea. *Obst & Gynec* 41: 803-808, - 1973.
- 419.- CLERMONT, Y.: The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Man. *Am J Anat* 112: 35, 1963.
- 420.- BESSER, G.M.: Hypothalamus as an Endocrine Organ, I. *Brit Med* 3: 560, 1974.
- 421.- GONZALEZ-BARCENA, D., KASTIN, A.J., ESCALANTE-HERRERA, A., GONZALEZ-MARTINEZ, A., COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Long Acting - Analogues of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. In: *Basic Applications and Clinical Uses of Hypothalamic Hormones*. (Eds) A. L. Charro Salgado, E. Fernández-Durango and J.G. López del - Campo. pp. 300-306. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1976.
- 422.- COMARU DE MEDEIROS, A.M., RODRIGUEZ, J., POVOA, L.C., FRANCO, S., DIMETZ, T., COY, D.H. and SCHALLY, A.V.: Clinical Studies with D-Ala-6-LH-RH Ethylamide and D-Leu-6-LH-RH Ethylamide in Women with Secondary Amenorrhea. In: *Basic Applications and - Clinical Uses of Hypothalamic Hormones* (Eds) A.L. Charro Salgado, R. Fernández-Duranto and J.G. López del Campo. pp. 307-312. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1976.

- 423.- COY, D.H., COY, E.J., SCHALLY, A.V., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., BELJUK, L., CARTER, W.H. and ARIMURA, A.: Stimulatory and Inhibitory Analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone. -- Biochemistry, 13: 323, 1974.
- 424.- HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C.: Preparation of I¹³¹ Labelled Growth Hormone of High Specific Activity. Nature (London) 194: 495, 1962.
- 425.- BEAULIEU, M., LABRIE, F., COY, D.H., COY, E.J. and SCHALLY, A. V.: Parallel Inhibition of LH-RH Induced Cyclic AMP Accumulation and LH and FSH Release by LH-RH Antagonists In Vitro. J Cyclic Nucl Res 1: 243, 1975.
- 426.- REES, R.W.A., FOELL, T.J., CHAI, S.Y. and GRANT, N.: Synthesis and Biological Activities of Analogs of the Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) Modified in Position 2. J Med Chem 17: 1016, 1974.
- 427.- DE LA CRUZ, A., COY, D.H., VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., ARIMURA, A., and SCHALLY, A.V.: Blockade of Ovulation in Rats by Inhibitory Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. Science 191: 195, 1976.
- 428.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., SCHALLY, A.V., COY, D.H., COY, E.J., BELJUK, L. and ARIMURA, A.: In Vivo Inhibition of LH Release by a Synthetic Antagonist of LH-RH Release by a Synthetic Antagonist of LH Releasing Hormone (LH-RH). Endocrinology 95: 213, 1974.
- 429.- VALE, W., GRANT, G., RIVIER, J., MONAHAM, M., AMOSS, M., BLACKWELL, R., BURGUS, R. and GUILLEMIN, R.: Synthetic Polipeptide Antagonists of the Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing Factor. Science 176: 933, 1972.

- 430.- ZANARTU, J., ROSNER, J.M., GUILOFF, E., IBARRA-POLO, A.A., -
CROXATTO, H.D., CROXATTO, H.B., AGUILERA, E., COY, D.H. and
SCHALLY, A.V.: Attempts to Program Ovulation in Women Treated
with Exogenous Estrogens and LH-RH Analog. Br Med J 2: 527,
1975.
- 431.- VILCHEZ-MARTINEZ, J.A., COY, D.H., ARIMURA, A., COY, E.J., -
HIROTSU, Y. and SCHALLY, A.V.: Synthesis and Biological Pro-
perties of (D-Leu⁶)-LH-RH- and (D_Leu⁶ des Gly-NH₂¹⁰)
-LH-RH Ethylamide. Biochem Biophys Res Commun 59: 1226, 1974.
- 432.- MONAHAN, M.W., AMOSS, M.S., ANDERSON, H.A. and VALE, W.: Syn-
thetic Analogs of the Hypothalamic LH-RH with Increased -
Agonist of Antagonist Properties. Biochemistry 12: 4616, --
1973.
- 433.- LUNENFELD, B. and their Treatment by Ovulation Iduction. Clin
Endocr 3: 223, 1974.
- 434.- ZANARTU, J., DABANCENS, A., RODRIGUEZ-BRAVO, R. and SCHALLY,
A.V.: Induction of Ovulation with Synthetic Gonadotrophin-Re-
leasing Hormone in Women with Constant Anovulation Induced
by Contraceptive Steroids. Br Med J 1: 605, 1974.