

Efecto de la testosterona sobre la liberación de FSH hipofisaria en ratas hembras impúberes

O. FERNÁNDEZ LIMIA Y A. P. KUROEDOV

Dpto. de Fisiología, Rama Agropecuaria. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 28 de Septiembre 1974

ABSTRACT. We use the principle of Steelman and Pohley for the determination of the endogen FSH, and with this method was observed the effect of small doses of testosterone propionate injected in different moments prior the H.C.G. treatment. We obtained that the testosterone is able to produce a maximal ovariam weight response, when injected 48 hours before the first injection of H.C.G. When we use different doses of testosterone propionate the major effect on the ovarian weight was observed in a range of 0.05 to 0.2 mg of this product. Higher doses show a negative dose response ratio, the same was observed with other testosterone compound. The stimulant effect of testosterone was observed in rats with 30 to 50 g of body weight.

RESUMEN. Para este trabajo empleamos el principio de Steelman y Pohley para la determinación de FSH endógena y con este método fue observado el efecto de pequeñas dosis de propionato de testosterona aplicado en diferentes tiempos antes del tratamiento con HCG. Nuestros resultados muestran que la testosterona es capaz de producir un incremento máximo de la respuesta ovárica cuando fue inyectada 48 horas antes de la primera inyección de HCG. Cuando se emplearon diferentes dosis de propionato de testosterona el efecto más pronunciado en el peso ovárico fue observado al utilizar dosis entre 0.05 y 0.2 mg de este producto. Dosis mayores provocaron una relación negativa dosis respuesta, lo mismo fue observado con otro preparado de testosterona. El efecto estimulante de la testosterona fue observado en ratas con 30 a 50 g de peso corporal.

INTRODUCCION

De los resultados contradictorios encontrados en la literatura en cuanto al efecto de los andrógenos en animales hembras es posible asumir que las diferencias en cuanto a dosis, edad de los animales y tipos de tratamientos, hayan influido en los resultados de forma tal que no concuerden. Korenchevsky, (1939), planteó que un tratamiento de corta duración con

Propionato de Testosterona (PT) aumenta el peso ovárico y la formación de cuerpos lúteos, mientras que un tratamiento prolongado resulta en atrofia ovárica. Price y Ortiz, (1944) también encontraron que las dosis bajas de andrógenos podían estimular al ovario a través de la hipófisis pero que ésto podía ocurrir solamente después de los veinte días de edad en la rata, momento en que se produce algún cambio que determine este efecto.

Basándonos en los trabajos de Zorrows y cols, (1969), que plantean que los andrógenos producen aparición precoz de la pubertad en ratas hembras, cuando son aplicados en pequeñas dosis y con tratamientos cortos (dos inyecciones), y en los de Naqvi y Johnson, (1969) que han mostrado que la aplicación de una sola dosis de PT a ratas hembras impúberes causaba aumento en la FSH endógena circulante, planteando la existencia de un feedback positivo de los andrógenos sobre la liberación de esta hormona en determinadas condiciones y que además este efecto era cíclico a intervalos regulares.

Nos propusimos determinar la relación entre la dosis de testosterona y su efecto sobre la liberación de FSH, comparando el efecto de preparados de acción rápida (Propionato) y lenta (Enantato), así como determinar el tiempo necesario requerido por el PT para producir liberación de FSH hipofisaria en ratas hembras impúberes y el momento en que la respuesta es mayor. Además debido a que las ratas utilizadas por nosotros son Wistar aclimatadas a condiciones tropicales, las cuales no son buenas para las determinaciones de gonadotropinas. (Pelletier, 1971) y con la gran variedad de pesos encontrados en los animales a nuestra disposición a pesar de tener igual edad, nos planteamos el estudio de este factor con vistas a utilizar los animales idóneos.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas hembras, Wistar, de 21 a 23 días de edad; con un peso comprendido entre 30 y 50 g procedentes del Dpto. de Vivero del CNIC y del Centro de Cría de Animales de Experimentación del MINSAP. Se mantuvieron en jaulas aereadas, con libre acceso al agua y a la comida, a una temperatura de 22 a 24°C, y con períodos alternos de luz oscuridad 12/12 horas. Las inyecciones se aplicaron subcutáneamente en el dorso del animal con aguja 26 gauge.

El tratamiento de los animales se dividió en dos partes: un pretratamiento con andrógenos y una segunda parte donde se inyectó HCG que se mantuvo invariable y consistía en la aplicación de 0.5 ml de solución, dos veces al día, por tres días, totalizando 50 u.i. de esta hormona. Los animales se sacrificaron setenta y dos horas después de la primera de esta serie de inyecciones, disecándose los ovarios, secándose en papel absorbente y pesándose posteriormente en una balanza de torsión. Este diseño es básicamente un ensayo de Steelman y Pohley, (1953) para la FSH, el cual se fundamenta en el aumento de peso ovárico que se produce por la interacción de la FSH y la HCG. Esta última promueve un cierto incremento en la talla del ovario pero ningún desarrollo folicular. El peso del ovario parece estar determinado por el tejido intersticial y por el folicular. Así puede asumirse que cualquier incremento en la respuesta a la HCG está determinado por un aumento de la FSH endógena, la cual promueve el desarrollo de los folículos (Shiino y Rennels, 1967) y consecutivamente aumenta el peso del órgano de forma directamente proporcional a la cantidad de hormona. Esto se corrobora por los mismos autores con la utilización de sueros anti FSH y por Naqvi y Johnson, (1969), los que al hipofisectomizar las ratas hacían desaparecer las variaciones del peso ovárico promovidas por los esteroides gonadales.

El pretratamiento con andrógenos varió con el experimento, así en el primero los animales fueron divididos en siete grupos según el momento en que se aplicó una inyección de 0.1 mg de PT. Se tomó como referencia la primera inyección de HCG, momento que se denominó hora 0. Los grupos fueron de 84, 72, 60, 48, 36, 24 y 12 horas antes de la hora 0 (Fig. 1). Además hubo un grupo de ratas de control que recibió 0.1 ml de aceite vegetal cada una.

Otro experimento consistió en la aplicación de 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mg de Propionato de testosterona; Enantato de Testosterona a las dosis mayores es decir a 0.1, 0.5 y 1 mg debido a su efecto de depósito a ratas 48 horas antes de la hora 0. Manteniéndose grupos de control. También se emplearon ratas las que fueron separadas por sus pesos en 5 grupos: menores de 30 g, de 30 a 34 g, de 35 a 39 g, de 40 a 44 g y de 45 a 50 g. Recibiendo todas 0.1 mg de PT 48 horas antes de la primera inyección de HCG (hora 0).

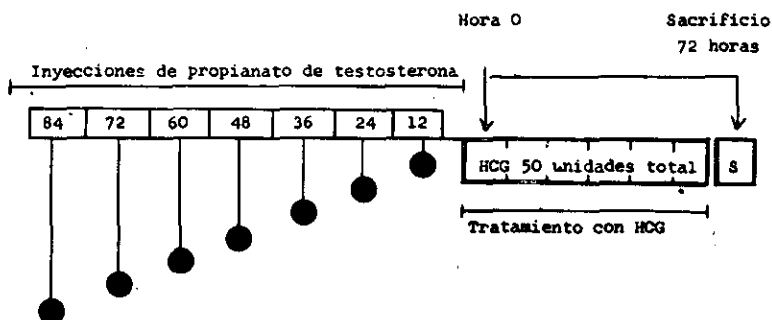


Fig. 1. Aplicación de 0.1 mg de Propionato de Testosterona a diferentes tiempos de la administración de 50 u.i. de HCG en ratas hembras impúberes.

El Propionato y el Enantato de Testosterona fueron disueltos en aceite vegetal de forma que la concentración deseada estuviera en 0.1 ml cantidad que fue inyectada a los animales.

RESULTADOS

Como puede apreciarse en la Tabla I, los pesos ováricos de los animales tratados con PT en diferentes momentos, presentan todos los grupos diferenciados con el grupo control que sólo recibió aceite vegetal. Los animales inyectados con el andrógeno 84 horas antes de la hora 0, así como el grupo inyectado 72 horas antes de la hora 0, mostraron un discreto incremento en los valores promedios de sus pesos ováricos, 45.67 y 43.10 respectivamente, si los comparamos con 36.37 que fue el valor medio de los animales no inyectados con PT, esta diferencia no fue estadísticamente significativa y nos habla de que el efecto del andrógeno sobre la liberación de FSH, si consideramos esta proporcional al incremento del ovario, es transitoria ya que como puede verse en la misma tabla los grupos inyectados 60, 48 y 36 horas antes del tratamiento con HCG si presentaron una diferencia significativa con el control para una $p < 0.05$, los grupos de 60 y 36 horas y para $p < 0.01$ el grupo de 48 horas que fue precisamente el de mayor valor (61.33) y el de mayor variabilidad ya que su error standard fue de 5.60. Esto nos indica de que efectivamente el PT promueve liberación de FSH para la hipófisis de ratas hembras impú-

beres y de que su efecto es mayor si administramos el andrógeno 48 horas antes de la hora 0.

TABLA I

Pesos ováricos al administrar 0.1 mg de Propionato de Testosterona a diferentes tiempos antes de la hora 0

Horas	Peso ovárico (mg)	N
84	45.67 $\pm$ 3.55	10
72	43.10 $\pm$ 1.18	10
60	57.50 $\pm$ 4.30	10 *
48	61.33 $\pm$ 5.60	10 **
36	48.21 $\pm$ 1.70	9 *
24	43.00 $\pm$ 0.80	9
12	40.60 $\pm$ 3.99	10
Control	36.37 $\pm$ 2.01	9

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

Posteriormente a éstos, es decir, el grupo de 24 horas, muestra una caída en sus pesos ováricos que hace su diferencia con el control no significativa, lo mismo sucede con el grupo inyectado 12 horas antes de la HCG en el cual el valor promedio (40.60) cae todavía más que el grupo que le precede. Esto nos indica que el PT muestra un retardo en su acción que es muy difícil determinar en este experimento ya que si aumentamos el número de animales es muy posible que algunas de estas diferencias se hagan significativas y además que el intervalo utilizado por nosotros es de 12 horas, el cual es relativamente grande. También debemos señalar que los cambios producidos por el PT en los pesos ováricos de los animales tratados en diferentes tiempos no varían de forma lineal, como puede observarse en la Fig. 2, existiendo cierta ciclicidad en la respuesta.

En la Tabla II, puede apreciarse cómo al administrar 0.025 mg de PT se produce un incremento en la respuesta al comparar el valor promedio del peso ovárico de este grupo (44.38) con el del grupo control (37.25) sin ser esta diferencia significativa, sin embargo al aumentar la dosis de PT a 0.05, 0.1 y 0.2 mg se manifiesta un incremento significativo, diferente para una $p < 0.01$, por lo que podemos hablar que a estas dosis este producto es capaz de estimular la liberación de FSH hipofisaria.

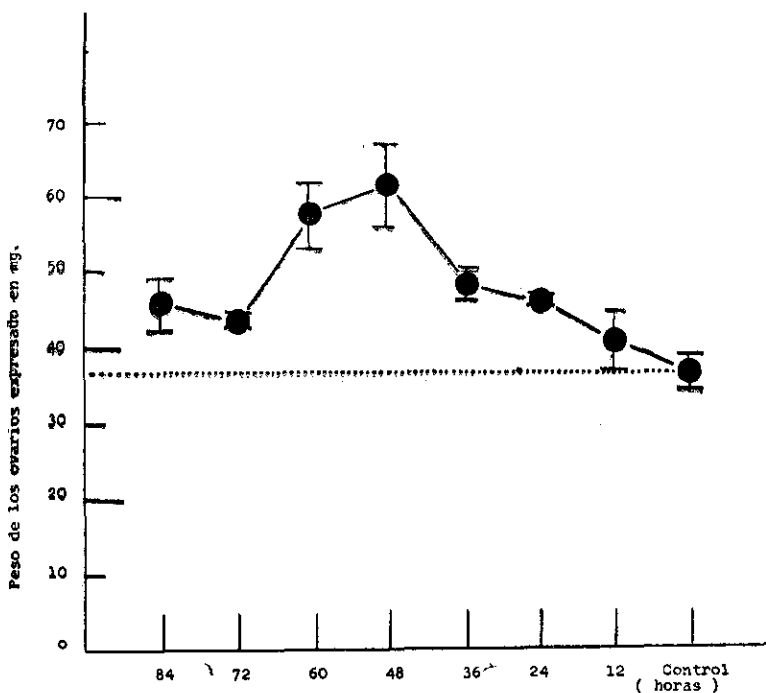


Fig. 2. Peso de los ovarios de ratas hembras impúberes que recibieron 0.1 mg de Propionato de Testosterona a diferentes tiempos antes de la aplicación de HCG. La línea punteada expresa el valor del control.

Pero a dosis mayores vemos una disminución de esta respuesta, así con 0.5 mg se presentó un valor de 50.50 que tenía aún diferencia significativa con el control para una $p < 0.05$ y, ya con 1 mg de PT desapareció la diferencia con el control, esto puede verse de forma gráfica en la Fig. 3,

al utilizar el Enantato de Testosterona (Tabla II), vemos un efecto similar al que se produce por el PT, aunque los pesos ováricos con el Enantato fueron algo mayores no presentaron significación al compararlos con los provocados con PT, pensamos ésto sea debido a que como este producto tiene un efecto de depósito su liberación de los tejidos es más lenta y la dosis efectiva de testosterona en sangre es quizás algo menor.

TABLA II

Valores de los pesos ováricos al administrar diferentes dosis de Enantato y Propionato de Testosterona

Dosis (mg)	Pesos ováricos (mg)			
	Propionato	N	Enantato	N
0.025	44.38 $\pm$ 2.98	6		
0.05	60.74 $\pm$ 3.13	5		
0.1	59.25 $\pm$ 3.17	12	58.62 $\pm$ 5.09	12
0.2	59.60 $\pm$ 4.96	12		
0.5	50.50 $\pm$ 3.75	12	56.75 $\pm$ 3.00	10
1	43.70 $\pm$ 2.28	10	49.63 $\pm$ 3.16	6
Control	38.16 $\pm$ 2.11	(8)		

En la Fig. 4 queda aún de forma más clara esta comparación entre estos dos preparados de testosterona, apreciándose también la relación dosis efecto inversa que ambos manifiestan.

En la Tabla III vemos la diferencia en la respuesta provocada por la administración de 0.1 mg de PT, 48 horas antes de la hora 0 en animales de diferentes pesos. Esta respuesta es diferente de forma significativa para una $p < 0.01$ entre el grupo de animales con un peso menor de 30 g y el de 40-44 g. Donde apreciamos cómo el peso de los animales influye de forma evidente en los resultados y es un factor importante que debe tenerse en cuenta al realizar este tipo de estudios. Al comparar los demás grupos de peso vemos, que en cuanto a su respuesta ovárica, hay mayor parecido, sin embargo el grupo de animales de 30 a 34 g con un valor

promedio de 50.75 en sus ovarios, fue diferente ($p < 0.05$) del grupo de 40.44 g que mostró un valor de 60.36, además el grupo de 45 a 50 g aunque su peso ovárico promedio (58.80) no fue diferente al del grupo de 40-44 g, sí demostró responder de forma muy variable, cosa que se ve en su error standard que fue de 8.96 a diferencia del grupo que le precede que fue sólo de 2.87. En la Fig. 5 se aprecia gráficamente el aumento en la respuesta con respecto al aumento de peso de los animales, así como la gran variabilidad de las ratas de mayor peso corporal.

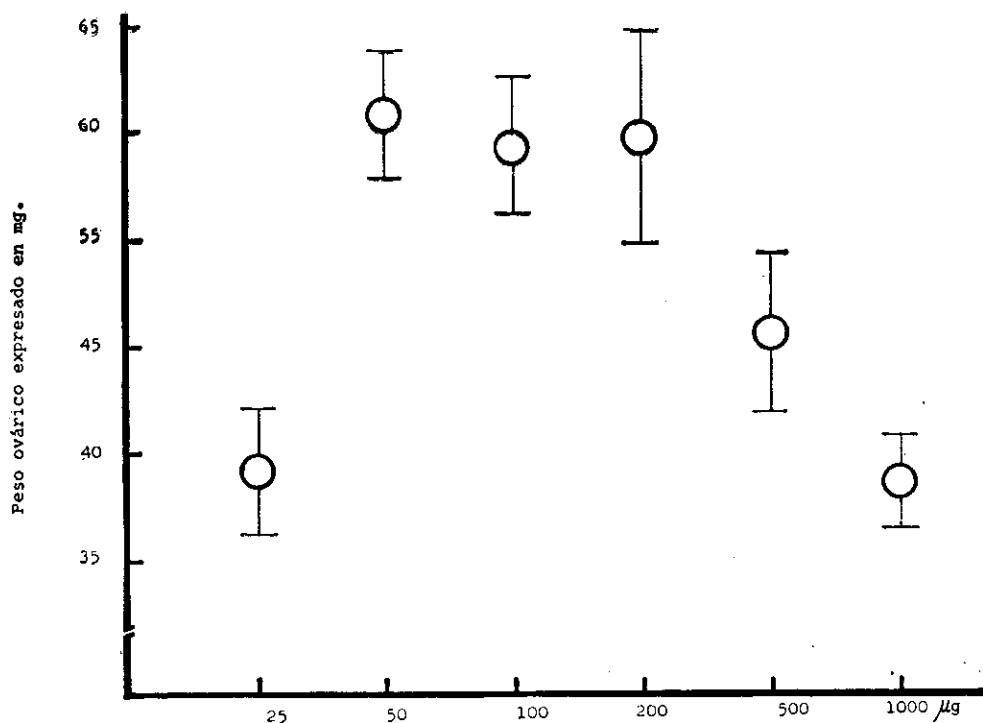


Fig. 3. Peso de los ovarios de ratas hembras impúberes que recibieron diferentes dosis de Propionato de Testosterona, 48 horas antes de la HCG.

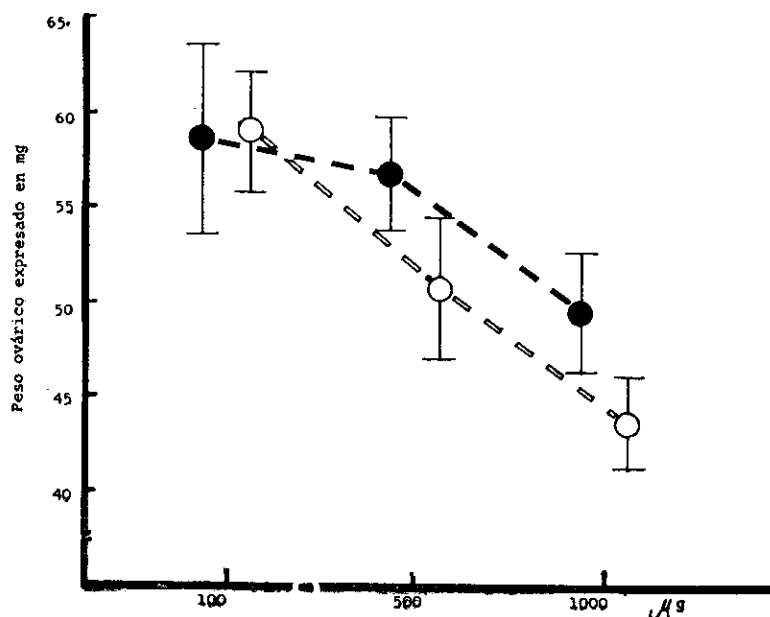


Fig. 4. Peso de los ovarios de ratas hembras impúberes que recibieron ● Enantato de Testosterona y ○ Propionato de Testosterona a diferentes dosis.

TABLA III

Valores de peso ovárico de ratas con diferente peso corporal, que recibieron 0.1 mg de Propionato de Testosterona

Pesos (g)	Peso ovárico (mg)	N
30	38.25 ± 5.13	11 ***
30-34	50.75 ± 6.18	15 *
35-39	54.64 ± 3.93	15
40-44	60.36 ± 2.87	13
45-50	58.80 ± 8.96	9

* $p < 0.05$

*** $p < 0.001$

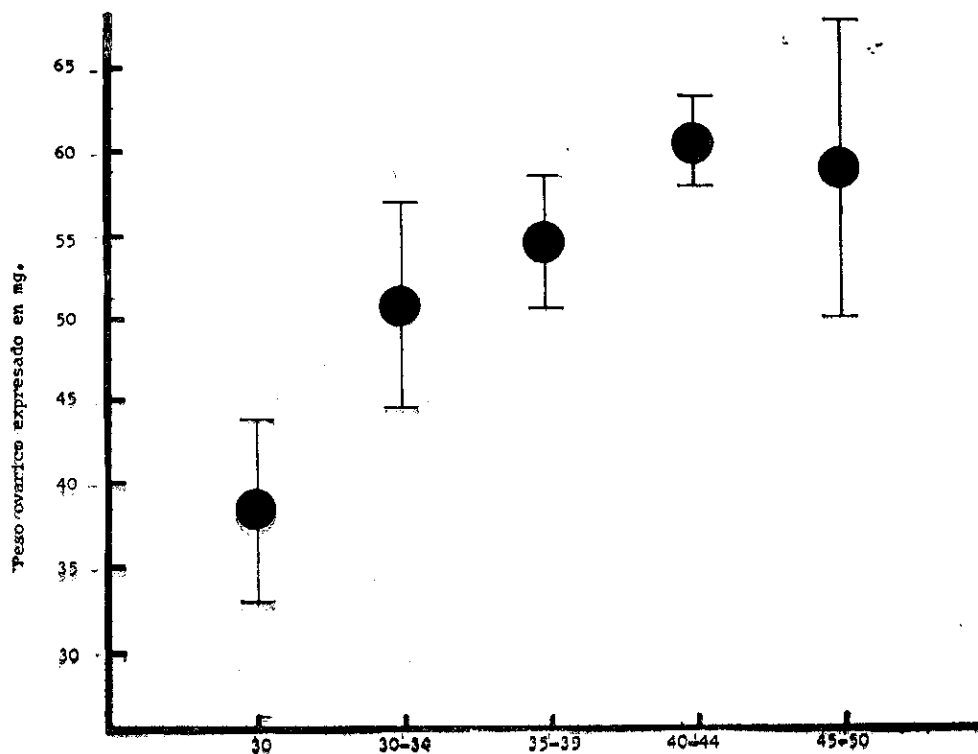


Fig. 5. Peso de los ovarios de ratas hembras impúberes de diferentes peso corporal que recibieron 0.1 mg de Propionato de Testosterona, 48 horas antes de la HCG.

DISCUSION

Un punto que debe aclararse es el método empleado en la determinación de FSH endógena. Nosotros asumimos que el aumento de peso ovárico es debido a la liberación de FSH, ya que el método está basado en que sólo esta hormona es capaz de aumentar la acción de la HCG sobre el ovario. Este tipo de ensayo ha sido utilizado por Shiino y Rennels, (1967) y por Johnson y Naqvi, (1969), llegando ambos grupos de investigadores a la conclusión de que la respuesta es una muestra directa del efecto de la FSH y por lo tanto de la cantidad de ésta.

Nuestros resultados concuerdan con los planteamientos de Naqvi y Johnson, (1969), aunque estos autores reportan que la respuesta óptima con 0.1 mg de PT la obtuvieron 72 horas antes de la primera inyección de HCG, mientras en nuestro caso fue 48 horas antes. Esta diferencia podría ser explicada por la utilización de diferentes líneas de ratas.

Sobre la no linealidad de incremento y decremento de la respuesta, pensamos se deba a la variación cíclica de la misma descrita por Johnson y Naqvi, (1969), los cuales la caracterizan utilizando intervalos hasta de 4 horas entre las inyecciones de PT.

Podemos también señalar, que los resultados indican que la testosterona a una determinada concentración en sangre es capaz de estimular la liberación de FSH por la hipófisis y que a mayores concentraciones no desarrolla esta acción, sino que posiblemente tenga un efecto opuesto o sea el de feedback negativo. De esta forma se corroboran los planteamientos de Korenchersky, (1939), de que a dosis pequeñas el PT es capaz de estimular al ovario por medio de la hipófisis, mientras que dosis mayores inhibían las gónadas, este efecto inhibitorio al utilizar o bien dosis altas o tratamientos prolongados han sido descritos por muchos autores (Selye y Friedman, 1940). Sobre el efecto estimulador de las pequeñas dosis se pueden encontrar los resultados de Price y Ortiz, (1944), los de Zarrow y cols., (1969), los que descubrieron un efecto de feedback positivo de los andrógenos sobre la FSH al utilizar dosis únicas de testosterona.

El factor "características del animal" es sumamente importante en los resultados y debe ser estudiado por cada investigador para no cometer errores de apreciación al comparar sus valores con los de otros (Loraine, 1958).

Sobre el peso de los animales se ha escrito poco, sin embargo, Price y Ortiz (1944), plantean que es un factor significativo encontrando rangos de pesos que respondían mejor que otros.

Nuestros resultados nos indican que según su peso, los animales responden más o menos a los andrógenos, obteniéndose las mejores respuestas en animales que pesen entre 35 y 45 g, por su poca variabilidad, sin embargo es posible utilizar animales con un peso comprendido entre 30 y 50 g, aunque éste aumente la variabilidad de la respuesta.

Ramírez y Sawyer (1965), reportaron que los estrógenos producen liberación de LH por la hipófisis de ratas impúberes, este efecto no fue observado por la administración de andrógenos. Posteriormente Corbin y Daniels (1969), usando las mismas dosis de estos esteroides y el mismo tipo de tratamiento encontraron que los estrógenos producían un avance en la liberación de FSH y de FSH-RH en ratas hembras, sin embargo los andrógenos no producían estos efectos. Aunque esto habla en contra de que los andrógenos tengan una acción de feedback positivo sobre la FSH y la LH, existen trabajos que sugieren que estos estimulan la secreción de gonadotropinas hipofisarias y que este efecto es encontrado al utilizar pequeñas dosis (0.1 mg) de PT (Zarrow y cols., 1969 y Naqvi y Johnson, 1969). Nuestros resultados concuerdan con estos últimos planteamientos, indicándonos que el PT, a una determinada concentración en sangre, en un animal preparado físicamente ejerce un efecto estimulante en la rata hembra impúber sobre la liberación de FSH.

Everett, (1961), planteó que el efecto del Benzoato de Estradiol en producir desarrollo folicular en los ovarios de animales impúberes es producto de la LH fundamentalmente. Sin embargo Greep, (1961), concluyó que la respuesta vista era debida primariamente a la FSH. Posteriormente Critchlow y Bar-Sela, (1967), sugieren que la pubertad puede ser iniciada por la liberación de FSH, permitiendo la liberación de LH. Aún más, Odeel y cols. (1973), postulan que en la rata macho la FSH induce un aumento en la sensibilidad de los órganos efectores a la LH, así pues durante la maduración sexual la respuesta gonadal a la LH cambia por la continuada estimulación de la FSH.

Sobre esta base podríamos plantear que la pubertad precoz observada ante el tratamiento con PT por Salmon (1938), Clausen y Freundenberger, (1939), y por Zarrow y cols., (1969), podrá ser la consecuencia del incremento en la secreción de FSH endógena.

REFERENCIAS

- CLAUSEN F.W. AND FREUNDERBERGER C.B. A comparison of the effects of male and female sex hormones on immature female rats. *Endocrinology* 25, 585, 1939.
- CORBIN A. AND DANIELS E.L. Induction of puberty in immature female rat: Effect of estrogen on pituitary FSH and stalk median eminence FSH realising factor. *Neuroendocrinology* 4, 65, 1969.

- CRITCHLOW V. AND BAR SELA M.E. Control of the onset of puberty. In Neuroendocrinology (eds. I. Martini and W.F. Gonong) Academic Press, New York, Vol. 1, 565, 1967.
- EVERETT J.W. Central neural control of reproductive functions of the adeno-hypophysis. *Physiol Rev.* 44, 373, 1961.
- GREEP R.O. Physiology of the anterior hypophysis in relation to reproduction. In "Sex and Internal Secretions" (ed. W. C. Young) ed. 3a. Vol. I, 240-301, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1961.
- JOHNSON D.C. AND NAOVI R.H. A positive feedback action of androgen on pituitary follicle stimulating hormone: induction of a cyclic phenomenon. *Endocrinology* 85, 881, 1969.
- KORENCHESKY V. Cng, d Vitamin A Hormon Forsch 2: 418, 1939. Citado por Selye y Friedman (1940).
- LORAIN J.A. General principles in hormone assay: Clinical application of Hormone Assay (ed. Loraine) E. & S. Ltd. Edimburg and London, 1, 14, 1958.
- NAOVI R.H. AND JOHNSON D.C. Increased production of FSH in immature female rats by a single injection of androgen or estrogen. *J. Endocrinology*, 45, 29, 1969.
- ODEEL W.D. Swerdloff R.S., Jacobs and Hescox M.A. FSH induction of sensitivity to LH: One cause of sexual naturation in the male rat, *Endocrinology* 92, 160, 1973.
- PELLETIER J. Influence du photoperiodisme et des androgènes sur la synthese et la liberation de LH chez le belier. These Doctorat Sciences, Paris 1971.
- PRICE D. AND ORTIZ E. The relation of age to reactivity in the reproductive system of the rat. *Endocrinology*, 34, 215, 1944.
- RAMÍREZ V.D. AND SAWYER C.H. Advancement of puberty in the genital tract of the immature female rat. *Endocrinology*, 23, 779, 1938.
- SALMON U. J. Gonadotropic effect of androgens upon the immature rat ovary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38, 352, 1938.
- SELYE H. AND FRIEDMAN S.M. The action of various steroid hormones on the ovary. *Endocrinology*, 27, 857, 1940.
- SHIINO M. AND RENNEL E.G. Pituitary FSH in vivo and ovarian development in the infant rat, *Endocrinology*, 81, 1379, 1967.
- STEELMAN S.L. AND POHLEY F.M. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin, *Endocrinology*, 53, 604, 1953.
- ZARROW M.X., NAOVI R. H. AND DENEMBERG V. H. Androgen induces precocious puberty in the female rat and its inhibition by hippocampal lesions. *Endocrinology*, 81, 14, 1969.