

02466

5  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Identificación y Origen del Polimorfismo  
Genético de Receptores Extracelulares  
de las Hormonas Esteroides.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

**PRESENTA  
ROSA MARIA OLIART ROS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1992.**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

RESÚMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	7
OBJETIVO .....	41
MATERIAL Y MÉTODOS .....	43
Material .....	44
Métodos .....	46
1)- Preparación de las Muestras de Suero .....	46
2)- Desarrollo de Sistemas de Unión para la Determinación y Cuantificación de la hSHBG .....	48
3)- Isoelectroenfoque.....	49
4)- Inmunotransferencia.....	51
5)- Análisis de las Muestras de Suero de la Población.....	52

6)- Estudio Familiar .....	54
7)- Propiedades Fisicoquímicas de las Variantes de la hSHBG .....	54
8)- Análisis de las Muestras por Medio de SS-PAGE y Gráficas de Ferguson .....	56
9)- Métodos Estadísticos .....	57
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
1)- Isoelectroenfoque en Tubo .....	59
2)- Isoelectroenfoque en Placa e Inmunotransferencia .....	64
3)- Estudio Familiar .....	67
4)- Propiedades Fisicoquímicas de las Variantes de la hSHBG .....	74
5)- Análisis de las Muestras por Medio de SS-PAGE y Gráficas de Ferguson .....	77
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>110</b>

## RESÚMEN

## RESÚMEN

La Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales (SHBG) es una glicoproteína dimérica, del grupo de las  $\beta$ -globulinas, que es sintetizada en el hígado y secretada a la circulación general, en donde une y transporta a las hormonas esteroides testosterona y estradiol. Esta proteína ha sido purificada a partir de suero de mujeres embarazadas, y sus características fisicoquímicas y funcionales han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, queda aún mucho que estudiar para comprender el significado biológico completo de la SHBG, ya que se le ha asignado más de una función biológica importante dentro de la fisiología de las hormonas sexuales, como son la de transporte y protección de las hormonas esteroides, amortiguador de las concentraciones de hormona libre en el plasma, agente regulador del balance andrógenos-estrógenos, vector diferencial de las hormonas testosterona y estradiol en los diferentes órganos y tejidos, transportador específico de dichas hormonas a sus células blanco vía un receptor específico de membrana, y alguna función biológica independiente de las hormonas esteroides pero influenciada por éstos.

Actualmente se llevan a cabo múltiples estudios para profundizar en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la hSHBG utilizando diferentes enfoques, como los análisis de sus homologías con otras proteínas de función conocida, los estudios clínicos en los que se asocia alguna patología con cambios en la estructura ó concentración de la hSHBG, ó los estudios a nivel de biología molecular con los cDNAs de la hSHBG. En el presente trabajo, la herramienta que se utilizó para ampliar el conocimiento sobre la hSHBG fue el estudio de mutaciones ó variantes genéticas en dicha molécula.

La existencia de polimorfismo genético en las proteínas es un fenómeno ampliamente distribuido en los seres vivos, encontrándose en los seres humanos gran cantidad de ejemplos, como los polimorfismos encontrados en el sistema de antígenos de histocompatibilidad (HLA), en los grupos sanguíneos ABO, en el sistema Rh de la sangre, en los sistemas enzimáticos (isoenzimas), así como en algunas proteínas transportadoras, como la Globulina Transportadora de Corticoesteroides (CBG), y la Globulina Transportadora de Tiroxina (TBG).

El objetivo del presente trabajo fue el establecimiento de la existencia de polimorfismo genético de la molécula de la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales en el suero de una muestra representativa de la población mexicana, desde el punto de vista de sus propiedades de carga en un sistema de isoelectroenfoque, así como las bases de su transmisión genética y sus repercusiones en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la hSHBG.

La búsqueda de las variantes genéticas se llevó a cabo mediante el sometimiento de las muestras de suero desializadas a un sistema de

isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en tubo y en placa. Por medio del sistema de isoelectroenfoque en tubo fueron analizadas 250 muestras de suero de individuos adultos mexicanos de ambos sexos, sometidas previamente a un tratamiento con neuraminidasa con el objeto de eliminar los residuos de ácido siálico de la molécula de la hSHBG. Sin embargo, por medio de esta metodología no fue posible demostrar la existencia de variantes genéticas en el punto isoelectrónico de la hSHBG, por lo que se utilizó el sistema de isoelectroenfoque en placa seguido de inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa.

Por medio del isoelectroenfoque en placa fueron analizados 110 sueros de individuos adultos mexicanos correspondientes a 55 matrimonios, también previamente tratados con neuraminidasa, y en este caso se pudieron detectar dos fenotipos diferentes en el patrón de bandas de la hSHBG: uno que fue denominado silvestre, encontrado en el 95.45% de los casos, caracterizado por la presencia de dos bandas de inmunotinción claras y bien definidas, con puntos isoelectrónicos de 6.50 y 6.63, y el otro, denominado variante, encontrado en el 4.55% de los casos, presentando un patrón de 4 bandas con puntos isoelectrónicos de 6.50, 6.63, 6.70 y 6.76.

Estos patrones de bandas se encontraron genéticamente determinados, ya que se encontraron también en la descendencia de 4 matrimonios estudiados, 2 de ellos en los que un miembro de la pareja presentó el patrón variante de 4 bandas, y 2 de ellos en los que ambos padres presentaron el patrón silvestre. Cabe señalar que el patrón variante sólo se encontró en los descendientes de sujetos con este mismo patrón, nunca en los de matrimonios con fenotipo silvestre.



Al analizar los resultados desde el punto de vista genético, se pudo sugerir que la hSHBG se encuentra codificada por un gen autosómico constituido por dos alelos codominantes, que fueron denominados  $G^S$  y  $G^H$ . El alelo  $G^S$  codificaría para las dos bandas con puntos isoeléctricos de 6.50 y 6.63, y el alelo  $G^H$ , para las dos bandas con puntos isoeléctricos de 6.70 y 6.76. De esta manera, el fenotipo silvestre representaría al genotipo  $G^S G^S$ , y el fenotipo variante estaría codificado por el genotipo  $G^S G^H$ . Existiría entonces un tercer genotipo  $G^H G^H$ , cuyo fenotipo correspondería a las dos bandas más básicas únicamente, pero desafortunadamente no fue encontrado en la población estudiada.

Fueron calculadas las frecuencias génicas para cada uno de los alelos, así como las frecuencias observadas y esperadas para cada uno de los fenotipos de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg. Al comparar los resultados por medio de una prueba de  $\chi^2$ , se encontró que la población estudiada se encuentra en equilibrio génico, ya que las frecuencias observadas concordaron con las esperadas, con una  $p > 0.8 < 0.9$ .

Por otra parte, se midieron las constantes fisicoquímicas (constante de afinidad, constante de disociación, velocidad de disociación y tiempo medio de disociación) así como las concentraciones circulantes de la hSHBG en sujetos con el fenotipo silvestre y con el fenotipo variante, y en ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los valores encontrados para cada uno de los fenotipos. Estos resultados permitieron sugerir que, aparentemente, el cambio en la molécula de la hSHBG del fenotipo variante no afecta el funcionamiento de la molécula, por lo que se podría decir que se trata de un cambio neutro desde el punto de vista de la eficacia biológica de la hSHBG.

Las muestras de suero con fenotipo silvestre y variante fueron también sometidas a análisis por medio del sistema de SS-PAGE (Steady-State Polyacrylamide Gel Electrophoresis) y de gráficas de Ferguson, y en ambos casos pudo observarse que la molécula de la hSHBG desializada de fenotipo variante posee una carga diferente de la de fenotipo silvestre.

En conclusión, en el presente trabajo se demostró la existencia de polimorfismo genético en la molécula de la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales humana en la población mexicana, el cual, aparentemente, no se acompaña de alteraciones en las características de unión a andrógenos de la hSHBG ni en sus concentraciones circulantes. Además, se sugirió que la molécula de la hSHBG está codificada por un gen seguramente autosómico constituido por dos alelos codominantes.

Finalmente, en este trabajo se propuso que la existencia de variantes genéticas de la hSHBG se debe muy probablemente a una mutación ocurrida en el gen que codifica para dicha proteína (originando al alelo  $G^H$ ) lo que provoca la sustitución de un aminoácido cargado de la cadena polipeptídica de la molécula, y que es responsable de la aparición de las dos bandas adicionales en el fenotipo variante.

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroides son moléculas de naturaleza lipofílica que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en el reino animal como en el vegetal, en donde llevan a cabo diversas e importantes funciones.

Estas hormonas son sintetizadas en las células esteroideogénicas que, generalmente, se encuentran apartadas de sus células blanco, por lo que las hormonas esteroides deben ser transportadas a través de la circulación para poder llevar a cabo su función biológica. Existen en el torrente circulatorio moléculas proteicas específicas que son las encargadas de favorecer la solubilidad de las hormonas esteroides en fluidos biológicos, facilitando así su transporte hasta las células blanco (1).

Los primeros reportes acerca de estas moléculas datan de 1926, cuando Benhold (2) describió que algunos componentes de la sangre de bajo peso molecular, como lípidos, ácidos biliares, hormonas esteroides, algunas drogas,

bilirrubina y colorantes son transportados por la circulación unidos a proteínas plasmáticas. La mayor parte de este transporte es llevado a cabo por la albúmina, que posee una gran capacidad de adsorción debido a su superficie polivalente, y una capacidad de unión casi ilimitada, ya que una sola molécula de albúmina puede unir varios ligandos de bajo peso molecular simultáneamente. Sin embargo, a excepción de los ácidos grasos y la bilirrubina (3), la mayoría de los ligandos poseen una baja afinidad por los sitios de unión de la albúmina, por lo que la unión a ésta resulta ser débil y poco específica.

Por otro lado, el plasma contiene también otras proteínas que, a diferencia de la albúmina, se encuentran en bajas concentraciones y poseen un sólo sitio de unión específico y de alta afinidad por sus ligandos (4). La primera de ellas en ser descrita fue la Globulina Transportadora de Hormonas Tiroideas (THBG), por Gordon y colaboradores en 1952 (5), y a partir de entonces se han descrito una gran variedad de proteínas transportadoras plasmáticas, como la Globulina Transportadora de Corticosteroides (CBG) ó Transcortina, descrita por Daughaday en 1956 (6) y Bush en 1957 (7) y que posee una alta afinidad por corticosteroides y progesterona, y la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales (SHBG), que une con alta afinidad estradiol y testosterona.

La existencia de una proteína plasmática con capacidad de unir testosterona fue descrita primeramente en 1958 por Daughaday a partir de sus experimentos con plasma humano (8), y finalmente confirmada en 1966 por Mercier-Bodard y colaboradores (9) gracias a la separación electroforética de una  $\beta$ -globulina con capacidad de unión a testosterona diferente de la albúmina y de la CBG.

Investigaciones posteriores indicaron que esta proteína une también estrógenos, aunque con una menor afinidad (10,11), que es diferente a la CBG (12), y que presenta una mayor afinidad por la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona que por la testosterona (13,14). Como consecuencia, esta proteína ha sido denominada con varios nombres, como  $\beta$ -Globulina Transportadora de Esteroides (SB $\beta$ C), Globulina Transportadora de Testosterona y Estradiol (TeBG), Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales (SHBG) y Proteína Transportadora de Esteroides (SBP).

### **Purificación, Propiedades Moleculares y Composición.**

Debido a que las mayores concentraciones de la SHBG se encuentran normalmente en la circulación de mujeres embarazadas, el plasma de éstas es el material del que generalmente se parte para purificarla, aunque también se ha utilizado la fracción IV de Cohn del suero, el suero de mono, conejo, mandril (15), bovinos y bisonte (16).

Se han utilizado diferentes métodos para la purificación de la SHBG, todos ellos basados en sus propiedades de unión a andrógenos, con el objeto de mantener la capacidad de la SHBG de unir esteroides (17). Algunos de ellos son la precipitación con sulfato de amonio seguida de filtración en gel, isoelectroenfoque y cromatografía de afinidad con el andrógeno conjugado (18), ó electroforesis en geles preparativos (19), cromatografía de afinidad y filtración en gel (20), y más recientemente, métodos basados en la utilización de anticuerpos monoclonales (21).

La SHBG ha podido ser purificada hasta una aparente homogeneidad (18,22,23,24), y se han hecho múltiples estudios para conocer su estructura y propiedades moleculares. Se sabe con exactitud que se trata de una glicoproteína dimérica, del grupo de las  $\beta$ -globulinas (16,25,26,27), que posee un sólo sitio de unión al esteroide por molécula (28). El peso molecular de la molécula completa varía de 72,950 d en el conejo (23), hasta 98,000-115,000 d en el humano (29), dependiendo los valores exactos del método utilizado para su determinación.

Varios estudios han demostrado que, después del análisis electroforético bajo condiciones desnaturizantes, la molécula de la SHBG se disocia en dos subunidades, una pesada y una ligera de 52,000 y 48,000 d, respectivamente, y que se encuentran asociadas en diferentes proporciones (25,26,27). Esta heterogeneidad de tamaño de la SHBG es notablemente similar a la observada en otras proteínas extracelulares que unen andrógenos, como la Proteína Transportadora de Andrógenos (ABP) de la rata (30,31,32) y del conejo (33).

Aunque algunos autores han propuesto que las dos subunidades en que se disocia la molécula de SHBG son dos protómeros diferentes (15,26,34,35), estudios recientes de secuenciación de aminoácidos (26,36,37,38) y con el cDNA de la SHBG (39,40) señalan que las secuencias primarias de las dos subunidades son idénticas (26,36,38,41,42).

La heterogeneidad de las subunidades de la molécula de la SHBG encontrada en geles desnaturizantes de poliacrilamida desaparece con la eliminación total de los carbohidratos presentes en la molécula (41), por lo que se ha sugerido que la existencia de las dos subunidades de distinto peso molecular

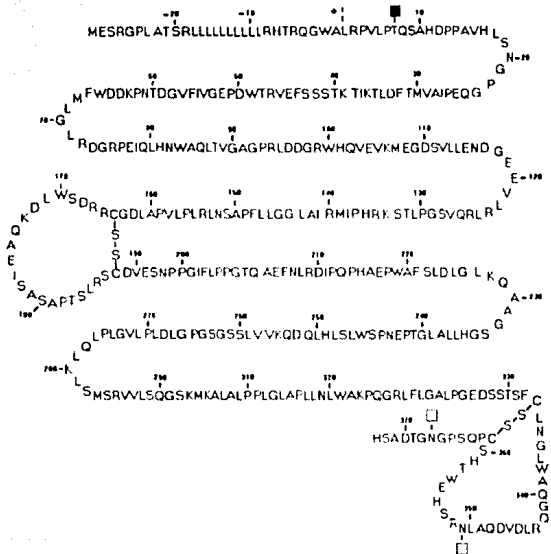
de la SHBG se debe a que presentan diferencias en las cadenas de oligosacáridos unidas a éstas (26,38). Sin embargo, aun no ha sido esclarecida la razón funcional de la existencia de estas diferencias entre las subunidades.

Como se señaló anteriormente, preparaciones de elevada pureza de la SHBG han sido sometidas al análisis de su secuencia de aminoácidos y a otros estudios químicos directos, y se ha encontrado que cada una de sus subunidades está compuesta por 373 aminoácidos, dando un peso molecular aproximado de 40,000 d, y que presenta dos puentes disulfuro y tres cadenas de oligosacáridos en su estructura. La secuencia de aminoácidos encontrada está representada en la Figura I.

Una de las tres cadenas de oligosacáridos de la molécula de la SHBG se encuentra unida al grupo hidroxilo de la treonina que se encuentra en posición 7 (O-linked), y las otras dos están unidos al nitrógeno amídico de una aspargina en posición 351 y de una aspargina en posición 367 (N-linked) (36,43).

Estudios detallados del contenido de carbohidratos de la SHBG han revelado una heterogeneidad considerable en el contenido de residuos de ácido siálico y fucosa de diferentes preparaciones, y se han reportado diversas proporciones de éstos en la molécula, como 34.4% (20), 32.1% (18), 18% (19), 7.7% (26), 11-12% (30,43), 14% (40), 20-30% (44). Entre los azúcares que componen las cadenas de oligosacáridos de la SHBG se encuentran la fucosa, manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilactosamina, ácido siálico, siendo éste último el que se encuentra en una mayor proporción (un tercio de los carbohidratos totales) (34). Los dos puentes disulfuro se encuentran





**Figura I.**-Estructura primaria del precursor de la SHBG humana. Los sitios de unión de las cadenas de oligosacáridos se encuentran señalados por cuadrados, indicando el negro la cadena unida por un enlace glucosídico a la treonina, y los blancos, las cadenas unidas por un enlace glucosilamina a la asparagina. El péptido señal está constituido por 29 aminoácidos al inicio de la figura.

formados entre los residuos de cisteína en posición 332-360 y 163-187, formando dos estructuras en forma de asa (36) (Figura 1).

La diferente glicosilación de las subunidades de la molécula de la SHBG ocasiona su estructura dimérica así como la presencia de microheterogeneidad por carga. Cuando la SHBG se analiza por técnicas de isoelectroenfoque se observa una serie de bandas (desde 3 hasta 7, según los diferentes autores) localizadas en un rango de pH entre 5 y 6 aproximadamente (26,34,41,59). La microheterogeneidad por carga de la molécula de la SHBG parece estar relacionada con la presencia de cantidades variables de residuos de ácido siálico en ella, ya que su eliminación por medio del tratamiento con neuraminidasa y/o una combinación de N- y O- glicosidasas reduce notablemente el número de bandas que se observan en el isoelectroenfoque e invariablemente provoca un cambio en su punto isoelectroenfoque a valores más básicos (15,26,34,41,50). Sin embargo, aún después de una aparente desglicosilación total de la molécula, se siguen detectando variantes de pH cuyo origen aún no ha sido identificado (41).

Las variaciones en la composición de carbohidratos de la SHBG intra e inter individuos sugiere la existencia de grupos de moléculas de la SHBG con carbohidratos específicos que sean funcionalmente importantes y/o reflejen diferencias en el estatus fisiológico (17). Sin embargo, aún se sabe muy poco acerca de la importancia de los carbohidratos para la actividad funcional ó el metabolismo de la SHBG. Algunos autores (44,51) han encontrado que la eliminación de residuos de ácido siálico de la molécula no afecta a los determinantes antigénicos ni al sitio activo de unión a esteroides, ya que la SHBG desializada mantiene su capacidad para unir tanto anticuerpos específicos como a la testosterona (34,50).

Sin embargo, la eliminación del ácido siálico de la molécula de la SHBG aumenta su captación y su catabolismo por el hígado y, por consiguiente, el del esteroide unido a ella. Este fenómeno ha sido descrito para otras proteínas, como las gonadotropinas, inmunoglobulinas, haptoglobina (52), pero el significado biológico de este fenómeno aún no se conoce, ya que las glicoproteínas existen normalmente en la circulación en su forma sializada.

Por otro lado, los carbohidratos participan de manera importante en las interacciones de las hormonas con las células blanco, por lo que es posible que influyan de alguna manera en la unión de la SHBG a sus receptores específicos de membrana, que han sido recientemente identificados (53,54) y caracterizados (55,56).

Los últimos 35 aminoácidos del extremo carboxilo terminal son predominantemente hidrofílicos, además de que posee las dos cadenas de oligosacáridos, por lo que seguramente forma parte de la superficie de la molécula. La región del extremo amino terminal es también hidrofílica, pero en un menor grado, sobre todo debido a la presencia de la cadena de oligosacáridos del residuo Thr-7 (36).

La molécula de la SHBG posee tres zonas marcadamente hidrofóbicas, de 9 a 13 aminoácidos cada una, entre los residuos 141-149, 269-277 y 298-311, compuestas en un 50% por residuos de leucina. Entre los residuos 267 y 281 se encuentra un patrón poco usual de residuos de leucina alternados LDLPVLGIPLQKL (Figura 1), que provoca que entre los residuos 269 a 275 se forme una estructura  $\beta$  plegada con cuatro residuos de leucina en uno de sus lados,

y entre los residuos 277 a 290, un segmento de  $\alpha$  hélice con tres residuos de leucina en una de las caras de la hélice. Esta estructura tiene el potencial de formar un "sandwich de esteroide", por lo que podría ser un buen candidato para el sitio de unión de la proteína al esteroide (36).

En realidad se sabe muy poco acerca de la composición molecular del sitio de unión al esteroide ó de cómo se forma por la asociación de las dos subunidades. Se han hecho varios estudios de localización con fragmentos de péptidos fotomarcados. Algunos autores han identificado (39,45) los residuos marcados en una región cercana al extremo carboxilo terminal, mientras otros señalan a la Met-139 como el residuo fotomarcado (46). Aunque la razón de esta discrepancia aún no se conoce, se puede argumentar que es posible que la región de unión al esteroide involucre interacciones de varias regiones de una ó ambas subunidades (17).

Además de unir esteroides, la SHBG interactúa con receptores específicos en la membrana plasmática de las células blanco. A este respecto, la SHBG se comporta como una proteína alostérica, ya que la unión de la proteína a un esteroide inhibe la unión de ésta a su receptor. Si la SHBG no unida se une a su receptor y después se une a ella el esteroide apropiado, se produce la activación de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento del AMPc intracelular (47,48). Estos resultados señalan la presencia de una región dentro de la molécula de la SHBG específica y única para su unión al receptor. Recientemente, Khan y colaboradores (49) identificaron esta región en la porción amino terminal de la molécula, del aminoácido 48 al 57, región que es predominantemente hidrofílica y se encuentra en la parte exterior de la molécula.

Es interesante observar que esta región se encuentra altamente conservada en la SHBG humana, la SHBG de conejo, la ABP de la rata y la protefna S del humano y del bovino.

### **Especificidad y Características Físicoquímicas.**

La SHBG en el humano fue descubierta debido a su doble afinidad por testosterona y estradiol; sin embargo, existen grandes variaciones en las características de unión a esteroides entre las diferentes especies (57). En la mayoría de los mamíferos, la SHBG une preferentemente andrógenos, pero en primates y en murciélagos, posee un sitio único de alta afinidad para andrógenos y estrógenos biológicamente activos (17). En general, entre los andrógenos existe una aparente relación entre la actividad biológica in vivo y su habilidad para unirse a la SHBG, de manera que los andrógenos con mayor potencia biológica se unen más eficientemente a la SHBG que los de menor actividad (63). A este respecto, Petra y colaboradores estudiaron, para el caso del humano y del conejo, las características físicoquímicas y de unión de la SHBG por diferentes esteroides, encontrando el siguiente patrón de afinidad: DHT > Testosterona > 17 $\beta$ estradiol > Progesterona.

En diversos estudios relacionados con la afinidad de varios esteroides a la SHBG (58-62) se ha encontrado que une pobremente a pregnanos y corticoides, y que su afinidad por androstanos y estranos depende de su estructura (1). La afinidad relativa de algunos esteroides por la SHBG se encuentra resumida en la Tabla I.

COMPUESTO	AFINIDAD RELATIVA*
Testosterona	100
5 $\alpha$ -dihidrotestosterona	240
5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	141
5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	98
17 $\beta$ -estradiol	28
Progesterona	5
17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-4-androsten-3-ona	65
19-nortestosterona	18
17 $\alpha$ -hidroxiandrost-4-en-3-ona	5
6 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona	189
7 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -hidroxiandrost-4-en-3-ona	100
6 $\beta$ -metil-17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona	48
17 $\alpha$ -etil-17 $\beta$ -hidroxi- $\Delta^4$ -androsten-3-ona	46
9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi- $\Delta^4$ -androsten-3-ona	28

\*valores obtenidos con el método de carbón-dextrán.

**Tabla I.- Afinidad Relativa de Algunos Esteroides por la SHBG (1).**

La unión de esteroides a la SHBG se ve afectada por cambios en la estructura del anillo A y D; en particular, se ha encontrado que el anillo A planar y el grupo  $17\beta$ hidroxilo del anillo D son necesarios para la unión (63). Cunningham y colaboradores (58) estudiaron cerca de 200 esteroides de diversa estructura analizando los cambios en la afinidad causados por la adición de diferentes grupos funcionales en varias posiciones de la molécula del esteroide, encontrando que algunos cambios, como la reducción  $D^4$  en posición  $5\beta$  del doble enlace, la presencia de grupos  $10\beta$ -metil ó grupos  $17\beta$ -etnil, aumentan su afinidad por la SHBG. Sustituciones alquilo en los carbonos C2, C6, C7 y  $C17\beta$  frecuentemente reducen su afinidad por la SHBG, y sustituciones polares, como halógenos en el C2 y/o grupos hidroxil en el C11, invariablemente disminuyen su afinidad. Sin embargo, la reducción del grupo 3-cetona a  $3\beta$ - hidroxil no la afecta.

Se ha encontrado también que para obtener una unión de alta afinidad es necesaria la presencia de un grupo  $17\beta$ - hidroxilo libre en esteroides C18 ó C19, y una orientación planar trans entre los anillos A y B del esteroide (57). De acuerdo con estos datos se ha propuesto que la cara  $\beta$  del esteroide interactúa eficientemente con el sitio activo de la SHBG, con fuertes atracciones por el C3 y  $C17\beta$ .

Las características fisicoquímicas de la SHBG humana se muestran en la Tabla II.

Peso Molecular	90,000-120,000 d
Stokes Radius	38-41.5 Å
Radio Molecular	2-3 nm
Actividad Específica de Unión	12.9 ± 1.8 nmol/mg de proteína
Constante de Disociación Aparente	1.94 ± 0.95 x 10 <sup>-9</sup> M
Constantes de Afinidad a 37°C	0.99 x 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> para 5αDHT
	0.35 x 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> para testosterona
	0.22 x 10 <sup>9</sup> M <sup>-1</sup> para estradiol
Temperatura de Máxima Afinidad	4°C
Punto Isoeléctrico	5-6
Vida Media	5 días
Temperatura de Desnaturalización	60°C
pH Óptimo de Unión al Esteroide	5-10

**Tabla II.-** Características físicoquímicas de la SHBG Humana.



## **Síntesis y Localización Cromosómica del Gen para la SHBG.**

Aunque desde su descubrimiento se pensó que la SHBG era sintetizada por el hígado, no fue comprobado sino hasta varios años después cuando Khan y colaboradores (64) describieron la síntesis y secreción de la SHBG por la línea de células hepáticas humanas transformadas HepG2. Esto ha sido corroborado recientemente con la obtención de los cDNAs que codifican para la molécula de la SHBG a partir de bancos de cDNAs de hígado humano (39,40,65).

Recientemente, Bérube y colaboradores (66) hicieron un estudio de hibridación de cromosomas metafásicos humanos *in situ* con una sonda de cDNA para la SHBG, y encontraron que el gen que codifica para la molécula de la SHBG se localiza en el brazo corto del cromosoma 17.

## **Ontogenia y Regulación Hormonal.**

La ontogenia de la SHBG humana ha sido ampliamente estudiada. Se sabe que en el recién nacido se encuentran niveles bajos de esta proteína (aproximadamente la mitad que en el adulto), seguidos por un incremento hasta niveles relativamente altos en ambos sexos durante la infancia (67). En la pubertad, los niveles de la SHBG disminuyen, sobre todo en los varones, seguramente debido a la influencia que los andrógenos testiculares tienen sobre la síntesis de la SHBG (63). En las mujeres adultas, las concentraciones de la SHBG son de casi el doble que en los varones, varían poco durante el ciclo menstrual y aumentan

notablemente durante el embarazo (62). En la menopausia, las concentraciones de la SHBG disminuyen hasta los niveles encontrados en los varones de la misma edad (4).

Es importante señalar que la SHBG ha sido detectada también en suero fetal masculino, femenino y en líquido amniótico (68,69,70,71), por lo que se puede suponer que juega un papel importante durante el desarrollo fetal.

Existen en la literatura gran cantidad de informes acerca de la influencia de diversas sustancias sobre las concentraciones plasmáticas de la SHBG. Estos datos se encuentran resumidos en la Tabla III.

### **Métodos de Cuantificación y Concentraciones Circulantes.**

A partir de la descripción de la existencia de la SHBG en el suero se han realizado múltiples estudios acerca de la estructura y función de esta proteína, llevando consigo el desarrollo de varias técnicas para su cuantificación. Los 2 métodos más ampliamente utilizados son:

a).- El análisis de saturación de sitios específicos de unión de la SHBG con 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona ó testosterona marcadas radiactivamente, seguido de la separación y medida del esteroide específicamente unido. Debido a que la SHBG posee un sólo sitio de unión por molécula, la concentración del esteroide específicamente unido es igual al de la SHBG, en condiciones de saturación, lo que se logra utilizando un exceso de la hormona marcada. Este exceso debe

**Aumentan la SHBG:**

Incrementos de hormonas tiroideas

Incrementos de estrógenos:

Embarazo

Fase lútea del ciclo menstrual

Estrógenos exógenos

Cirrosis hepática

Fenitoína (Dilantina)

Tamoxifén

Estrés prolongado

Carcinoma de próstata

Anorexia nervosa

Envejecimiento en los varones

Pubertad retardada en niños

Hipogonadismo en varones

Ginecomastia

Síndrome de feminización testicular

Síndrome de Turner

Enfermedad hepática crónica

Fallo renal crónico

**Disminuyen la SHBG:**

Obesidad

Síndromes de androgenización en mujeres (PCOS, hirsutismo, acné)

Testosterona exógena en varones normales e hipogonádicos

Hiperprolactinemia

Incrementos de la hormona de crecimiento

Menopausia

Agentes progestacionales

Danazol

Glucocorticoides

Acromegalia

Síndrome de Cushing

Síndrome nefrótico

Agamaglobulinemia

**Tabla III.- Factores que Afectan las Concentraciones Plasmáticas de la SHBG (29, 55, 72-74).**

entonces ser separado del complejo proteína esteroide, para lo cual se han utilizado varios métodos, como filtración en gel, adsorción con carbón-dextrán, electroforesis en agarosa ó acrilamida, precipitación con sulfato de amonio, unión a concanavalina-A, cromatografía con DEAE celulosa, gradientes de sacarosa y diálisis al equilibrio y de flujo (4,75).

Cuando estos procedimientos se utilizan para determinar las concentraciones molares de los sitios de unión se obtienen valores fácilmente reproducibles, pero se encuentran grandes variaciones en éstos entre los diferentes análisis (en un rango de 2 a 3 veces). Esto puede deberse a diversas causas, como a las diferentes sensibilidades de cada uno de los análisis, la falta de estandarización con la SHBG pura, la inadecuada corrección con la unión no específica y a otras proteínas transportadoras, y varias razones técnicas que tienen que ver con los métodos usados para la separación del esteroide no unido (75).

b).- El radioinmunoensayo, con el que se valora la concentración de la SHBG por medio de la competencia de una cantidad constante de proteína marcada radiactivamente con cantidades variables de la misma proteína no marcada por los sitios de unión de un anticuerpo específico. En este caso, la separación de la proteína unida de la libre se lleva a cabo mediante la precipitación del complejo proteína-anticuerpo con un segundo anticuerpo específico contra el primero. Utilizando esta técnica se han obtenido valores discrepantes entre los diferentes autores, seguramente por problemas técnicos en la estandarización del método. Sin embargo, puede considerarse como el método más aconsejable para la cuantificación de la SHBG ya que presenta alta sensibilidad y especificidad, conjuntamente con uniones no específicas bajas (75). Esto ha

permitido la detección de la hSHBG en varios flúidos corporales en donde las concentraciones de la proteína son mucho más bajas que las que se encuentran en el suero ó en el plasma, como en líquido amniótico, flúido folicular ovárico, flúido mamario y saliva (76).

En la tabla IV se muestran las concentraciones plasmáticas de la SHBG obtenidas por medio de radioinmunoensayo en plasma de hombres normales, mujeres normales y mujeres embarazadas (75).

### **Distribución en los Vertebrados.**

Hasta el momento se han hecho pocos estudios acerca de la distribución de la SHBG en las especies animales (1,71,77,78). Concretamente, estos trabajos se han centrado en la búsqueda de la existencia de la molécula de la SHBG en especies de vertebrados, y ha sido encontrada en primates (humanos, monos), lagomorfos (conejos), carnívoros (perros, gatos), artiodáctilos (cabras, ovejas, bovinos), reptiles (víboras), anfibios (ranas, ajolotes, salamandras), peces (carpas), rayas, pleurodelos y lampreas. Sin embargo, no se ha detectado en aves, burros ni en roedores (ratas, ratones, hamsters, cobayos).

Aparentemente, la SHBG es una molécula que ha sufrido poca presión de selección a lo largo de la evolución de los vertebrados, ya que, aunque en todas las especies estudiadas se trata de una glicoproteína grande ( de 80,000 a 90,000 d de peso molecular) constituida por subunidades y que presenta una mayor afinidad por andrógenos que por estrógenos, las afinidades de las SHBGs de los diferentes grupos por dichos esteroides varían dentro de un rango bastante amplio.

Sujetos	SHBG (pmol/ml)		n
	X ± DE	Rango	
Hombres	18 ± 9	9-38	12
Mujeres	54 ± 13	39-77	8
<b>Mujeres embarazadas</b>			
10-15 semanas	115 ± 48	52-168	4
20-25 semanas	212 ± 35	172-259	4
35-40 semanas	374 ± 55	322-456	6

**Tabla IV.-** Concentraciones Plasmáticas de la SHBG en Hombres Normales, Mujeres Normales y Mujeres Embarazadas Obtenidas por Radioinmunoensayo (75).

Por ejemplo, en los humanos y otros primates, la SHBG une a andrógenos y estrógenos, mientras que en otros animales, como en los perros, gatos y conejos, une principalmente a andrógenos (76). Además, comparten pocas determinantes antigénicas, ya que, por ejemplo, los anticuerpos generados contra la SHBG humana reaccionan contra otras SHBGs de primates, pero no contra las de perros, gatos, ovejas, cabras ó vacas (71).

### **Homologías con Otras Proteínas.**

La secuencia de aminoácidos de la molécula de la SHBG ha sido comparada con la de otras proteínas, y se ha encontrado que presenta un 68% de homología con la secuencia de la Proteína Transportadora de Andrógenos (ABP) (79). Ha sido sugerido incluso que la SHBG y la ABP son productos de un mismo gen.

Por otro lado, la molécula de la SHBG presenta un grado de homología limitado con la porción carboxilo terminal (residuos 249-635) de la proteína S humana y bovina (80). La proteína S es una proteína dependiente de la vitamina K que interactúa a manera de cofactor con la proteína C activada en la regulación de la coagulación sanguínea (81). Es por demás interesante que la SHBG y la proteína S estén estructuralmente relacionadas, especialmente por la conexión que existe entre los esteroides sexuales y los desórdenes de la coagulación sanguínea, como la trombosis y la arterioesclerosis (82). Por otra parte, no se ha encontrado ninguna homología en la secuencia de aminoácidos de la SHBG con respecto a la de la Globulina Transportadora de Corticosteroides humana, al receptor de estrógenos y glucocorticoides, a la albúmina, a la proteína transportadora de la

vitamina D, y a la  $\alpha$ -fetoproteína, lo que permite concluir que las proteínas transportadoras de esteroides extracelulares (SHBG y ABP) no están filogenéticamente relacionadas con este tipo de moléculas y que pertenecen a un grupo de proteínas con funciones y orígenes completamente diferentes (79).

### **Biología Molecular de la SHBG.**

Recientemente se han obtenido cDNAs de la SHBG humana por métodos inmunológicos (65), ó por hibridaciones con los cDNAs de la ABP de la rata (39,40), y han sido utilizados para describir el gen de la SHBG, obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína, rastrear la síntesis de la SHBG en otros órganos y estudiar sus homologías con otras proteínas.

Por análisis de la secuencia del gen de la SHBG se ha encontrado que la región completa que codifica para el precursor de la SHBG está constituida por 8 exones, que se encuentran distribuidos a lo largo de 3.2 kilobases del DNA genómico. El RNA mensajero, que se ha encontrado en el hígado, es poco abundante y mide 1.6 kilobases (83).

### **Papel Biológico.**

Las hormonas esteroides circulan en forma libre y unida a proteínas del plasma. La fracción libre es muy pequeña, representando del 1 al 3% del esteroide total. La mayor parte circula unida a proteínas, de manera que el 32% del esteroide se encuentra unido a albúmina y el resto, 65%, a la fracción de las globulinas



plasmáticas representadas principalmente por la SHBG. Esto hace evidente que la SHBG juega un papel muy importante transportando esteroides en fluidos extracelulares, pero su significado biológico permanece aún en gran medida desconocido.

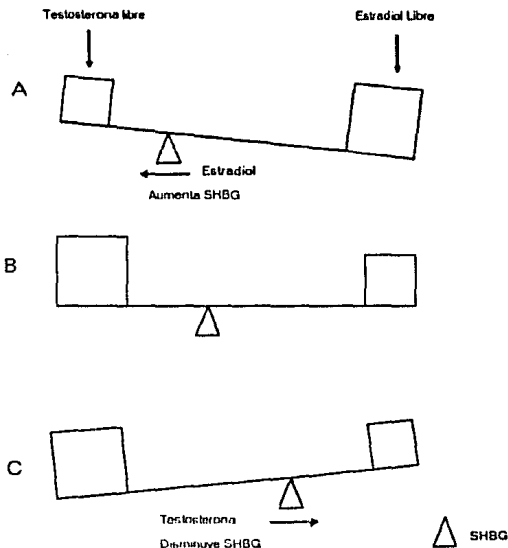
Con el transcurso del tiempo y la obtención de mayor información, se le han ido asignando diversas funciones a la SHBG:

a).- Ha sido sugerido que además de transportar hormonas esteroides en la sangre, la SHBG funciona también como protección de dichas hormonas, ya que las que se encuentran unidas a la SHBG no están expuestas a ataques enzimáticos, a absorción inespecífica en vasos sanguíneos y linfáticos, a un excesivo metabolismo en el hígado ó a excreción renal (4).

b).- También se le ha asignado una función reguladora. En lo que se ha llamado la hipótesis de la hormona libre, Sanberg y Slaunwhite en 1959 (84) propusieron que únicamente la hormona esteroide libre puede pasar desde los capilares sanguíneos hacia el interior de las células para iniciar una respuesta biológica ó ser metabolizada, por lo que la SHBG funciona como un reservorio de hormona inactiva que puede ser liberada por simple disociación. La SHBG participaría también como un amortiguador estabilizando las concentraciones de hormona libre en el plasma (85), y como economizador, ya que al proteger a las hormonas esteroides de su metabolismo, disminuye la velocidad de producción requerida para mantener un determinado nivel de hormona libre.

Esta hipótesis ha sido apoyada por toda una serie de observaciones, como el hecho de que los niveles plasmáticos de andrógenos se elevan durante el embarazo sin observarse signos clínicos de virilización, esto debido a que los niveles de la SHBG aumentan también neutralizando los efectos biológicos de los andrógenos (86). Sin embargo, ha sido también motivo de extensos debates, llegando a la conclusión de que mantener una concentración constante de esteroides en el suero no es la única función de la SHBG.

c).- Anderson y colaboradores (63,87) han propuesto que la SHBG funciona como agente regulador del balance andrógenos-estrógenos. Estos autores establecen que los cambios en las concentraciones de la SHBG producen una alteración mayor en el porcentaje de testosterona libre que de estradiol, ya que el estradiol se une mejor que la testosterona a la albúmina, y la testosterona se une mejor a la SHBG que el estradiol. Este modelo se encuentra esquematizado en la Figura II, y predice que, si todos los demás factores se mantienen iguales, la relación de testosterona/estradiol libres se altera al cambiar las concentraciones de la SHBG. Ya que los estrógenos estimulan y los andrógenos inhiben la producción de la SHBG, si la producción de estrógenos aumenta (A), el estradiol libre aumenta y estimula la producción de la SHBG; esto provoca una disminución en la testosterona libre, inclinando el balance en favor de los estrógenos. Por otro lado, el aumento en la producción de testosterona (C), amplifica su propio efecto causando la disminución en la concentración de la SHBG y el aumento en la cantidad de testosterona libre relativo al estradiol. Cualquier factor que altere la concentración de la SHBG moverá el balance en favor de la testosterona ó el estradiol, dependiendo de la dirección del cambio en la concentración de la SHBG.



**Figura II.-** Papel que juega la SHBG como regulador de las concentraciones relativas de testosterona y estradiol libres. A.- Aumenta la producción de estradiol; el estradiol libre aumenta y, al estimular la producción de la SHBG, provoca una disminución en la testosterona libre. Esta es la situación de una mujer adulta normal. B.- Balance. C.- Aumenta la producción de andrógenos; la testosterona libre aumenta y el efecto es amplificado por una disminución de la SHBG, que inclina el balance en favor de la testosterona. Esta es la situación de un varón adulto normal (55).

d).- William Pardridge, en 1981 (88), desarrolló una hipótesis en la que propone que la SHBG, al igual que la CBG, se encuentra sometida a diferentes fuerzas en la microcirculación que promueven la disociación de los esteroides unidos a ella. Estas fuerzas no se encuentran distribuidas uniformemente en la microcirculación de todos los órganos, lo que proporciona un mecanismo por el cual cada tejido específico obtiene la cantidad de esteroide necesario para él.

Propone que las hormonas esteroides, al igual que las hormonas tiroideas y otras hormonas y metabolitos que tienen una vida media en el plasma de minutos a horas, entran a los tejidos por medio de un mecanismo al que llamó del intermediario libre. En este mecanismo intervienen 3 factores que regulan el transporte de las hormonas unidas a proteínas: el tiempo de tránsito capilar, la velocidad de disociación unidireccional y el producto obtenido de la permeabilidad de la membrana por el área de la superficie en cuestión.

El tiempo de tránsito capilar implica el tiempo de exposición de las proteínas plasmáticas a una cierta membrana biológica, está inversamente relacionado con la velocidad de flujo sanguíneo, y es función de la longitud y el volumen del capilar y de la velocidad del plasma. Existen diferencias considerables de órgano a órgano con respecto a la duración del tiempo de tránsito capilar, siendo de aproximadamente 1 segundo en el cerebro ó músculo esquelético, de 2 a 3 segundos en capilares mesentéricos y de 5 segundos en los espacios sinusoidales del hígado.

La velocidad de disociación de las hormonas esteroides de sus proteínas transportadoras es muy variable; en general, la disociación de la albúmina es

bastante rápida, mientras que la disociación de globulinas es típicamente un proceso lento. Sin embargo, lo importante es relacionar la velocidad de disociación con el tiempo de tránsito capilar del órgano en cuestión, ya que por ejemplo, la disociación del estradiol de la SHBG es un proceso relativamente rápido comparado con el tiempo de tránsito capilar en el hígado, pero es lento comparado con el tiempo de tránsito en el cerebro.

La permeabilidad de la membrana es otro factor muy importante, ya que entre mayor sea ésta, mayor será la tendencia del esteroide que se disocia a pasar a través de la membrana.

De acuerdo con todo lo expuesto, la fracción de hormona libre in vitro es diferente de la fracción libre aparente in vivo, la cual se vé aumentada en proporción a los aumentos en los tres factores mencionados anteriormente. Esto hace que, entre mayor sea el transporte de hormona unida a proteínas, mayor sea la fracción libre aparente in vivo del ligando. Todo esto ocasiona que exista una toma diferencial de las hormonas esteroideas en los diferentes órganos. Por ejemplo, la testosterona y el estradiol unidas a la SHBG no pasan la barrera hematoencefálica del cerebro, ya que la velocidad de disociación es lenta comparada con el tiempo de tránsito del plasma en el cerebro, cosa que no sucede con la unida a albúmina, que tiene una rápida velocidad de disociación. En cambio, el estradiol unido a la SHBG sí es transportado hacia el hígado, ya que su velocidad de disociación es mayor que el tránsito capilar, a diferencia de la testosterona, cuya velocidad de disociación es lenta con respecto al tiempo de tránsito capilar en el hígado.

Esta hipótesis define a la SHBG como un transportador de hormonas esteroides, que participa como un vector diferencial de las hormonas en los diferentes órganos y tejidos, de acuerdo con las necesidades y funciones particulares de cada uno de ellos.

e).- La posibilidad de que la SHBG funcione no únicamente como un transportador y reservorio de hormonas esteroides ha sido fuertemente apoyada por estudios bioquímicos recientes, como los de Cooper y Waites (89), que reportan una mayor acumulación de testosterona en el lumen del epidídimo de la rata al ser perfundidos con testosterona radiactiva y SHBG, comparada con la que se obtiene perfundiendo testosterona radiactiva únicamente, sugiriendo que de alguna manera la SHBG favorece la entrada del esteroide a las células. Ha sido demostrado también que la SHBG interactúa directamente con diferentes componentes celulares (56), y se ha descrito la localización intracelular de la SHBG en células de carcinoma humano MCF7 in vitro (79), y en algunas células blanco de andrógenos, como células de próstata, de Sertoli, epididimarias y espermatozoides (90,91).

Datos recientes de varios laboratorios sugieren la existencia de receptores específicos para la SHBG en la membrana de las células blanco, como en células de endometrio decidual humano (53), y en próstatas humanas (54,56). Como fue mencionado anteriormente, la SHBG funciona como una proteína alostérica con sitios de unión para el esteroide y para el receptor, que sufre un cambio conformacional cuando el esteroide ocupa su sitio de unión de manera que el sitio activo para el receptor queda enmascarado, impidiendo que la SHBG se

una a éste. Por el contrario, si la SHBG no unida se une a su receptor, sí mantiene su capacidad de unir esteroides.

Se han hecho múltiples estudios acerca de lo que sucede una vez que la SHBG se une a su receptor, y se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas propone que la SHBG es necesaria para alguna función biológica intracelular, por lo que es internalizada vía su receptor. Alguna de éstas funciones podría ser la de proteger al esteroide de la degradación enzimática intracelular, ó también podría tratarse de un transporte específico de esteroides a las células blanco. Aunque los esteroides son moléculas liposolubles, por lo que atraviesan la membrana plasmática por simple difusión, la participación activa de un complejo acarreador-proteína-esteroide proporciona a la célula blanco una especificidad hacia el esteroide que no se da en el caso de la difusión. Esto podría explicar por qué ciertos desórdenes androgénicos se correlacionan con la concentración de andrógenos libres, ya que el contenido de éstos en el suero podría representar al esteroide disponible para una acción no específica ó patológica, debido a que no existen mecanismos de regulación de la difusión como los que existen para los receptores, como la regulación baja de receptores después de la estimulación (54,92). Esta hipótesis no ha sido rechazada, pero existen todavía dudas con respecto a la importancia cuantitativa de la entrada de esteroide acoplado a la SHBG en comparación con la entrada de esteroide no unido (55).

La internalización de la SHBG a la célula podría también estar involucrada con la subsecuente unión del esteroide a su receptor intracelular. Otra posibilidad podría ser que tuviera alguna función biológica independiente de las hormonas esteroides pero que fuera influenciada por éstos. Como ya fue

mencionado anteriormente, se ha encontrado que la unión de la SHBG a su receptor, con la subsecuente unión del esteroide a su sitio de unión, provoca la activación de la adelinato ciclasa membranal, aumentando la concentración de AMPc intracelular (55). La intensidad de esta acumulación depende de la afinidad del esteroide unido a la SHBG, de manera que la  $5\alpha$ -DHT, que tiene una alta afinidad por la SHBG, provoca un aumento mayor que el estradiol, que tiene una menor afinidad. Este mecanismo podría implicar un modo adicional de acción de las hormonas esteroides, que no requiere que el esteroide interactúe con su receptor intracelular, confiriendo otra función a la SHBG.

Actualmente se hacen múltiples estudios para profundizar en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la hSHBG, utilizando diferentes enfoques, como los análisis de sus homologías con otras proteínas de función conocida, los estudios clínicos en los que se asocia alguna patología con cambios en la estructura ó concentración de la hSHBG, ó los estudios a nivel de biología molecular con los cDNAs de la hSHBG. En el presente trabajo, la herramienta que se utilizó para ampliar el conocimiento sobre la hSHBG fue el estudio de mutaciones ó variantes genéticas en dicha molécula.

A la presencia simultánea de dos o más fenotipos diferentes de una misma característica en una población, en proporciones tales que el más raro de ellos se encuentra con una frecuencia mayor al 1%, se le denomina polimorfismo genético (93). Con el estudio de las poblaciones se ha hecho evidente que el polimorfismo es un fenómeno ampliamente distribuido en los seres vivos; de



hecho, se ha encontrado que las poblaciones son polimórficas para la mayoría de los loci génicos (94).

Algunos polimorfismos son más aparentes que otros. Tal es el caso de los polimorfismos para el color de los ojos y del cabello en los humanos, el melanismo industrial encontrado en la polilla moteada *Biston betularia* L., el polimorfismo cromático de la concha del caracol de tierra *Cepaea nemoralis*, las diferentes morfologías de las hormigas (voladoras, soldados), etc. Sin embargo, existen variantes genéticas a nivel molecular que no son tan evidentes y para cuya identificación se requiere de técnicas especiales, como pruebas enzimáticas y electroforéticas. Existen infinidad de ejemplos de estas últimas, como son los polimorfismos cromosómicos (variaciones en la morfología y tamaño de algunos segmentos cromosómicos); el sistema de antígenos HLA, codificado por cuatro loci (D-B-C-A) con numerosos alelos en cada uno de ellos; el sistema Rh en la sangre, constituido por tres alelos CDE/cde; los polimorfismos enzimáticos (presencia de isoenzimas), como el caso de la esterasa-G de la *Drosophila melanogaster*, determinada por dos alelos; el polimorfismo en los grupos sanguíneos ABO, con sus tres alelos  $I^A$ ,  $I^B$  e  $I^O$ ; la variación encontrada directamente en la secuencia de nucleótidos del DNA por medio de enzimas de restricción; y las variantes genéticas encontradas en algunas proteínas transportadoras, como la Globulina Transportadora de Corticoesteroides (CBG), y la Globulina Transportadora de Tiroxina (TBC) (94-99).

En lo que respecta a la TBC, se han descrito casos de concentraciones séricas mayores o menores que lo normal y por lo menos 5 variantes que involucran cambios de un aminoácido en la cadena polipeptídica de la proteína y

que presentan un patrón de herencia ligada al cromosoma X. Estas variantes afectan en diferentes grados a la función de la TBC. La más ampliamente estudiada ha sido la denominada TBC-S, que fue detectada por medio de isoelectroenfoque en sujetos de raza negra de los Estados Unidos, Centro América, África y Oceanía (97). Esta variante se caracteriza por una movilidad electroforética más lenta (TBC-Slow) y un movimiento hacia el cátodo en el punto isoeléctrico de las isoformas encontradas normalmente.

La molécula de TBC-S es ligeramente más termolábil que la normal, por lo que los sujetos que la poseen presentan concentraciones en suero de la TBC más bajas en promedio y, por lo tanto, menores concentraciones de T4. Se ha reportado que la existencia de esta variante se debe a una sustitución en el codón para el aminoácido N° 171 de la proteína madura, dando como resultado el cambio del ácido aspártico (aminoácido con carga negativa) por la asparagina (aminoácido neutro).

En cuanto a la CBC, se han descrito también casos con concentraciones circulantes alteradas, así como variantes genéticas caracterizadas por un cambio en el punto isoeléctrico cuando son sometidas a un sistema de isoelectroenfoque después del tratamiento con neuraminidasa. Se sabe que estas moléculas presentan una afinidad por el cortisol menor a la normal, pero la causa de la existencia de estas variantes aún no se conoce (98,99).

La existencia de variantes genéticas de la molécula de la hSHBG ha sido también estudiada, existiendo a la fecha dos reportes a este respecto. En el primero de ellos, Ahrentsen y colaboradores (100) describen el caso de la ausencia total de

la hSHBG circulante en 2 sujetos femeninos pertenecientes a la misma familia. En el estudio clínico, una de las sujetos presentó un ligero hirsutismo, obesidad y amenorrea de 8 meses, y la otra, no presentó ningún cuadro clínico característico y un embarazo normal de 20 semanas.

Los niveles de andrógenos circulantes de estas sujetos se encontraron dentro de los límites normales, presentando únicamente una elevación en el porcentaje de testosterona libre con respecto a la total.

Estos autores describen que en el estudio familiar no se encontró otro sujeto con la ausencia total de la hSHBG. Únicamente, las concentraciones circulantes de la hSHBG en el padre y la abuela materna se encontraron en los límites inferiores de los valores normales. En este trabajo se sugiere que la deficiencia de la hSHBG es una característica genéticamente determinada.

En el segundo reporte, Luckock y Cavalli-Sforza (101) describen la existencia de 4 variantes genéticas de la hSHBG, encontradas por medio de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida de la hSHBG unida *in vitro* a testosterona marcada con  $^{14}\text{C}$  del suero de los sujetos de estudio, con la subsecuente exposición a una placa de rayos X durante 2 meses. Las variantes identificadas fueron las siguientes: la normal, la variante lenta (con una movilidad electroforética menor a la normal), la variante ancha (que corre como una banda ancha que abarca desde la banda lenta hasta la normal), y la variante ausente.

Los autores sugieren que estos fenotipos son el resultado de las combinaciones de tres alelos, designados como N, S y O, siendo N y S

codominantes y O recesivo. De esta manera, el genotipo NN y NO produce un fenotipo normal; el SS y SO produce un fenotipo lento; el NS, un fenotipo ancho, y el OO corresponde al ausente. Al hacer el estudio familiar, los autores concluyen que los fenotipos de la hSHBG son el producto de la herencia mendeliana simple de un gen autosómico trialélico.

En el presente trabajo se estudió la presencia de variantes genéticas de la hSHBG, utilizando para su identificación el sistema de isoelectroenfoque.

## OBJETIVO

## **OBJETIVO**

El presente trabajo tuvo como objetivo el establecimiento de la existencia de polimorfismo genético de la molécula de la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales en el suero de una muestra representativa de la población mexicana, desde el punto de vista de sus propiedades de carga en un sistema de isoelectroenfoque, así como las bases de su transmisión genética y sus repercusiones en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la hSHBG.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL.

Los esteroides no radiactivos fueron obtenidos de Steraloids Inc. (Wilton N.H.), y su pureza química fue establecida por cromatografía en papel y recristalización. Los esteroides radiactivos fueron obtenidos de Du Pont NEN Research Products (Boston, Mass); la 1,2-<sup>3</sup>H-testosterona (<sup>3</sup>H-T) utilizada tuvo una actividad específica de 40-60 Ci/mmol, y la 1,2-<sup>3</sup>H-dihidrotestosterona (<sup>3</sup>H-DHT), de 40-60 Ci/mmol. Ambas fueron purificadas antes de su utilización por cromatografía en Sephadex LH-20 con cloroformo: etanol 25:2. La acrilamida, N,N'- dialiltartardiamida (DATD), N,N'-metilenbisacrilamida (bis), N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (HMED), azul brillante de Coomassie R-250, persulfato de amonio, sulfato salicílico de sodio (SDS), affie-gel blue, papel de nitrocelulosa, estándares de punto isoeléctrico y las anfólinas se obtuvieron de Bio Rad Laboratories (Richmond, Calif.). La albúmina sérica bovina (ASB), tris, glicina,



ácido glutámico, Tween 20, glicerol, neuraminidasa tipo X y el inhibidor de tripsina tipo I-S fueron obtenidos de Sigma Chemical Co (St Louis, Mo.).

Las muestras de sangre fueron obtenidas de 360 individuos adultos mexicanos de ambos sexos, residentes en la Ciudad de México. Se dejaron coagular durante un par de horas a temperatura ambiente, y el suero fue separado por centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos y guardado en alícuotas a -80°C hasta su utilización.

El anticuerpo anti hSHBG utilizado fue generado en conejo utilizando hSHBG purificada a partir de líquido amniótico (75), y donado por el Dr. C.W. Bardin del Population Council Center for Biomedical Research de Nueva York. Este anticuerpo es monoespecífico para la hSHBG.

## MÉTODOS

### 1).- Preparación de las Muestras de Suero.

Antes de su utilización en los experimentos llevados a cabo en este estudio, las muestras de suero fueron sometidas a diferentes tratamientos:

a).- Eliminación de los Esteroides Endógenos.- La remoción de los esteroides endógenos presentes en el suero se llevó a cabo mediante la incubación de las muestras de suero con carbón activado Norit-A, en una relación de 1 mg de carbón por ml de suero durante 1 hora a 4°C con agitación manual. Al final de la incubación las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 30 minutos, y los sobrenadantes obtenidos se guardaron en alícuotas a -80°C hasta su utilización.

b).- Eliminación de la Albúmina.- Casi toda la albúmina presente en las muestras de suero fue eliminada por medio de la utilización de affi-gel blue. Primeramente, el affi-gel blue fue lavado exhaustivamente y equilibrado con un amortiguador de tris 0.02M, glicerol 10% pH 7.4 (IC buffer). Después, se incubaron el affi-gel blue y el suero en una relación de 0.6 ml de suero por cada ml del gel durante 1 hr a 4°C con agitación manual, en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm (Falcon, Oxnard, Calif.). Al final de la incubación los tubos fueron

centrifugados a 3000 rpm durante 20 min, y los sobrenadantes obtenidos fueron guardados en alícuotas a -80°C hasta su uso.

c).- Tratamiento con Neuraminidasa.- Este tratamiento fue utilizado para eliminar los residuos de ácido siálico presentes en la molécula de la hSHBG, responsables de gran parte de la microheterogeneidad observada en ésta. Se llevó a cabo mediante el método descrito por Van Baelen y colaboradores (99), según el cual las muestras de suero fueron ajustadas a pH 5.8 con HCl 1 N e incubadas con 0.05-0.5 unidades de neuraminidasa tipo X (diluida en un amortiguador de acetato de sodio 0.05M pH 5.8) por cada 0.2 ml de suero. Al final de la incubación se añadieron 0.1 ml de TG buffer con azida de sodio 0.2% y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos fueron guardados en alícuotas a -80°C.

Para descartar la posibilidad de degradación de las muestras durante la incubación, en uno de los experimentos se trataron 0.2 ml de suero con neuraminidasa añadiendo 0.001 mg de un inhibidor de tripsina tipo I-S, diluida en un amortiguador de acetato de sodio 0.05M, cloruro de sodio 0.17M y azida de sodio 0.02%.

Con el objeto de analizar los efectos de la congelación y descongelación de las muestras durante los tratamientos descritos y los subsiguientes experimentos, se sometieron muestras de suero a 10 ciclos de congelación y descongelación y se analizó su actividad por medio de ensayos de un sólo punto.

## 2).- Desarrollo de Sistemas de Unión Para la Determinación y Cuantificación de la hSHBG.

La determinación y cuantificación de la hSHBG, así como la obtención de sus constantes fisicoquímicas (constante de afinidad, constante de disociación y número de sitios de unión), se llevó a cabo por los siguientes métodos:

a).- Ensayo de un Sólo Punto.- La determinación de la presencia de la hSHBG en las muestras se llevó a cabo por éste método: se incubaron 0.2 ml de cada muestra (suero tratado con carbón ó eluatos de geles de isoelectroenfoque) con  $1 \times 10^{-11}$ M de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona marcada con tritio ( $^3$ H-DHT) durante 1 hora a 0°C. Paralelamente en uno de los tubos se añadió un exceso de 200 ng de DHT no marcada y se incubó de igual manera para calcular la unión no específica. La separación de los esteroides libres de los unidos a la hSHBG se llevó a cabo mediante la adición de 0.8 ml de una suspensión de 250 mg de carbón activado Norit-A y 25 mg de dextrán I-70 en 100 ml de TG-bufier, y la centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron decantados en viales de centelleo y la cuantificación de la radiactividad se llevó a cabo mediante la adición de 5 ml de Instagel como solución de centelleo y la utilización de un contador Packard Tri Carb 300. La presencia de la hSHBG en las muestras se traduce en la obtención de una unión específica significativa, resultado de la resta de la unión no específica a la unión total obtenida del contador.

b).- Análisis de Saturación.- La cuantificación de la hSHBG en las muestras, y la determinación de las constantes de afinidad y las constantes de disociación, se llevó a cabo por el análisis de saturación usando el ensayo de

carbón-dextrán descrito por Larrea y colaboradores (102): se incubaron 0.2 ml de suero tratado con carbón y diluido 1:10 en TG buffer con 0.2 pmol de  $^3\text{H}$ -DHT y cantidades crecientes de DHT no radiactiva para obtener una concentración final de  $1-40 \times 10^{-9}\text{M}$ . La unión no específica fue determinada en un tubo con la  $^3\text{H}$ -DHT más un exceso de 200 ng de DHT no marcada. Después de 1 hora de incubación a  $0^\circ\text{C}$ , se separó el esteroide libre del unido a la hSHBC por medio de la adición de 0.8 ml de una suspensión de 250 mg de carbón activado Norit-A y 25 mg de dextrán 1-70 en 100 ml de TG buffer, y la centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se decantaron en viales de centelleo, se les añadió 5 ml de Instagel y se contaron en un contador Packard Tri-Carb 300. Los resultados obtenidos se graficaron y analizaron por medio del método de Scatchard (103), con el que se obtiene una recta cuya pendiente es igual a la constante de afinidad de la hSHBC, el inverso de la pendiente representa a la constante de disociación, y el punto en el que la recta cruza al eje de las abscisas indica el número de sitios de unión de la hSHBC, y como ésta posee un sólo sitio de unión al esteroide por molécula, representa la concentración de la hSHBC en la muestra.

### 3).- Isoelectroenfoque.

En este estudio se utilizaron dos sistemas de isoelectroenfoque: en tubo y en placa.

a).- Isoelectroenfoque en Tubo.- El isoelectroenfoque en tubo se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida) en forma de tubo de  $0.5 \times 10$  cm, conteniendo un 6% de amfolinas para establecer un rango de pH de 3 a 10. En cada uno de ellos se depositaron 0.2 ml de suero tratado ó no con affi-gel blue y/o

neuraminidasa y fueron sometidos a una diferencia de potencial de 100 V durante 1 hr y a 200 V durante 20 hrs. a 4°C. Al cabo de este tiempo los geles fueron sacados de los tubos y congelados a -80°C hasta su utilización. Como solución amortiguadora del ánodo se utilizó ácido glutámico 0.05M, y para el cátodo, tris base 0.05M. Cada uno de los geles congelados fueron cortados en fragmentos de 2 mm, eluidos en 0.5 ml de IG buffer durante 18 hrs a 4°C con agitación, y la presencia de la hSHBG en cada uno de los sobrenadantes se determinó por medio de ensayo de un sólo punto. Para la obtención del rango de pH establecido a lo largo de los geles, en uno de los tubos de cada experimento no se corrió ninguna muestra, se cortó en fragmentos de 5 mm y cada uno se eluyó en 2 ml de agua destilada desionizada. Al cabo de 2 hrs de incubación a temperatura ambiente con agitación, se midió el pH de cada uno de los sobrenadantes. En cada experimento se corrió también un gel con estándares de punto isoelectrónico Bio-Rad Lab.

b).- Isoelectroenfoque en Placa.- El isoelectroenfoque en placa se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 11 x 12 cm prefabricados por LKB (Uppsala, Suecia) con un rango de pH establecido de 3 a 10. La solución amortiguadora utilizada para el cátodo fue hidróxido de sodio 1M, y para el ánodo, ácido fosfórico 1M. En cada carril se aplicaron de 20 a 40 µl de las muestras de suero tratadas ó no con affi-gel blue y/o neuraminidasa, se corrieron en un aparato LKB 2117 Multiphor aplicando una corriente constante de 50 mA hasta alcanzar un voltaje de 1500 V, a 4°C. Al final de la corrida las muestras fueron transferidas a papel de nitrocelulosa. Un carril en el que no se colocó ninguna muestra se utilizó para medir el gradiente de pH establecido en el gel, cortando fragmentos de 5 mm, eluyéndolos en 2 ml de agua destilada desionizada a temperatura ambiente durante 2 hrs con agitación, y midiendo el pH en cada uno de los sobrenadantes.

En uno de los experimentos, uno de los carriles en el que se había corrido una muestra de suero fue cortado en fragmentos de 5 mm, eluído en 0.5 ml de TG buffer a 4°C durante 18 hrs en agitación, y la presencia de la hSHBC en cada uno de los sobrenadantes se determinó por medio de ensayo de un sólo punto.

#### **4).- Inmunotransferencia.**

Con el objeto de observar específicamente las bandas correspondientes a la molécula de la hSHBC sometida a isoelectroenfoque en placa, las proteínas del gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa y reveladas con un anticuerpo específico anti-hSHBC.

La transferencia a papel se llevó a cabo por difusión de las proteínas del gel al papel, para lo cual se montó el siguiente sistema: en un recipiente se colocaron 3 hojas de papel filtro Watman N° 2 del tamaño del gel, previamente remojadas en un amortiguador de tris 0.02M, NaCl 3M pH 7.5 (buffer de transferencia). Encima se colocaron 3 hojas de papel filtro Watman N° 2 secas, y encima, el papel de nitrocelulosa, también del tamaño del gel, previamente remojado en un amortiguador de tris 0.01M, NaCl 0.9% (buffer de lavado). Después se puso el gel, quitando todas las burbujas existentes entre éste y el papel de nitrocelulosa, y finalmente se colocó un vidrio y un matríz de 250 ml lleno de agua. La transferencia transcurrió durante 18 hrs a temperatura ambiente y en atmósfera húmeda.

Al finalizar la transferencia, se incubó el gel pegado al papel en un amortiguador de tris 0.02M, NaCl 0.5M, tween 20 0.05% pH 7.5 (buffer de separación), con agitación durante 30 min, y se separaron manualmente retirando el resto de gel adherido al papel con una tarjeta de plástico. Para tapar todos los sitios activos restantes del papel de nitrocelulosa, éste se incubó en un amortiguador de tris 0.01M, tween 20 0.1%, thimerosal 0.01%, NaCl 0.9%, albúmina sérica bovina 3% pH 7.4 (buffer de bloqueo) durante 5 hrs a temperatura ambiente, al final de las cuales se lavó el papel exhaustivamente con buffer de lavado. El papel se colocó en una bolsa de plástico sellada con el anticuerpo anti hSHBC generado en conejo, diluido 1:100 en un amortiguador de tris 0.01M, NaCl 0.9%, tween 20 0.1%, thimerosal 0.01%, albúmina sérica bovina 1% pH 7.4 (buffer para primer anticuerpo), y se incubó durante 18 hrs a temperatura ambiente y en agitación. Al finalizar la incubación, se lavó el gel varias veces con el buffer de lavado y se incubó 1 hr más con el buffer de bloqueo. Después de ser lavado, el papel se colocó en otra bolsa de plástico sellada con el anticuerpo anti IgG de conejo marcado con peroxidasa diluido 1:200 en un amortiguador de tris 0.01M, NaCl 0.9%, tween 20 0.1%, thimerosal 0.01% pH 7.4 (buffer para segundo anticuerpo) y se incubó durante 4 hrs a temperatura ambiente con agitación. Se lavó exhaustivamente con buffer de lavado, y las bandas se revelaron con una solución de 15 mg de 3-3' diaminobencidina y 10 µl de peróxido de hidrógeno en 50 ml de buffer de lavado.

##### **5).- Análisis de las Muestras de Suero de la Población.**

Las 360 muestras de suero de la población fueron tratadas con affi-gel blue y neuraminidasa y sometidas a isoelectroenfoque en tubo y en placa.



Por medio de isoelectrofoque en tubo fueron analizadas 250 muestras de suero de individuos adultos mexicanos de ambos sexos y, como fue mencionado anteriormente, el patrón de corrimiento de la hSHBG se observó cortando los geles en fragmentos de 2 mm, eluyéndolos en 1G buffer y realizando ensayo de un sólo punto en cada uno de los sobrenadantes.

Las muestras que fueron sometidas a isoelectrofoque en placa fueron las de 110 individuos adultos mexicanos (55 matrimonios) y, como se señaló en el inciso anterior, fueron posteriormente analizadas por inmunotransferencia.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron analizados desde el punto de vista genético para encontrar el modo de transmisión de los fenotipos encontrados, y por medio de la ley de Hardy-Weinberg para averiguar si la población se encontraba en equilibrio génico.

Se dice que una población está en equilibrio génico cuando las frecuencias de los homocigotos y de los heterocigotos van de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg. Esta ley denota a la frecuencia de cada uno de los alelos, de un sistema constituido por dos de ellos, como  $p$  y  $q$ , y establece que su distribución en una población en equilibrio obedece a la siguiente ecuación matemática:  $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$  y  $p + q = 1$ . de manera que la frecuencia de un homocigoto debe ser igual a  $p^2$ , del otro homocigoto, a  $q^2$ , y del heterocigoto, a  $2pq$ . La población se encuentra en equilibrio si las diferencias entre lo observado experimentalmente y lo esperado de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg son explicables por el azar, para lo cual se aplica una prueba de

$\chi^2$ . De lo contrario, se dice que la población no se encuentra en equilibrio génico (94,95,104).

#### **6).- Estudio Familiar.**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de suero de la población, se estudió la descendencia de 2 matrimonios en los que uno de los miembros de la pareja presentó el fenotipo variante de la hSHBG, y de 2 matrimonios en los que ambos sujetos presentaron el fenotipo silvestre de la hSHBG.

El suero de los hijos de estas parejas fue tratado igualmente con affi-gel blue y neuraminidasa y sometido a isoelectroenfoque en placa e inmunotransferencia.

#### **7).- Propiedades Físicoquímicas de las Variantes de la hSHBG.**

a).- Constante de Afinidad, Constante de Disociación y Número de Sitios de Unión.- La determinación de las constantes de afinidad, constantes de disociación y número de sitios de unión se llevó a cabo mediante análisis de saturación a 4°C y a 28°C, en sueros de sujetos que presentaron el fenotipo silvestre y de sujetos que presentaron el fenotipo variante de la hSHBG.

b).- Velocidad de Disociación y Tiempo Medio de Disociación.- Se estudió también la velocidad de disociación y el tiempo medio de disociación del

complejo hSHBG-testosterona en sueros de sujetos con el fenotipo silvestre y el variante de la hSHBG. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera: las muestras de suero fueron primeramente tratadas con carbón y diluidas 1:10 con TG buffer, y después incubadas con cantidades saturantes de testosterona marcada con tritio ( $1 \times 10^{-9}$ M) durante 1 hr a 4°C y a 28°C, para ocupar todos los sitios de unión de la hSHBG. Al finalizar esta incubación, se hicieron incubaciones seriadas durante 0 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min y 30 min con un exceso de 1000 veces de testosterona no marcada radiactivamente, a 4°C y 28°C también. Al finalizar los tiempos de incubación, se añadieron 0.8 ml de una suspensión de 250 mg de carbón activado Norit-A y 25 mg de dextrán en 100 ml de TG buffer a cada tubo, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y se determinó la radiactividad en el sobrenadante por medio de conteo con Instagel en un contador Packard Tri-Carb 300.

Los resultados obtenidos se graficaron como el logaritmo natural de las cuentas por minuto unidas específicamente contra el tiempo de incubación con el exceso de testosterona no marcada. De esta manera se obtiene una recta cuya pendiente representa la velocidad de disociación del complejo hSHBG-testosterona, y el punto en el eje del tiempo de incubación que corresponde a la mitad del valor máximo obtenido en el eje de la unión específica, indica el tiempo medio de disociación (tiempo en el que se disocia la mitad del complejo).

## **8).- Análisis de las Muestras por Medio de SS-PAGE y Gráficas de Ferguson.**

De 50 a 70  $\mu$ l de suero tratado con carbón, affi-gel blue y/o neuraminidasa fueron sometidos a SS-PAGE (Steady-State Polyacrylamide Gel Electrophoresis), y al sistema de gráficas de Ferguson (105,106).

El SS-PAGE se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizaron geles de poliacrilamida al 6% (gel de resolución) en tubos de vidrio de 10 x 0.6 cm, con 1 cm de gel concentrador (poliacrilamida al 2.5%). En el gel de resolución se incorporaron 2 pmol de 5 $\alpha$ -dihidrotosterona marcada con tritio (<sup>3</sup>H-DHT) por cada ml de gel, y en el gel concentrador, 5 pmol de <sup>3</sup>H-DHT por ml de gel. Para el caso de los tubos para la unión no específica, en el gel de resolución se añadió también un exceso de 100 veces de DHT no marcada radiactivamente. Las muestras se corrieron a 1 mAmp por tubo durante el gel concentrador, y a 2 mAmp por tubo durante el gel de resolución. La solución amortiguadora utilizada en este sistema fue tris base 0.005M, glicina 0.05M pH 8.3.

Cuando el frente de corrimiento llegó al final del gel de resolución, los geles fueron sacados de los tubos y congelados a -80°C. Posteriormente, fueron cortados en fragmentos de 2.5 mm y contados en un contador de centelleo Packard Tri-Carb 300, utilizando 5 ml de Instagel como solución centelleadora. Los resultados fueron graficados como cuentas por minuto obtenidas en cada fracción contra el número de la fracción.

Para las gráficas de Ferguson se utilizó el mismo sistema de SS-PAGE, pero en este caso cada muestra fue corrida en geles con diferentes concentraciones de acrilamida: 5%, 6%, 7.5%, 8.5% y 10%. Los resultados se graficaron como cuentas por minuto obtenidas en cada fracción contra el número de la fracción. Para linealizar los datos, los resultados se graficaron también como el logaritmo base 10 del Rf (número de la fracción en la que sale el punto máximo de la curva entre el número de fracciones totales) contra la concentración de acrilamida del gel.

Bajo estos dos sistemas se analizaron muestras de suero de sujetos con el fenotipo silvestre y de sujetos con el fenotipo variante de la hSHBG.

#### **9).- Métodos Estadísticos.**

Los métodos que fueron utilizados para analizar estadísticamente los resultados de este trabajo fueron: la prueba de  $t$  de Student, para la comparación de las constantes fisicoquímicas de la molécula de la hSHBG con fenotipo silvestre y variante, y la prueba de  $\chi^2$  para establecer el equilibrio génico de la población estudiada de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg.

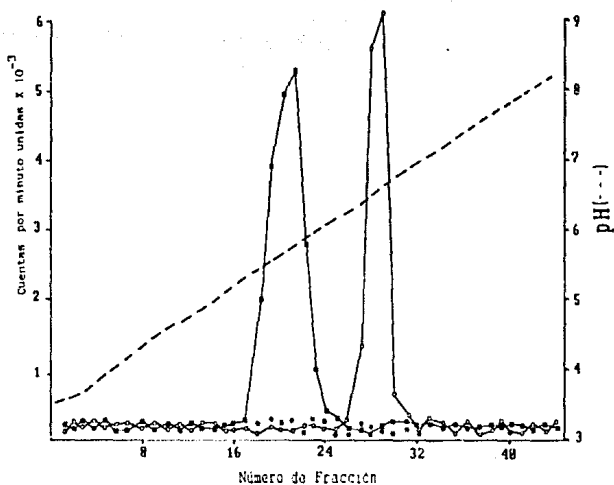
## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1).- Isoelectroenfoco en Tubo.

Cuando las muestras de suero fueron tratadas con affi-gel blue y sometidas a isoelectroenfoco en tubo, se obtuvo un pico de unión en el ensayo de un sólo punto de los fragmentos del gel, como el que se muestra en la figura 1. Este pico se encontró localizado en un rango de pH entre 5.4 y 5.85, y desapareció cuando en el ensayo de un sólo punto se añadió un exceso de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona no marcada radiactivamente, lo que confirmó que efectivamente se trata de la molécula de la hSHBC.

En la figura 1 se muestra también el pico de unión obtenido después del análisis por ensayo de un sólo punto de los fragmentos de gel del isoelectroenfoco de una muestra de suero tratada con affi-gel blue y neuraminidasa. En este caso, el pico de unión encontró su máximo a un pH de



**Figura 1.-** Perfil de unión del isoelectroenfoque en tubo de una muestra de suero tratada ( o ) y no tratada ( ■ ) con neuraminidasa, obtenido por medio de ensayo de un sólo punto de los eluatos de los fragmentos de los geles. El primer pico corresponde a la hSHBC nativa, y el segundo, a la hSHBC desializada. Los asteriscos representan las cuentas por minuto obtenidas para la unión no específica, es decir, cuando los eluatos fueron incubados también con un exceso de DHI no radiactiva.

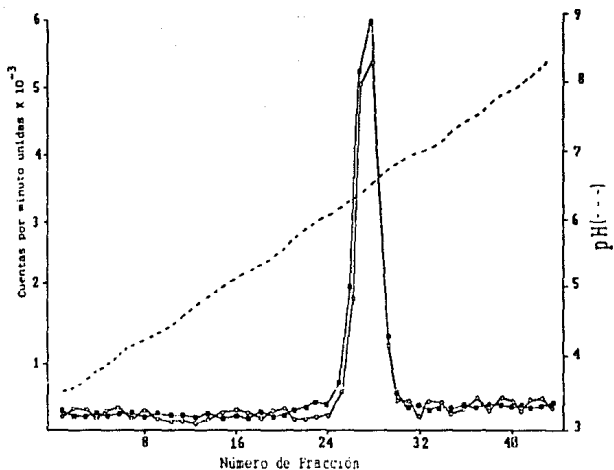


6.9, y también fue desplazado por un exceso de DHT no marcada, lo que permitió afirmar que corresponde a la hSHBC desializada. Estos resultados no se alteraron cuando la desialización de la molécula de la hSHBC se llevó a cabo en presencia de un inhibidor de tripsina, como se muestra en la Figura 2.

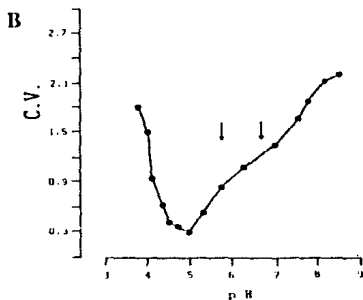
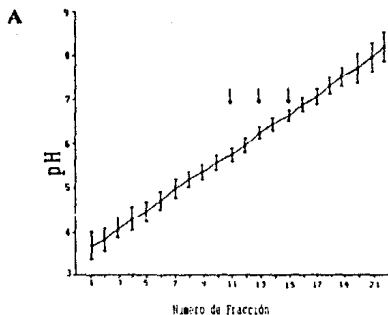
Estos resultados demuestran que el tratamiento con neuraminidasa cambia el punto isoeléctrico de la molécula de la hSHBC hacia un pH más básico, pasándolo de 5.4-5.85 a 6.9, en promedio, debido a la eliminación de residuos de ácido siálico de la proteína. Además, reduce la microheterogeneidad propia de la molécula de la hSHBC, que se hace evidente por la disminución en el área de enfoque de la proteína después del tratamiento con neuraminidasa. Por otro lado, sugieren también que ni el tratamiento con neuraminidasa ni el procedimiento de isoelectroenfoque alteran el sitio de unión a esteroides de la hSHBC, ya que siempre se obtiene un pico de unión a <sup>3</sup>H-DHT.

En cada uno de los isoelectroenfoques en tubo que se llevaron a cabo se utilizó uno de los gels para medir el rango de pH establecido por las anfólinas. En la figura 3A se muestra dicho gradiente de pH con las desviaciones estándar de cada punto y en la 3B, el coeficiente de variación obtenido para cada valor de pH medido. Las flechas señalan la zona de pH donde se encontraron los picos de la hSHBC y, como puede observarse, se localizaron en un área de pH de poca variación interensayo.

Aunque el isoelectroenfoque en tubo demostró ser un método adecuado para el estudio del punto isoeléctrico de la molécula de la hSHBC, el análisis de las 250 muestras de suero de la población por medio de esta



**Figura 2.-** Perfil de unión del isoelectrofoque en tubo de una muestra de suero tratada con neuraminidasa en presencia (○) ó ausencia (■) de 0.001 mg de un inhibidor de tripsina tipo I-S, obtenido por medio de ensayo de un sólo punto de los eluatos de los fragmentos de los gels.



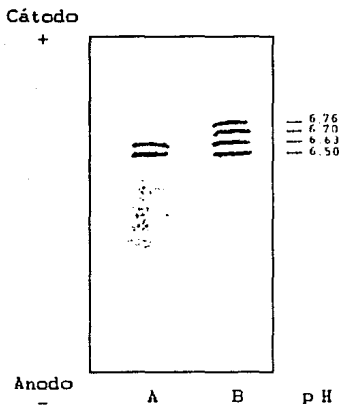
**Figura 3.-** A).- Gradiente de pH obtenido en el isoelectrofoque en geles de poliacrilamida en tubo. En cada punto se representa el promedio y la desviación estándar de 20 diferentes isoelectrofoques. B).- Curva obtenida al graficar el coeficiente de variación para cada valor de pH medido en los isoelectrofoques.

metodología no logró demostrar la presencia de ninguna variante genética en el punto isoeléctrico de la hSHBG desializada, por lo que se decidió utilizar el método de isoelectroenfoque en placa seguido de inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa.

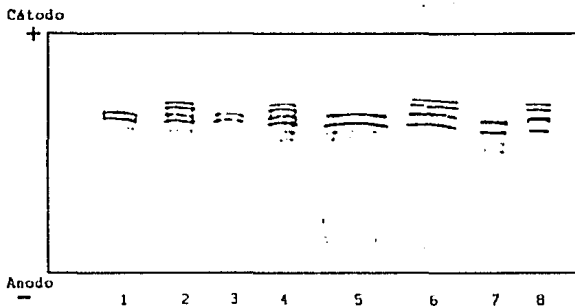
## **2).- Isoelectroenfoque en Placa e Inmunotransferencia.**

Por medio de esta metodología fueron analizados 110 sueros tratados con carbón, affi-gel blue y neuraminidasa de individuos adultos mexicanos, que corresponden a 55 matrimonios. En este tipo de análisis se obtuvieron bandas de inmunotinción. En 105 de los casos estudiados (95.45%) se observaron 2 bandas bien definidas con un punto isoeléctrico de 6.50 y 6.63, como se muestra en la Figura 4, mientras que en 5 de las muestras (4.55%), se encontró un patrón de 4 bandas, siendo dos de ellas las mismas que en los casos anteriores, y las otras dos, bandas que presentaron un punto isoeléctrico más básico, de 6.70 y 6.76 (Figura 4).

Este patrón de corrimiento se encontró tanto en hombres como en mujeres e independientemente de la edad de los individuos. Por otra parte, se mantuvo en experimentos repetidos de las mismas muestras, y no se vió alterado aún cuando se cambiaron las condiciones de los experimentos, como aumentando la cantidad de neuraminidasa en el tratamiento de desialización, invirtiendo el sitio de colocación de las muestras en el isoelectroenfoque, ó cambiando el tiempo de éste, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 4.-** Patrones de bandas obtenidos en el isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en placa seguido de inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de muestras de suero desializadas. En A se muestra el patrón de bandas de la hSHBG obtenido en el 95.45% de los casos, denominado fenotipo silvestre. En B se muestra el fenotipo variante, encontrado en el 4.55% de los casos.



**Figura 5.-** Patrones de bandas obtenidos en el isoelectrofoque en geles de poliacrilamida en placa e inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de muestras de suero desializadas que presentaron el fenotipo silvestre y el variante de la hSHBG. En las líneas 1 y 2 se muestran las bandas de la hSHBG de fenotipo silvestre y variante desializadas con 0.05 U de neuraminidasa. En las líneas 3 y 4 se muestra el patrón de bandas de las mismas muestras, pero desializadas con 0.5 U de neuraminidasa. En las líneas 5 y 6, el patrón de bandas obtenido al depositar la muestra de suero en el extremo anódico del gel, en lugar de en el cátodo. En las líneas 7 y 8 se muestra el mismo patrón obtenido al correr el isoelectrofoque durante 18 hrs en lugar de 4 hrs.

Como fue mencionado en la sección de Material y Métodos, en uno de los isoelectroenfoques en placa se utilizó uno de los carriles para cortarlo en fragmentos de 5 mm, eluirlo en 0.5 ml de TG buffer y analizarlo por medio de ensayo de un sólo punto; los demás carriles se inmunotransfirieron y revelaron en la forma descrita anteriormente. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos, demostrándose que se encuentra un pico de unión a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona en la misma región del gel en la que se encuentran las bandas de inmunotinción correspondientes a la molécula de la hSHBG. La unión de la molécula observada tanto a un anticuerpo específico contra la hSHBG como a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona permite afirmar que la molécula que se está estudiando se trata efectivamente de la hSHBG.

En la Figura 7 se muestra la gráfica del gradiente de pH obtenido en los isoelectroenfoques en placa llevados a cabo, así como la del coeficiente de variación para cada uno de los pH medidos. Las flechas señalan la zona de pH donde enfocaron las bandas de la hSHBG y, como en el caso del isoelectroenfoque en tubo, éstas se localizaron en un área de pH de poca variación interensayo.

### **3).- Estudio Familiar.**

Con el objeto de demostrar si el patrón de 4 bandas encontrado en los individuos de este estudio representaba una variante genética dentro de la población y, por lo tanto, era heredable, se estudió la descendencia de 2 de los individuos que presentaron este patrón, y de 2 que presentaron el patrón silvestre de 2 bandas.

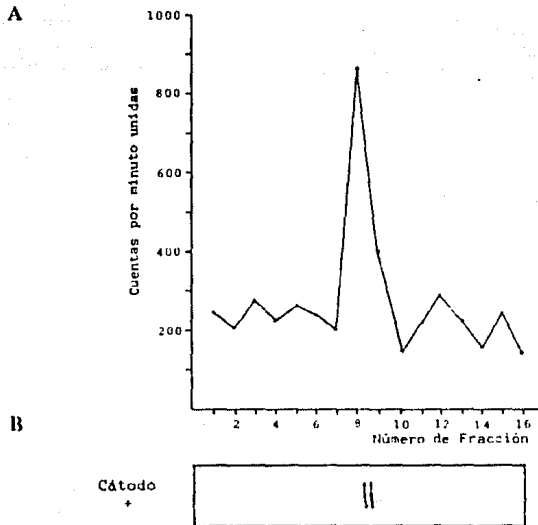


Figura 6.- A).- Perfil de unión del isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en placa de la hSHBC desializada, obtenido por medio de ensayo de un sólo punto de los eluatos de los fragmentos del gel. B).- Patrón de bandas obtenido por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida en placa e inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa, de la misma muestra que en A.



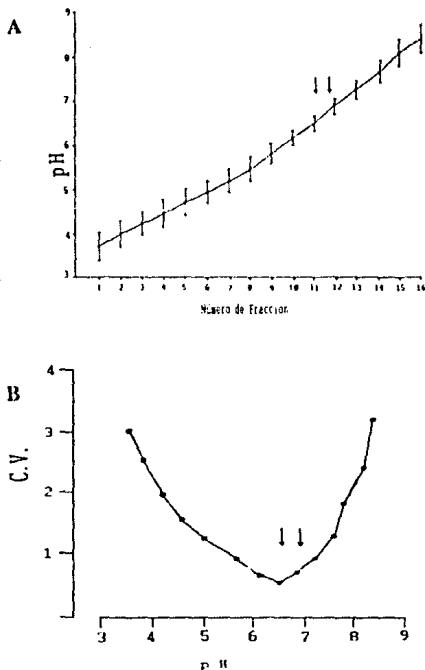


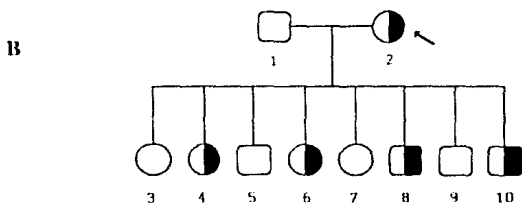
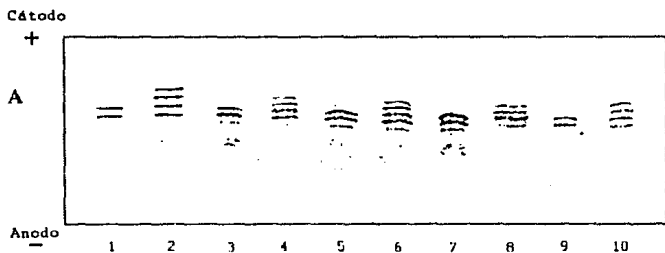
Figura 7.- A).-Gradiente de pH obtenido en el isoelectroenfoco en geles de poli(acrilamida) en placa. En cada punto se representa el promedio y la desviación estándar de 20 isoelectroenfocos diferentes. B).- Curva obtenida al graficar el coeficiente de variación obtenido para cada uno de los valores de pH medidos.

En la Figura 8 se muestra el estudio de la Familia N° 1, en el que la madre presentó el patrón variante de 4 bandas y el padre, el patrón silvestre de 2 bandas. Como puede observarse, la mitad de la descendencia de esta familia presentó el patrón variante de 4 bandas.

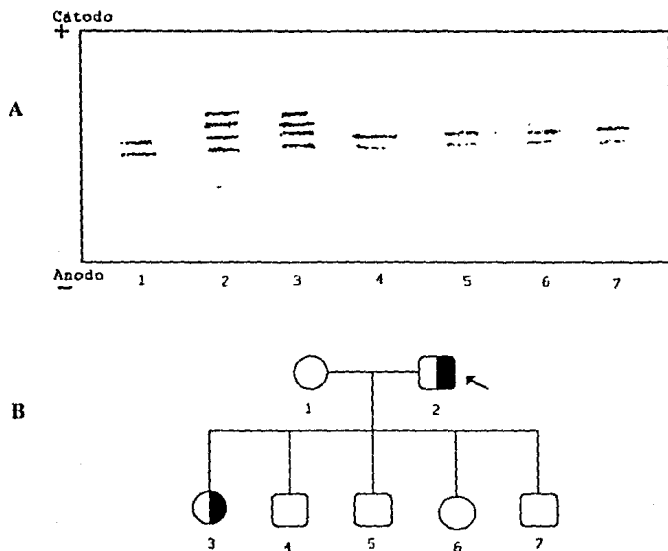
El estudio de la Familia N° 2 se muestra en la Figura 9. En este caso, el patrón de 4 bandas se presentó en el padre y en uno de los hijos.

En el análisis de las 2 familias (Familia N° 3 y Familia N° 4) en las que ambos padres presentaron el patrón de 2 bandas se encontró que toda la descendencia presentó también dicho patrón, en decir, que en ningún caso en el que los padres presentaran el patrón de 2 bandas se encontró un descendiente con el patrón de 4 bandas (figura 10).

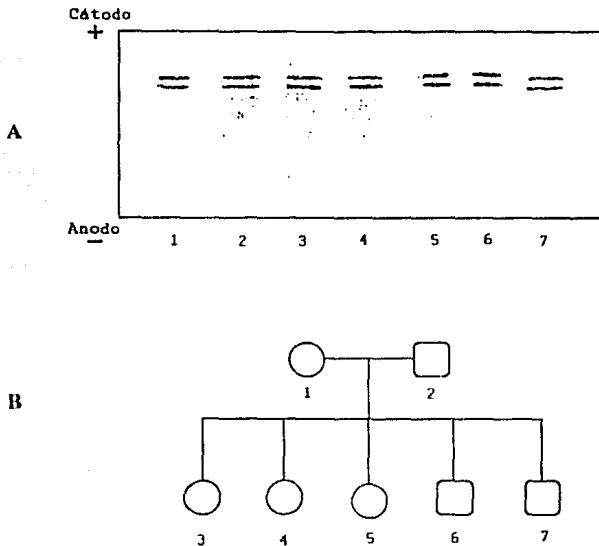
Después del análisis genético de los resultados obtenidos se pudo sugerir que la segregación de los fenotipos de la hSHBG corresponde posiblemente a un sistema de dos alelos codominantes autosómicos, que fueron denominados  $G^S$  y  $G^{H1}$ . El alelo  $G^S$  codificaría para las dos bandas con puntos isoeléctricos de 6.50 y 6.63, y el alelo  $G^{H1}$  codificaría para las dos bandas con puntos isoeléctricos de 6.70 y 6.76. De esta manera, el fenotipo silvestre ó más frecuente, que presenta el patrón de 2 bandas, estaría representado por el genotipo  $G^S G^S$ ; el fenotipo variante ó menos frecuente, que presenta el patrón de 4 bandas, correspondería al genotipo  $G^S G^{H1}$ . Evidentemente, existiría un tercer genotipo  $G^{H1} G^{H1}$  al que correspondería al fenotipo de las 2 bandas más básicas únicamente (presentes en el patrón de 4 bandas). Sin embargo, este caso no fue encontrado en la población de este estudio.



**Figura 8.-** A).- Patrón de bandas obtenido en el isoelectroenfoque en placa y la inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de las muestras de suero desializadas de la Familia N° 1. Las líneas 1 y 2 corresponden a los sueros de los padres, y de la 3 a la 10, a los sueros de los hijos. B).- Esquema de la transmisión de los fenotipos silvestre y variante en la familia N° 1. Los círculos representan a las mujeres, y los cuadrados, a los hombres. El color blanco indica el fenotipo silvestre, y el blanco-negro, el fenotipo variante.



**Figura 9.-** A).- Patrón de bandas obtenido en el isoelectrofoque en placa y la inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de las muestras de suero desializadas de la Familia N° 2. Las líneas 1 y 2 corresponden a los sueros de los padres, y del 3 al 7, a los sueros de los hijos. B).- Esquema de la transmisión de los fenotipos silvestre y variante en la Familia N° 2. Los círculos representan a las mujeres, y los cuadrados, a los hombres. El color blanco indica el fenotipo silvestre, y el blanco-negro, el fenotipo variante.



**Figura 10.-** A).- Patrón de bandas obtenido en el isoelectroenfoque en placa e inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de las muestras de suero desializadas de la Familia N° 3. Las líneas 1 y 2 representan a los sueros de los padres, y del 3 al 7, a los sueros de los hijos. B).- Esquema de la transmisión del fenotipo silvestre en la Familia N° 3. Los círculos representan a las mujeres, y los cuadrados, a los hombres. El color blanco indica el fenotipo silvestre.

Fueron calculadas las frecuencias génicas de los alelos y de los fenotipos encontrados en la población estudiada, así como las frecuencias esperadas para los fenotipos de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Como puede observarse, al comparar las frecuencias observadas con las esperadas por medio de una prueba de  $\chi^2$ , se obtuvo un valor de 0.058 que, para un grado de libertad, corresponde a una  $p > 0.80 < 0.90$ . Esto indica que las diferencias encontradas se deben únicamente al azar, por lo que se puede decir que la población estudiada se encuentra en equilibrio génico ó de Hardy-Weinberg. Por otra parte, se encontró una explicación al hecho de no haber encontrado el fenotipo  $C^{H^1}C^{H^1}$ , ya que su frecuencia génica esperada es de 0.05%, que implica que se encuentra en 1 de cada 2000 individuos.

#### 4).- Propiedades Físicoquímicas de las Variantes de la hSHBG.

Cabe señalar que las series de congelación y descongelación sucesivas a las que se sometieron algunas muestras de suero en el estudio, que se señala en la sección 1c de Material y Métodos, no alteraron las propiedades de unión a la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona de la molécula de la hSHBG, como se muestra en la Figura 11, ya que la unión de las muestras experimentales fue prácticamente igual a la de las muestras control, que sólo habían sido descongeladas una vez.

Se llevaron a cabo análisis de saturación a 4°C y a 28°C con sueros de 4 individuos que presentaron el fenotipo silvestre de 2 bandas de la hSHBG y de 5 individuos con el fenotipo de 4 bandas. Al representar los datos por medio de gráficas de Scatchard pudieron obtenerse las constantes de afinidad, constantes de disociación y el número de sitios de unión (concentración) de la molécula de

Fenotipo	Genotipo	Fenotipos observados		Fenotipos esperados*		$\chi^2$	P
		Nº	%	Nº	%		
Silvestre	$G^S G^S$	105	95.45	105.05	95.50	0.000023	>0.8 < 0.9
Variante	$G^S G^H$	5	4.55	4.88	4.44	0.00295	
Variante	$G^H G^H$	0	0	0.056	0.051	0.056	
Total		110	100.0	110.0	100.0	0.058973	

\* De acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg (Frecuencia esperada de  $G^S G^S = p^2$ ; frecuencia esperada de  $G^S G^H = 2pq$ ; frecuencia esperada de  $G^H G^H = q^2$ ).

Alelos	Número de alelos				Frecuencia de los alelos
	Silvestre $G^S G^S$	Variante $G^S G^H$	Variante $G^H G^H$	Total	
$G^S$	210	5	0	215	$P = 215/220 = 0.97727$
$G^H$	0	5	0	5	$q = 1 - p = 0.022727$

**Tabla 1.-** Frecuencias génicas observadas y esperadas para los alelos y los fenotipos encontrados en la población.

Porcentaje de Unión a  $^3\text{H}$ -DHT

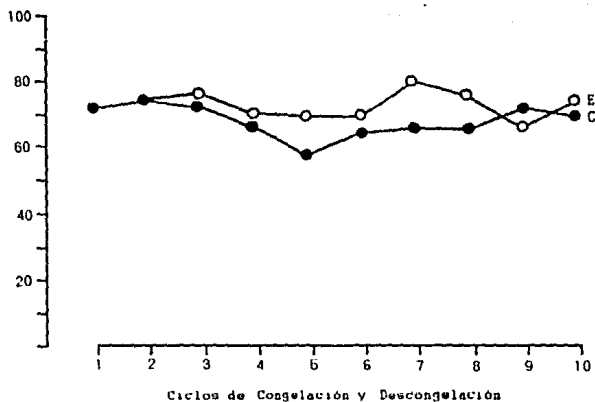


Figura 11.- Porcentaje de unión de la  $^3\text{H}$ -DHT a la hSHBG a través de 10 ciclos de congelación y descongelación de las muestras de suero. E-Experimental; C-Control (muestras descongeladas una vez solamente).



la hSHBG en estos sueros. En la Figura 12 se muestran las gráficas de Scatchard representativas de 2 individuos, uno con el fenotipo silvestre y el otro con el variante, obtenidas de análisis de saturación llevados a cabo a 4°C y 28°C. Así mismo, en la Tabla 2 se encuentran las constantes de afinidad y de disociación y el número de sitios de unión de los sueros analizados. Como puede observarse, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tres parámetros estudiados entre los individuos con el fenotipo silvestre y el variante, tanto a 4°C como a 28°C.

Otros parámetros fisicoquímicos que fueron medidos también son la velocidad de disociación (K-1) y el tiempo medio de disociación ( $t_{1/2}$ ) del complejo hSHBG-testosterona de las mismas muestras con fenotipo silvestre y variante, y, en ninguna de las dos condiciones experimentales utilizadas (a 4°C y a 28°C), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos fenotipos encontrados. Estos resultados se encuentran esquematizados en la Figura 13, y resumidos en la Tabla 3.

#### **5).- Análisis de las Muestras por Medio de SS-PAGE y Gráficas de Ferguson.**

En el sistema de SS-PAGE (Steady-State Polyacrylamide Gel Electrophoresis) el esteroide marcado radiativamente que funciona como ligando de la hSHBG para poder ser identificada después (5 $\alpha$ - dihidrotestosterona marcada con tritio), es incorporado al gel antes de su polimerización, de manera que la proteína, durante la electroforesis, se va uniendo al esteroide y migra conjuntamente con él, obteniéndose un pico de radiactividad en el fragmento de

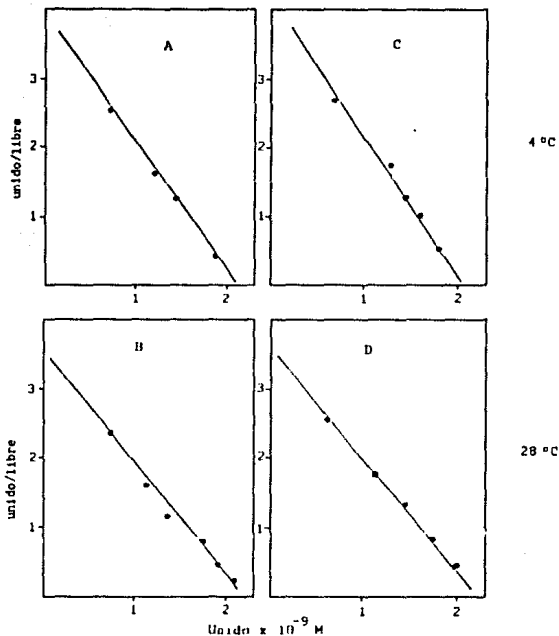


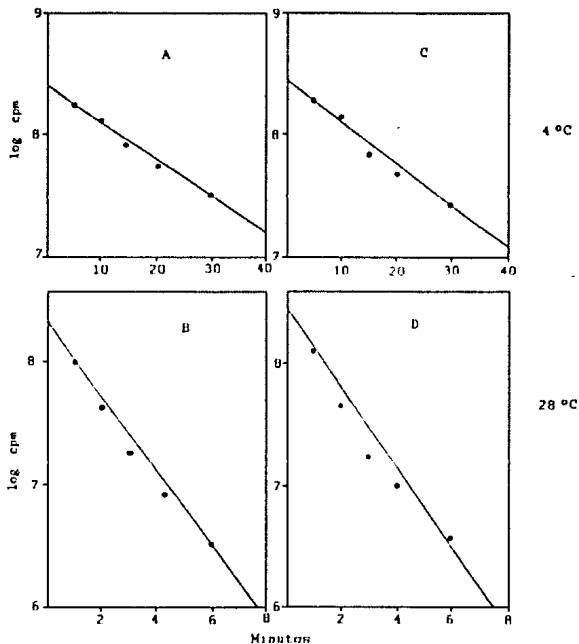
Figura 12.- Gráficas de Scatchard obtenidas con muestras de suero que presentaron el fenotipo silvestre (A y B) y el fenotipo variante (C y D) de la hSHBG, llevados a cabo a 4°C y a 28°C. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Fenotipo hSHBG	Sexo	4° C			28° C		
		M <sup>-1</sup>	M	pmol/ml	M <sup>-1</sup>	M	pmol/ml
<b>Silvestre</b>							
1	H	2.4x10 <sup>9</sup>	4.16x10 <sup>-10</sup>	22	1.2x10 <sup>9</sup>	8.3x10 <sup>-10</sup>	15
2	M	1.0x10 <sup>9</sup>	10.0x10 <sup>-10</sup>	43	1.5x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>-10</sup>	48
3	M	2.0x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>-10</sup>	40	2.0x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>-10</sup>	38
4	H	1.0x10 <sup>9</sup>	10.0x10 <sup>-10</sup>	16	1.0x10 <sup>9</sup>	10x10 <sup>-10</sup>	26
X±DE		1.6x10 <sup>9</sup> ±0.71	7.29x10 <sup>-1</sup> ± 3.14	30.25 ±13.27	1.4x10 <sup>9</sup> ±0.43	7.47x10 <sup>-10</sup> ±2.15	31.75 ±14.33
<b>Variante</b>							
1	M	1.1x10 <sup>9</sup>	9.09x10 <sup>-10</sup>	50	1.5x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>-10</sup>	54
2	M	2.0x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>-10</sup>	38	1.7x10 <sup>9</sup>	5.8x10 <sup>-10</sup>	42
3	H	2.0x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>-10</sup>	14	1.5x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>-10</sup>	16
4	H	1.0x10 <sup>9</sup>	10x10 <sup>-10</sup>	9	1.3x10 <sup>9</sup>	7.6x10 <sup>-10</sup>	10
5	H	1.7x10 <sup>9</sup>	5.8x10 <sup>-10</sup>	17	1.5x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>-10</sup>	15
X±DE		1.56x10 <sup>9</sup> ±0.48*	6.9x10 <sup>-10</sup> ±2.38*	25.6 ±17.5*	1.5x10 <sup>9</sup> ±0.14*	6.6x10 <sup>-10</sup> ±0.64*	27.4 ±19.41*

\* Diferencia estadísticamente no significativa (p>0.5).

**Tabla 2.-** Constantes de asociación (M<sup>-1</sup>), constantes de disociación (M) y concentraciones (pmol/ml) de la hSHBG con fenotipo silvestre y variante.



**Figura 13.-** Representación gráfica de la velocidad de disociación del complejo hSHBG-testosterona en muestras de suero con fenotipo silvestre (A y B) y con fenotipo variante (C y D), a 4°C y a 28°C. Cada punto representa el promedio obtenido de tres determinaciones.

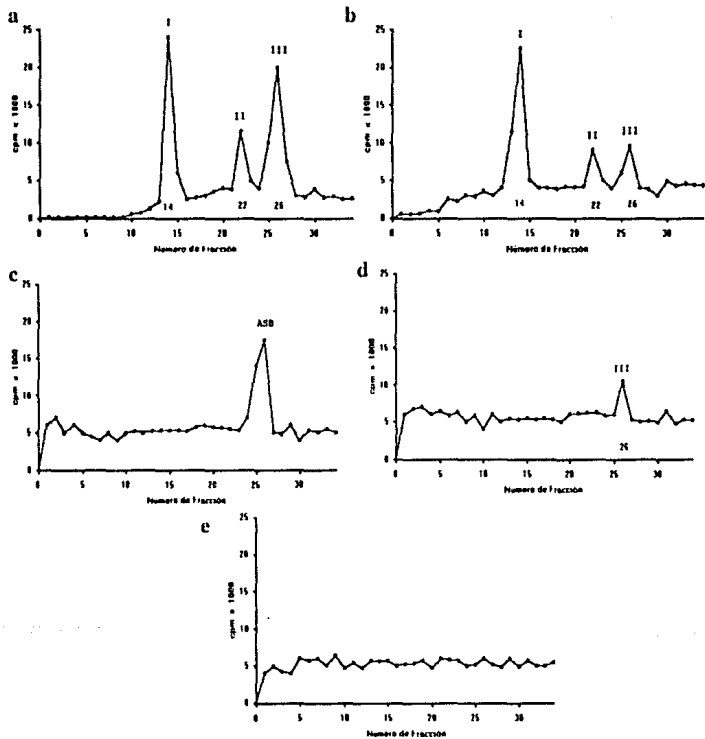
Fenotipo	4 ° C		28° C	
	K-1 (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)	K-1 (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)
Silvestre	0.0342±0.0017	20.13±1.29	0.250±0.024	2.6+0.26
Variante	0.0320±0.004*	20.58±0.56*	0.250±0.043*	2.9+0.58*

\*Diferencia estadísticamente no significativa (p>0.5).

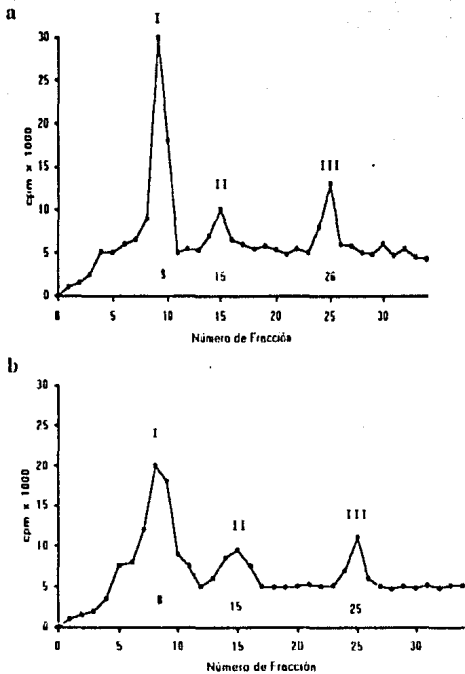
**Tabla 3.-** Velocidad de disociación (K-1) y tiempo medio de disociación (t<sub>1/2</sub>) de la hSHBC de fenotipo silvestre y variante.

gel en el que se localiza la proteína unida a la  $^3\text{H}$ - DHT. Por este método pueden detectarse uno ó varios componentes de la muestra que unan al esteroide marcado pero que tengan diferentes movilidades electroforéticas, e incluso calcular su concentración y velocidad de disociación cuando en el sistema se alcanza un equilibrio entre los sitios de unión y el ligando (cuando la velocidad de asociación y de disociación se hacen iguales).

Por medio de este sistema fueron analizadas 4 muestras de suero de individuos con el fenotipo silvestre y 4 con el fenotipo variante de la hSHBG, y los resultados obtenidos se encuentran ejemplificados en las Figuras 14 y 15. En la Figura 14 se muestran las gráficas obtenidas al utilizar un suero con fenotipo silvestre (a) y uno con fenotipo variante (b) tratados con carbón y affi-gel blue. Como puede observarse, se encuentran constituidas por tres picos de unión donde el primero corresponde a la molécula de la hSHBG, el segundo, a la molécula de la Globulina Transportadora de Corticosteroides (hCBG), y el tercero, a la molécula de albúmina, de acuerdo con el trabajo de Ritzén y colaboradores (105). Además, en la Figura 14c se muestra la curva obtenida al someter a SS-PAGE una muestra de albúmina pura, cuyo máximo corresponde con el tercer pico de las gráficas obtenidas con suero. Por otra parte, al añadir un exceso de DHT no marcada en el gel, se obtuvo únicamente el pico de unión correspondiente a la albúmina, ya que tanto la hSHBG como la hCBG presentan una unión específica a la DHT, y por lo tanto, son desplazadas por un exceso del ligando no marcado (Figura 14d), al contrario de lo que sucede con la albúmina, cuya unión es inespecífica. En la Figura 14e se muestra la gráfica obtenida al contar la radiactividad de los fragmentos de un gel en el que no se corrió ninguna muestra.



**Figura 14** a).-Perfil de radiactividad obtenido al someter a SS-PAGE una muestra de suero no desializada con el fenotipo silvestre. b).- SS-PAGE de una muestra de suero no desializada con fenotipo variante. c).- SS-PAGE de una muestra de albúmina sérica bovina pura. d).- SS-PAGE de una muestra de suero no desializada, en el que se incorporó un exceso de DHT no radiactiva en el gel de resolución (Unión no Específica). e).- Gráfica obtenida de un gel de SS-PAGE en el que no se depositó ninguna muestra. I-hSHBG; II-hCBG; III- hAlb.



**Figura 15.-** Perfiles de radiactividad obtenidos al someter a SS-PAGE muestras de suero desializadas con fenotipo silvestre (a) y con fenotipo variante (b). I-hSHBG; II- hCBG; III-hAlb.



En este caso, los picos correspondientes a la hSHBG de las muestras de suero con fenotipo silvestre y variante tratadas con carbón y affi-gel blue (no desializadas) tuvieron sus máximos en la misma fracción del gel (al igual que los picos correspondientes a la hCBG y la hAlb.), por lo que no se encontraron diferencias entre la hSHBG silvestre y la hSHBG variante, no desializadas.

En la Figura 15 se muestran las gráficas obtenidas al someter a SS-PAGE muestras de suero con fenotipo silvestre y fenotipo variante tratadas con carbón, affi-gel blue y neuraminidasa. Como puede observarse, se encuentran constituidas también por 3 picos de unión, pero los máximos correspondientes a la hSHBG y a la hCBG se encuentran más cerca del inicio del gel, ya que el tratamiento con neuraminidasa altera las propiedades de carga de ambas moléculas debido a la eliminación de residuos de ácido siálico. El pico correspondiente a la albúmina no se altera, ya que ésta no se encuentra glicosilada.

En este caso, la hSHBG del suero con fenotipo variante presentó una menor movilidad electroforética con respecto a la del suero con fenotipo silvestre, variación que no se encontró para el caso de la hCBG ni de la albúmina. Debido a esto, se profundizó este estudio con la utilización de las gráficas de Ferguson.

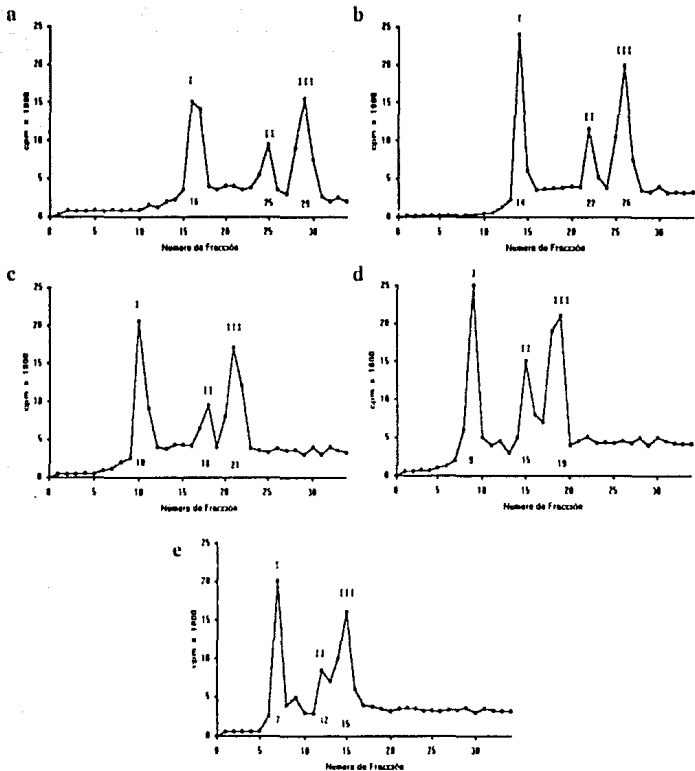
Como se explica en la sección de Material y Métodos, para la obtención de las gráficas de Ferguson se utiliza el mismo sistema del SS-PAGE, pero corriendo cada muestra en geles con diferentes concentraciones de acrilamida. Los resultados obtenidos se grafican como el logaritmo base 10 del Rf (número de fracción en que sale el pico entre el número de fracciones totales) contra la concentración de acrilamida en el gel, resultando de esta manera una recta característica de cada

proteína, que es un reflejo de su carga (expresándose como movilidad relativa a una concentración de acrilamida de 0%) y de su peso molecular (expresado como coeficiente de retardo relativo). Con este método pueden identificarse proteínas diferentes con el mismo peso molecular pero con diferente carga, y viceversa (si las rectas obtenidas de dos proteínas cruzan el eje de las  $y$  en el mismo lugar significa que dichas proteínas tienen la misma carga; si las proteínas tienen el mismo peso molecular, las rectas deben ser paralelas).

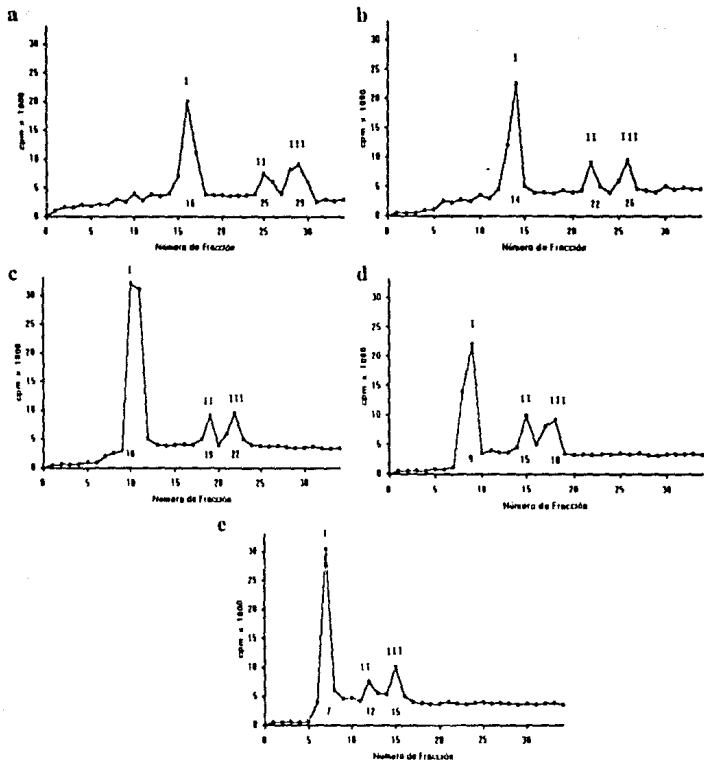
En este estudio se analizaron 3 muestras de suero de individuos con el fenotipo silvestre y 3 con el fenotipo variante de la hSHBG, y las gráficas obtenidas se encuentran ejemplificadas en las Figuras 16 a 21.

En las Figuras 16 y 17 se muestran las gráficas obtenidas al someter al sistema de SS-PAGE con diferentes concentraciones de acrilamida en el gel (5%, 6%, 7.5%, 8.5% y 10%), muestras de suero con el fenotipo silvestre (Figura 16) y el variante (Figura 17) tratadas con carbón y affi-gel blue. Como puede observarse, la movilidad electroforética de los picos va disminuyendo al aumentar la concentración de acrilamida. En este caso, los picos obtenidos para el caso del fenotipo silvestre y para el variante fueron prácticamente iguales, lo cual puede ser observado gráficamente en la Figura 18, donde se muestra que las gráficas de Ferguson obtenidas para cada una de las moléculas del fenotipo silvestre fueron iguales a las del fenotipo variante. Esto significa que ambas moléculas, no desializadas, tienen la misma carga.

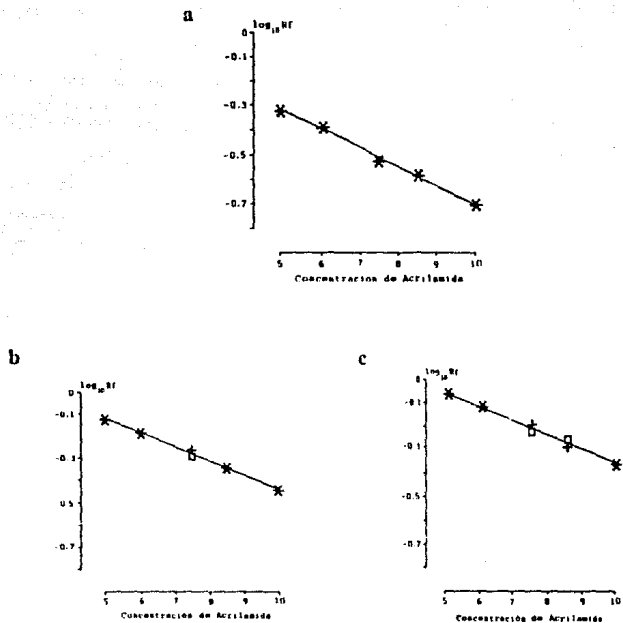
En las Figuras 19 y 20 se muestran las gráficas obtenidas de sueros con fenotipo silvestre y variante tratadas con carbón, affi-gel blue y neuraminidasa. En



**Figura 16.-** Perfiles de radiactividad obtenidos al someter a SS-PAGE una muestra de suero no desializada con fenotipo silvestre, utilizando diferentes concentraciones de acrilamida en el gel: 5% (a), 6% (b), 7.5% (c), 8.5% (d) y 10% (e). I-hSHBG; II-hCBG; III-hAlb.



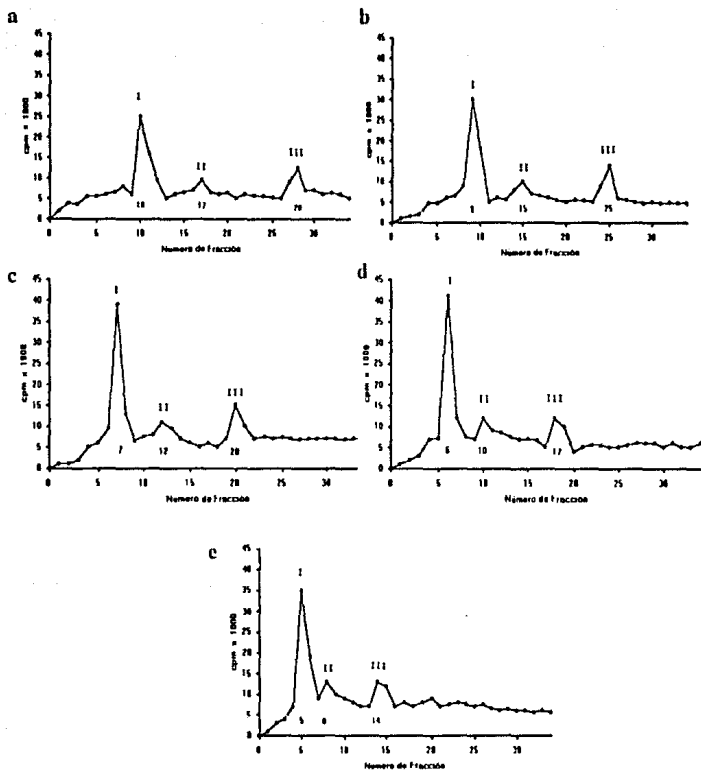
**Figura 17.-** Perfiles de radiactividad obtenidos al someter a SS-PAGE una muestra de suero no desializada con fenotipo variante, utilizando diferentes concentraciones de acrilamida en el gel: 5% (a), 6% (b), 7.5% (c), 8.5% (d) y 10% (e). I-hSHBG; II-hCBG; III-hAlb.



**Figura 18.-** Gráficas de Ferguson obtenidas para la hSHBG (a), la hCBG (b) y la hAlb (c) de muestras de suero no desializadas con fenotipo silvestre (  $\square$  ) y fenotipo variante ( + ). \* - coincidencia de  $\square$  y + , Rf - número de fracción en que sale el pico de la curva entre el número de fracciones totales.

este caso se observa que el pico correspondiente a la molécula de la hSHBG de la muestra desializada con fenotipo variante presentó en todos los casos una menor movilidad electroforética con respecto a la molécula de la hSHBG del fenotipo silvestre, cosa que no sucedió para el caso de la hCBG ni de la albúmina. En la Figura 21 se muestran las gráficas de Ferguson obtenidas en este caso, y cabe señalar que en las rectas obtenidas para la hSHBG de ambos fenotipos varía el punto en que ambas rectas cruzan el eje de las y. Esto permite decir que, después del tratamiento con neuraminidasa, se hace evidente un cambio en las propiedades de carga de la proteína, es decir, que la molécula de la hSHBG desializada del fenotipo silvestre y la del fenotipo variante son diferentes en cuanto a su carga. Esto no se presentó en el caso de la hCBG ni de la albúmina.

Al comparar las gráficas de Ferguson de las muestras sializadas y desializadas (Figura 22) se confirma que el tratamiento con neuraminidasa cambia la carga de las moléculas de la hSHBG y de la hCBG, pero no de la albúmina ya que, como se mencionó anteriormente, ésta última no se encuentra glicosilada.



**Figura 19.-** Perfiles de radiactividad obtenidos al someter a SS-PAGE una muestra de suero desializado con fenotipo silvestre, utilizando diferentes concentraciones de acrilamida en el gel: 5% (a), 6% (b), 7.5% (c), 8.5% (d) y 10% (e). I-hSHBG; II-hCBG; III-hAlb.

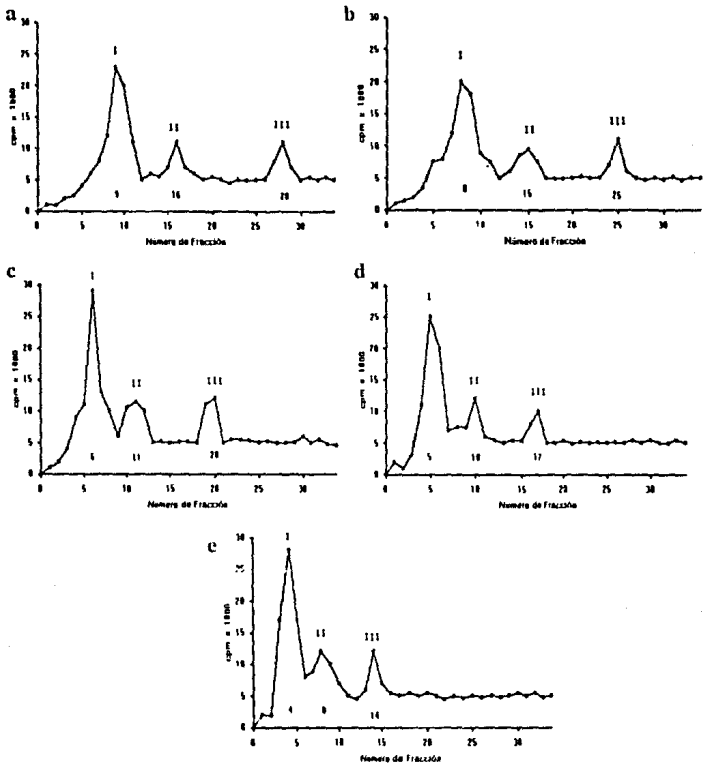
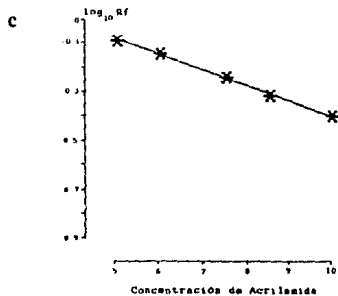
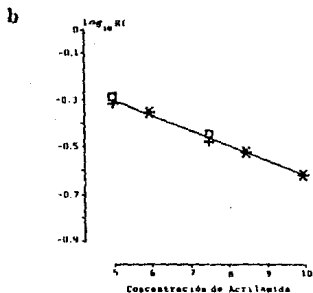
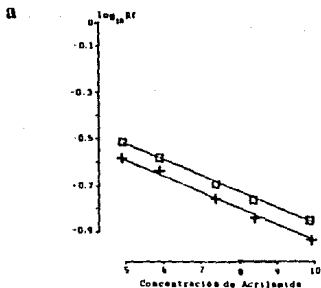
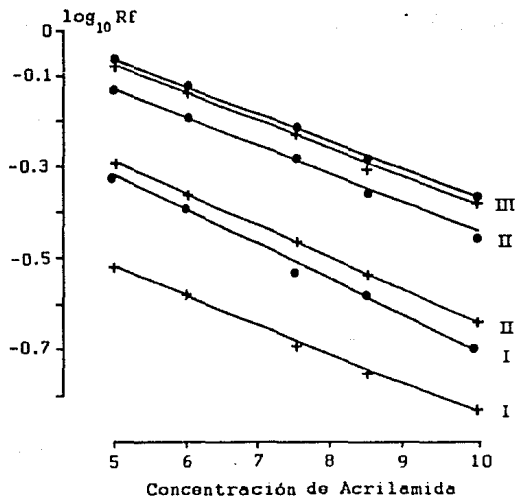


Figura 20.- Perfiles de radiactividad obtenidos al someter a SS-PAGE una muestra de suero desializada con fenotipo variante, utilizando diferentes concentraciones de acrilamida en el gel: 5% (a), 6% (b), 7.5% (c), 8.5% (d) y 10% (e). I-hSHBG; II-hCBC; III-hAlb.





**Figura 21.-** Gráficas de Ferguson obtenidas para la hSHBC (a), la hCBG (b) y la hAlb (c) de muestras de suero desializadas con fenotipo silvestre ( □ ) y fenotipo variante ( + ). \* - Coincidencia de □ y +. Rf-número de fracción en que sale el pico de la curva entre el número de fracciones totales.



**Figura 22.-** Gráficas de Ferguson obtenidas para la hSHBG (I), la hCBG (II) y la hAlb (III) de muestras de suero con fenotipo silvestre no tratada ( ● ) y tratada ( + ) con neuraminidasa. Rf-número de fracción en que sale el pico de la curva entre el número de fracciones totales.

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo el establecimiento de la existencia de polimorfismo genético en la estructura de la molécula de la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales en una muestra representativa de la población mexicana, como una estrategia para alcanzar un conocimiento más profundo acerca de la estructura y función de la hSHBG.

El polimorfismo genético en las proteínas de los seres vivos es un fenómeno ampliamente distribuido tanto en plantas como en animales, y es el resultado, en su mayor parte, de mutaciones en los genes originales para dichas proteínas. Para el caso concreto de los seres humanos, se considera que del 30 al 80% de los loci génicos son polimórficos en las poblaciones; la tasa promedio de mutación por gen y por generación es de  $10^{-5}$ , de manera que si la población está conformada por 6,000 millones de individuos, en cada generación surgen un promedio de 120,000 mutaciones nuevas en cada locus de la humanidad (107).

En la mayoría de los casos, las mutaciones consisten en la sustitución de un sólo nucleótido del DNA. Gran parte de estas mutaciones provocan la sustitución de un sólo aminoácido en la cadena polipeptídica de la proteína codificada por el gen mutante. Sin embargo, en muchos de los casos se presentan mutaciones silenciosas debido a la "degeneración" del código genético, es decir, que algunos aminoácidos pueden ser codificados por más de un triplete; una mutación puede transformar un triplete en otro que codifique para el mismo aminoácido, de manera que la proteína producida por el gen mutado sea la misma que la codificada por el gen original. Este tipo de mutaciones, aunque alteran la secuencia de nucleótidos de un determinado gen, no provocan ninguna consecuencia para el organismo. Tal es el caso también de las mutaciones que ocurren en las regiones del DNA que no se traducen, como los intrones (94).

Por otro lado, las mutaciones que provocan cambios en las proteínas codificadas por el gen pueden producir cambios que confieran una mayor ó una menor eficacia biológica a sus portadores. Las mutaciones que confieren una mayor eficacia biológica permanecen y se propagan en la población, mientras que las que provocan un cambio negativo desaparecen o se mantienen con frecuencias muy bajas en las poblaciones, ambas por medio de selección natural. Sin embargo, la gran mayoría de los cambios mutacionales a nivel molecular y de los polimorfismos encontrados en las poblaciones naturales son simplemente neutros ó adaptativamente equivalentes. La selección natural no favorece, pero tampoco discrimina a las variantes neutras, por lo que su destino en las poblaciones está determinado por el azar y su distribución se lleva a cabo por medio de la deriva génica. Por dicha razón, las poblaciones pueden acumular sin restricción alguna esas cantidades inmensas de variabilidad genética encontradas en ellas. De hecho, la evolución molecular consiste principalmente en la sustitución gradual de una

secuencia de aminoácidos por otra funcionalmente equivalente a la primera (108,109,110).

Existen gran cantidad de ejemplos de proteínas humanas que presentan algún tipo de polimorfismo genético. Un caso muy representativo es el de los grupos sanguíneos, en los que se han encontrado 45 genes polimórficos que dan como resultado los diferentes tipos sanguíneos existentes en la población (111). Otro ejemplo muy característico es el del sistema de antígenos de histocompatibilidad (HLA), que se encuentra codificado por tres locus génicos constituidos a su vez por un gran número de alelos (95). También pueden encontrarse muchos ejemplos de polimorfismos genéticos en las isoenzimas, en las mioglobinas, la antitrombina, y en las globulinas transportadoras del plasma, como la Globulina Transportadora de Corticosteroides (98,99) y la Globulina Transportadora de Tiroxina (97). En ambos casos se han descrito variantes genéticas resultado de una sustitución de aminoácidos en la cadena polipeptídica de la molécula, y que presentan ningún ó diferentes grados de alteración en el funcionamiento de dichas globulinas.

El método comúnmente utilizado para la detección de variantes genéticas es la electroforesis de proteínas, con la que pueden detectarse cambios que afectan la carga neta de la proteína ó su estructura secundaria o terciaria, que son, en la mayoría de los casos, cambios en la secuencia de aminoácidos de dicha proteína. La detección de un cambio en la secuencia de aminoácidos, implica la existencia de variabilidad en el gen que la codifica, por lo que las técnicas de electroforesis permiten la detección de variantes alélicas en genes individuales (94).

En el presente trabajo el método que se utilizó para la identificación de las variantes genéticas de la hSHBG fue el isoelectroenfoque, que es un tipo de electroforesis que separa a las moléculas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Esta metodología permite diferenciar moléculas con diferentes propiedades de carga (punto isoeléctrico) aunque sus pesos moleculares sean iguales o muy parecidos; un cambio pequeño, como la sustitución, adición ó pérdida de un aminoácido, puede alterar la carga neta de una molécula sin producir cambios notables en su peso molecular. Analizando el código genético y las propiedades eléctricas de los aminoácidos, se ha calculado que el 30% de las sustituciones en la secuencia de bases del DNA dá como resultado un cambio en la carga de la proteína codificada; un sólo cambio en la carga de la molécula produce cambios significativos en su posición de isoelectroenfoque (112).

Es importante señalar que las técnicas de obtención, almacenamiento y manejo de los sueros, así como los procedimientos para la eliminación de esteroides endógenos y de albúmina, el tratamiento con neuraminidasa, los análisis de unión y saturación, los estudios de las propiedades fisicoquímicas y las técnicas de electroforesis e isoelectroenfoque llevados a cabo en este estudio fueron adecuados en términos de la preservación de la molécula de la hSHBG, ya que siempre se mantuvieron sus propiedades de unión a esteroides y su reconocimiento por anticuerpos específicos.

Inicialmente fueron analizadas 250 muestras de suero de individuos adultos mexicanos por medio de la técnica de isoelectroenfoque en tubo. Con este sistema fue posible analizar el punto isoeléctrico de la molécula de la hSHBG, ya que en cada muestra se obtuvo un pico bien definido situado en una zona del gel

en la que el valor del pH presentó una baja variabilidad interensayo (Figuras 1 y 3), y con puntos isoeléctricos semejantes a los anteriormente reportados. También pudieron apreciarse cambios gruesos en las propiedades de carga de la hSHBG como los provocados por el tratamiento con neuraminidasa, que desplazó el pico de la hSHBG de un pH de 5.4-5.85 a uno de 6.9. En cuanto a la microheterogeneidad de la molécula, sólo pudo apreciarse que la curva de enfoque es más ancha en el caso de la hSHBG no tratada con neuraminidasa con respecto a la tratada. Sin embargo, por medio de este sistema no fue posible demostrar la presencia de variantes en la molécula de la hSHBG en los sueros analizados, por lo que el estudio fue continuado con la utilización del sistema de isoelectroenfoque en placa seguido de la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa, con su posterior revelado por medio de inmunotinción.

La técnica de isoelectroenfoque en placa e inmunotransferencia resultó ser adecuada para el análisis del punto isoeléctrico de la hSHBG, ya que se obtuvieron bandas bien definidas localizadas en un área de pH con baja variabilidad interensayo (Figura 7), especialmente para las muestras de suero desializadas, ya que en el caso de la proteína nativa no desializada se obtuvo una franja amplia de varias bandas no claramente definidas.

Por medio de esta metodología fueron analizados 110 sueros de individuos adultos mexicanos, correspondientes a 55 matrimonios, y se lograron identificar 2 fenotipos con distinto patrón de bandas de isoelectroenfoque de la hSHBG (Figura 4): un fenotipo más frecuente, al que se le denominó silvestre, encontrado en el 95.45% de los casos, que presentó 2 bandas claras y definidas con puntos isoeléctricos de 6.50 y 6.63; y un fenotipo menos frecuente, llamado



variante, presente en el 4.55% de los casos, en el que se observaron 4 bandas con puntos isoeléctricos de 6.50, 6.63, 6.70 y 6.76. En el fenotipo variante, las dos primeras bandas (más ácidas) correspondieron a las encontradas en el fenotipo silvestre, y las otras dos se localizaron en un área de pH más básico con respecto a las anteriores, hacia el extremo catódico del gel.

La hSHBG es una glicoproteína dimérica constituida por dos subunidades de diferente peso molecular. Aparentemente, las 2 subunidades poseen la misma secuencia de aminoácidos, pero sus pesos varían debido a que se encuentran glicosiladas de manera diferente (41). Esto hace también que, al ser analizada por medio de isoelectroenfoque, esta proteína presente microheterogeneidad por carga, debida principalmente a una adición desigual de residuos de ácido siálico durante el proceso de glicosilación (15,26,34,41,50). Es por esta razón que en el presente trabajo se utilizaron muestras de suero tratadas previamente con neuraminidasa (enzima que elimina los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas), para poder apreciar mejor los cambios en las propiedades de carga intrínsecos de la molécula.

La presencia de dos bandas en el isoelectroenfoque de la hSHBG desializada silvestre revela que existe microheterogeneidad en la carga de la molécula aún después del tratamiento con neuraminidasa. Aunque en el presente trabajo no fue cuantificada la fracción de ácido siálico eliminado por el tratamiento con neuraminidasa, éste fue suficiente para reducir el número de bandas de isoelectroenfoque y aumentar sus puntos isoeléctricos. De todas maneras, la presencia de las dos bandas podría atribuirse a una deficiente desialización de la

molécula, lo que no es muy probable debido a que se encontraron aún utilizando mayores cantidades de neuraminidasa en el tratamiento (Figura 5).

La presencia de varias bandas en el isoelectroenfoque de la hSHBG aún después de su aparente desialización ha sido también reportada en varios casos (34, 41, 36, 26), atribuyéndose a variaciones en otros carbohidratos o a cambios en la secuencia de aminoácidos de la molécula (113). Debido a que actualmente es aceptado que la molécula de la hSHBG está compuesta por 2 subunidades iguales, productos de un mismo gen, la presencia de las 2 bandas no podría deberse a diferencias en la secuencia de aminoácidos de las subunidades. Sin embargo, sí podría atribuirse a variaciones en los procesos postraduccionales, como la adición desigual de carbohidratos, aparte del ácido siálico, durante la glicosilación de la molécula. Esta propuesta estaría apoyada por los trabajos de Cheng y colaboradores (34) y de Danzo y colaboradores (41), en los que se reporta que el tratamiento con otras glucosidasas, como la N-glicanasa, aumenta el punto isoeléctrico de las bandas de la hSHBG desializada. Las 2 bandas encontradas podrían representar entonces dos grupos de moléculas de la hSHBG con diferentes carbohidratos incorporados en su estructura que les confirieran diferentes propiedades de carga.

Otra explicación que podría darse para la presencia de las 2 bandas es la variación en el contenido de amidas en las moléculas, como ha sido sugerido por Grimaldi y colaboradores (114) ó la formación de grupos carboxilo  $\alpha$  ó  $\beta$  libres de imidas cíclicas formadas por la unión Asn-Gly entre los residuos 20 y 335 de la molécula de la hSHBG (115).

En cuanto al fenotipo variante encontrado en la población puede decirse que las dos bandas adicionales encontradas en este fenotipo no fueron el resultado de cambios en las propiedades de carga de la proteína durante el proceso experimental, ya que estuvieron presentes siempre en experimentos sucesivos y con muestras de suero obtenidas y tratadas en diferentes ocasiones. Tampoco se debieron a un electroenfoque inadecuado, ya que se observaron bajo diferentes condiciones experimentales, como aumentando el tiempo de isoelectroenfoque ó cambiando el sitio de aplicación de las muestras (Figura 5). Fueron descartadas también alteraciones en la estructura de la molécula de la hSHBG como resultado de la degradación de la proteína ya que, como se mencionó anteriormente, el fenotipo silvestre y el variante fueron observados en experimentos repetidos y con muestras de suero obtenidas y tratadas en diferentes ocasiones; además, tanto el anticuerpo como el ligando ( $5\alpha$ - dihidrotestosterona ó testosterona) mantuvieron su capacidad de unión a la hSHBG en todos los casos. La deficiente desialización de la hSHBG bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio no fue tampoco la causa de la presencia de las dos bandas adicionales en el fenotipo variante, ya que éstas siempre estuvieron presentes, aún en el caso de sueros tratados con una mayor cantidad de neuraminidasa (Figura 5), y se observaron siempre en regiones más básicas del isoelectroenfoque en relación a las bandas del fenotipo silvestre.

Por otra parte, la presencia del patrón de 4 bandas resultó estar genéticamente determinado, ya que se encontró en la descendencia de dos matrimonios estudiados en los que uno de los miembros de la pareja presentó el fenotipo variante (Figuras 8 y 9). En apoyo a estas observaciones, en el estudio de dos familias en las que ambos padres presentaron el fenotipo silvestre, siempre se encontró el patrón de 2 bandas en los hijos, sin evidencia en ningún caso del

fenotipo variante (Figura 10). Tanto el fenotipo silvestre como el variante se encontraron indistintamente en hombres como en mujeres e independientemente de la edad de los individuos.

Finalmente, el patrón de bandas obtenido en el caso de la variante (dos bandas adicionales al patrón normal de dos bandas, con puntos isoelectrónicos más básicos) hace pensar que la causa de la aparición de las bandas más básicas es un cambio en la estructura de la proteína que modifica las propiedades de carga de la molécula y que provoca un corrimiento en el punto isoelectrónico de las dos bandas hacia valores de pH más básicos. Como, además, se encuentra genéticamente determinado, este cambio en la estructura de la proteína se debe seguramente a una mutación en el gen de la hSHBG (originando al alelo  $G^H$ ), que dá como consecuencia la sustitución de algún aminoácido cargado en la cadena polipeptídica de la proteína, hipótesis que será probada en estudios posteriores al tratar de demostrar un cambio en la secuencia de nucleótidos del alelo  $G^H$  con respecto al alelo  $G^S$ .

Analizando todos estos datos desde el punto de vista genético se pudo sugerir que la molécula de la hSHBG se encuentra codificada por un gen autosómico constituido por dos alelos que se expresan de manera codominante. Los alelos fueron denominados  $G^S$  y  $G^H$ , siendo el alelo  $G^S$  el que codifica para las dos bandas con puntos isoelectrónicos de 6.50 y 6.63, y el alelo  $G^H$  el que codifica para las dos bandas de puntos isoelectrónicos de 6.70 y 6.76. De esta manera, el fenotipo silvestre (dos bandas) representa al genotipo homocigoto  $G^S G^S$ , y el fenotipo variante (cuatro bandas), al genotipo heterocigoto  $G^S G^H$ . Como los alelos se expresan de manera codominante, en los sujetos con fenotipo variante se

encuentran las dos bandas del alelo original y las dos bandas del alelo mutante. Existe entonces un tercer genotipo, el homocigoto  $G^H G^H$ , cuyo fenotipo estaría constituido por las dos bandas más básicas únicamente. Desafortunadamente, este último fenotipo no fue encontrado en la población estudiada.

La información básica que se obtiene de los análisis electroforéticos de la variabilidad proteica son las frecuencias genotípicas ó las frecuencias génicas de cierto locus en una población determinada. Para el caso concreto de la población estudiada en este trabajo, el cálculo de las frecuencias génicas observadas y esperadas para cada uno de los fenotipos encontrados indicó que la población se encuentra en equilibrio génico de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, ya que las frecuencias génicas observadas concordaron con las esperadas para un locus polimórfico constituido por dos alelos ( $X^2 = 0.053$ ,  $p > 0.8 < 0.9$ , Tabla 1). Por otro lado, también ofreció una explicación al hecho de no haber encontrado el fenotipo  $G^H G^H$  en la población, ya que su frecuencia esperada es de 0.050, lo que implica una probabilidad de encontrar 1 sujeto en 2000 homocigoto para la variante .

Si el polimorfismo genético se define como la presencia simultánea en una población de dos ó más alelos de cualquier sistema, en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente, y su valor es superior a 0.01 ó 0.05, según el criterio aplicado (95), entonces en el presente trabajo se estableció la existencia de polimorfismo genético en la molécula de la hSHBG en la población mexicana, ya que se sugirió que el gen que codifica para dicha globulina está constituido por dos alelos, el más raro de los cuales tiene una frecuencia de 0.0227.

Aparentemente, el cambio en la molécula de la hSHBG existente en el fenotipo variante no afecta las propiedades fisicoquímicas de la proteína, ya que tanto las constantes de asociación y disociación, como la velocidad de disociación y el tiempo medio de disociación de la molécula variante se encontraron dentro de los límites establecidos para el fenotipo silvestre en los dos sistemas experimentales utilizados en este estudio (4°C y 28°C) (Tablas 2 y 3). Las concentraciones circulantes de la hSHBG en los sujetos de fenotipo variante se encontraron también dentro de los valores normales (Tabla 2). Estos resultados, aunados a que no se encontró ninguna patología asociada a la presencia de la variante de la hSHBG, permiten suponer que se trata de un cambio neutro desde el punto de vista de la eficacia biológica de la molécula de la hSHBG. Sin embargo, resultaría de mucho interés el análisis de las propiedades de unión de la hSHBG de individuos homocigotos  $G^H G^H$  para poder determinar si verdaderamente el cambio en la molécula no afecta sus propiedades biológicas, ó si lo que sucede es que en el heterocigoto  $G^S G^H$  éste no se hace evidente debido a la presencia de las dos bandas normales.

Una evidencia adicional de la existencia de polimorfismo estructural de la hSHBG resultó del análisis por el método de gráficas de Ferguson de muestras de suero desializadas de individuos con el fenotipo silvestre y el variante. Con este método fue posible apreciar que la molécula de la hSHBG silvestre y la variante presentan diferencias en sus propiedades de carga cuando son sometidas al sistema de SS-PAGE bajo diferentes concentraciones de acrilamida (Figura 21). El tratamiento con neuraminidasa fue fundamental para apreciar las diferencias entre ambas moléculas debido, posiblemente, a que la sialización de las proteínas enmascara las diferencias de carga no debidas a la desigual adición de ácido siálico. Esto mismo sucedió en el isoelectroenfoque en placa, ya que al analizar

sueros con fenotipo silvestre y variante no desializados por medio de esta metodología, se obtuvo una franja amplia de bandas en la que no se pudo apreciar ninguna diferencia entre ambas moléculas.

La existencia de variantes genéticas de la hSHBG ya ha sido descrita por Luckock y Cavalli-Sforza (101) y por Ahrensén y colaboradores (100). Este estudio apoya y extiende las observaciones de estos autores. Sin embargo, en el trabajo de Luckock y Cavalli-Sforza se propone que la hSHBG está codificada por un gen constituido por tres alelos, dos de ellos codominantes y uno recesivo, que provocan la existencia de 4 fenotipos (normal, lento, ancho y ausente), cuando la molécula es analizada por medio de la electroforesis en geles nativos de muestras de suero marcadas in vitro con  $^{14}\text{C}$ -testosterona. Sus resultados coinciden adecuadamente con el sistema de herencia que proponen, ya que la población estudiada se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg de acuerdo con los datos que obtienen. Sin embargo, se pueden hacer las siguientes observaciones: la actividad específica de la  $^{14}\text{C}$ -testosterona que utilizaron fue muy baja y tuvieron que exponer por largos períodos de tiempo las placas fotográficas para observar las bandas en las autoradiografías, debido además a que obtuvieron poca unión a la hSHBG, como ellos mismos señalan en el trabajo. Por otra parte, estos autores sometieron a la electroforesis muestras de suero marcadas in vitro con  $^{14}\text{C}$ -testosterona; el complejo esteroide-hSHBG se encuentra en un equilibrio dinámico asociación-disociación, y ya que, además, la  $^{14}\text{C}$ -testosterona es una molécula que no tiene carga, es probable que al terminar la electroforesis, la proporción de esteroide unido a la hSHBG fuera muy baja. Estas situaciones podrían haber provocado la obtención de artefactos en las autoradiografías, que podrían confundirse con bandas (ó con ausencia de bandas) y conducir a interpretaciones incorrectas.

En el trabajo de Ahrentsen y colaboradores se reportan dos casos de ausencia de la hSHBG en la circulación y se propone que se trata de un carácter genéticamente determinado. Sin embargo, los autores no proponen ningún tipo de herencia del gen de la hSHBG, y en el pedigrí de la familia estudiada se presentan individuos aparentemente homocigotos para el carácter variante (ausencia) descendientes de un progenitor heterocigoto y uno homocigoto para el carácter silvestre, situación que no puede ser explicada por ningún patrón de herencia convencional. Por otra parte, existe un trabajo de Hammond y colaboradores (116) en el que reportan que, después del análisis de más de 1,000,000 de muestras de suero humano utilizando un ensayo inmunoradiométrico, no se encontró la ausencia de la hSHBG en ninguna muestra.

En conclusión, en el presente trabajo se demostró la existencia de polimorfismo genético en la molécula de la Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales humana en la población mexicana. Aparentemente, la variabilidad encontrada no se acompaña de alteraciones en el funcionamiento de la hSHBG, analizado en función de sus características de unión a andrógenos y de sus concentraciones circulantes. Además, se sugirió que la molécula de la hSHBG está codificada por un gen autosómico constituido por dos alelos codominantes. Es importante señalar que la reciente demostración de que el gen de la hSHBG se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (66) apoya las observaciones de este trabajo sobre las características autosómicas de herencia involucradas en la transmisión genética de la hSHBG.

Finalmente, en este trabajo se propuso que la existencia de variantes genéticas de la molécula de la hSHBG se debe muy probablemente a una



mutación ocurrida en el gen que codifica para dicha proteína (dando origen al alelo  $G^H$ ), lo que provoca la sustitución de un aminoácido cargado en la cadena polipeptídica de la molécula, y que es responsable de la aparición de las dos bandas adicionales en el fenotipo variante.

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- 1).- Lobl, T.J., 1981, Androgen Transport Proteins: Physical Properties, Hormonal Regulation and Possible Mechanism of TeBG and ABP Action. Archives of Andrology. 7, 133-151.
- 2).- Bennhold, H., 1932, Über die Vehikelfunktion der Serumeiweiß-Körper. Ergebn. Inn. Med. Kinderheíl. 42, 273.
- 3).- Spector, A.A., John, K., Fletcher, J.E., 1969, Binding of long-chain Fatty Acids to Bovine Serum Albumin, J. Lipid Res. 10,56.
- 4).- Wagner, R.K., 1978, Extracellular and Intracellular Steroid Binding Proteins, Properties, Discrimination, Assay and Clinical Application. Acta Endocrinologica, (Kbh) 88 (Suppl 218). 1-73.
- 5).- Gordon, A.H., Gross, J., O'Connor, D., and Pitt-Rivers, R., 1952, Nature of the Circulating Thyroid Hormone-Plasma Protein Complex. Nature. 169,19.
- 6).- Daughaday, W.H., 1956, Evidence for Two Corticosteroid Binding systems in Human Plasma. J. Lab. Clin. Med. 48,799.
- 7).- Busch, J.E., 1957, The Physicochemical State of Cortisol in Blood. In: Hormones in Blood, Ciba Found. Colloq. Endocrinol. Vol. 11, Eds.: G.E.W. Wolstenholme and E.C.P. Millar. Boston: Little, Brown and Co. 263.

- 8).- Daughaday, W.H., 1958, Binding of Corticosteroids by Plasma Proteins III. The Binding of Corticosteroid and Related Hormones by Human Plasma and Plasma Protein Fractions as Measured by Equilibrium Dialysis. *J. Clin. Invest.* 37, 511.
- 9).- Mercier, C., Alfsen, A. and Baulieu, E.-E., 1966, A Testosterone Binding Globulin. In: *Proceedings of The Second Symposium on Steroid Hormones*, Ghent, 1965, Excerpta Medica International Congress Series. 101, 212.
- 10).- Corvol, P., Chrambach, A., Rodbard, D., Bardin, C.W., 1971, Physical Properties and Binding Capacity of Testosterone- Estradiol-Binding Globulin in Human Plasma Determined by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 246, 3435.
- 11).- Rosenbaum, W., Christy, N.P., Kelly, W.G., 1966, Electrophoretic evidence for the Presence of an Estrogen-Binding  $\beta$ -Globulin in Human Plasma. *J. Clin. Endocrinol.* 26, 1399.
- 12).- Pearlman, W.H., Crepy, O., 1967, Steroid-Protein Interaction with Particular Reference to Testosterone Binding by Human Serum. *J. Biol. Chem.* 242, 182.
- 13).- Forest, M.G., and Bertrand, J., 1972, Studies of the Protein Binding of Dihydrotestosterone (17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan- 3-one) in Human Plasma in Different Physiological Conditions and Effect of Medroxyprogesterone (17-hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-4-pregnene- 3,20 dione 17-acetate). *Steroids.* 19,197-214.
- 14).- Shanbhag, V.P., Sodergard, R., Carstensen, H., and Albertson, P.A., 1973, A New Method for the Determination of the Binding Capacity of Testosterone-Estradiol-Binding-Globulin in Human Plasma. *J. Steroid Biochem.* 4, 537-550.
- 15).- Petra, P.H., Stanczyk, F.Z., Senejar, D.f., Namkung, P.C., Novy, M.J., Ross, J.B.A., Turner, E., and Brown, J.A., 1983, Current Status of the Molecular Structure and Function of the Plasma Sex Steroid-Binding Protein (SBP). *J. Steroid Biochem.* 19, 699-706.
- 16).- Mickelson, K. E., Petra, P.H., 1978, Purification and Characterization of Sex Steroid-Binding Protein of Rabbit Serum. Comparison with the Human Protein. *J. Biol. Chem.* 253, 5293.
- 17).- Hammond, G.L., 1990, Molecular Properties of Corticosteroid Binding Globulin and the Sex-Steroid Binding Protein. *Endocrine Reviews.* 11, 65-79.

- 18).- Rosner, W., and Smith, R.N., 1975, Isolation and Characterization of the Testosterone-Estradiol-Binding Globulin from Human Plasma. Use of a Novel Affinity Column. *Biochemistry*. 14, 4813-4820.
- 19).- Mickelson, K.E., Teller, D.C., and Petra, P.H., 1978, Characterization of the Sex Steroid Binding Protein of Human Pregnancy Serum. Improvements in the Purification Procedure. *Biochemistry*. 17, 1409-1415.
- 20).- Iqbal, M.J., Johnson, M.W., 1978, Purification and Characterization of Human Sex Hormone Binding Globulin.
- 21).- Gershagen, S., Henningsson, K., Fernlund, P., 1987, Subunits of Human Sex Hormone Binding Globulin. *J. Biol. Chem.* 262, 8430.
- 22).- Mercier-Bodard, C., Renoir, J.M. and Baulieu, E.E., 1979, Further Characterization and Immunological Studies of Human Sex Steroid-Binding Plasma Protein. *J. Steroid Biochem.* 11, 253-259.
- 23).- Petra, P.H., 1979, The Serum Sex Steroid Binding Protein. Purification, Characterization and Immunological Properties of the Human and Rabbit Proteins. *J. Steroid. Biochem* 11, 245-252.
- 24).- Fernlund, P., and Laurell, C.B., 1981, A simple Two-Step Procedure for the Simultaneous Isolation of Corticosteroid Binding Globulin and Sex Hormone Binding Globulin From Human Serum by Chromatography on Cortisol-Sepharose and Phenyl-Sepharose. *J. Steroid Biochem.* 14, 545-552.
- 25).- Kotite, N.J., Musto, N.A., 1982, Subunit Structure of Rabbit Testosterone-Estradiol-Binding Globulin. *J. Biol. Chem.* 257, 5118.
- 26).- Hammond, G.L., Robinson, A.P., Sugino, H., Ward, D.N., Finne, J., 1986, Physicochemical Characteristics of Human Sex Hormone Binding Globulin: Evidence for Two Identical Subunits. *J. Steroid Biochem.* 24, 815-824.
- 27).- Cheng, Y.C., Musto, N.A., Gunsalus, G.L., Bardin, C.W., 1985, The role of the Carbohydrate Moiety on the Size Heterogeneity and Immunologic Determinants of Human Testosterone- Estradiol Binding Globulin. *J. Steroid Biochem.* 22, 127-134.
- 28).- Turner, E.F., Ross, J.B.A., Namkung, P.C., and Petra, P.H., 1984, *Biochemistry*. 23, 492.
- 29).- Heyns, W., 1977, The Steroid-Binding  $\beta$ -Globulin of Human Plasma. *Adv. Steroid Biochem. Pharmacol.* 6, 59-79.

- 30).- Musto, N.A., Gunsalus, G.L., and Bardin, C.W., 1980, Purification and Characterization of Androgen Binding Protein from the Rat Epididymis. *Biochemistry*. 19, 2853-2860.
- 31).- Musto, N.A., Gunsalus, G.L., Miljkovic, M., and Bardin, C.W., 1977, A Novel Affinity Column for Isolation of Androgen Binding Protein from Rat Epididymis. *Endocr. res. Commun.* 4, 147- 157.
- 32).- Feldam, M., Lea, O. A., Petrusz, P., Tres, L.L., Kierszenbaum, A.L., and French, F.S., 1981, Androgen Binding Protein. Purification from Rat Epididymis. Characterization and Immunocytochemical Localization. *J. Biol. Chem.* 256, 5170-5175.
- 33).- Cheng, S.L., and Musto, N.A., 1982, Purification and Characterization of Androgen Binding Protein from Rabbit Epididymis. *Biochemistry*. 21, 2400-2405.
- 34).- Cheng, C.Y., Musto, N.A., Gunsalus, G.L., and Bardin, C.W., 1983, Demonstration of Heavy and Light Protomers of Human Testosterone-Estradiol-Binding Globulin. *J. Steroid Biochem.* 19, 1379-1389.
- 35).- Bornstein, P., and Balian, G., 1977, *Methods Enzymol.* 47, 132.
- 36).- Walsh, K.A., Titani, K., Takio, K., Kumar, S., Hayes, R., Petra, P.H., 1986, Amino Acid Sequence of Sex Steroid Binding Protein of Human Plasma. *Biochemistry*. 25, 7584.
- 37).- Hammond, G.L., Robinson, P.A., 1984, Characterization of a Monoclonal Antibody to Human Sex Hormone Binding Globulin. *FEBS Lett.* 168, 307.
- 38).- Petra, P.H., Kumar, S., Hayes, R., Ericsson, L.H., Titani, K., 1986, Molecular Organization of the Sex-Steroid Binding Protein (SBP) of Human Plasma. *J. Steroid Biochem.* 24, 45.
- 39).- Hammond, G.L., Underhill, D.A., Smith, C.L., Goping, I.S., Harley, M.J., Musto, N.A., Cheng, C.Y., Bardin, C.W., 1987, The cDNA-Deduced Primary Structure of Human Sex Hormone-Binding Globulin and Localization of its Steroid-Binding Domain. *FEBS Lett.* 215, 100.
- 40).- Que, B.G., Petra, P.H., 1987, Characterization of a cDNA Coding for Sex Steroid-Binding Protein of Human Plasma. *FEBS Lett.* 219, 405.

- 41).- Danzo, B.J., Bell, B.W., Black, J.H., 1989, Human Testosterone-Binding Globulin is a Dimer Composed of Two Identical Protomers that are Differentially Glycosylated. *Endocrinology*. 124, 2809-2817.
- 42).- Petra, P.H., Titani, K., Ericsson, L.H., Takio, K., and Walsh, K.A., 1984, Seventh International Congress on Endocrinology, Quebec City Abstract 2738.
- 43).- Avvakumov, G.V., Matveentseva, I.V., Akhrem, L.V., Strel'chynok, O.A., and Akhrem, A.A., 1983, Study of the Carbohydrate Moiety of Human Sex Hormone Binding Globulin. *Biochim. Biophys. Acta*. 760, 104-110.
- 44).- Suzuki, Y., and Sinohara, H., 1979, Hepatic Uptake of Desialylated Testosterone-Oestradiol-Binding Globulin in the Rat. *Acta Endocrinologica*. 90, 669-679.
- 45).- Petra, P.H., Que, B.G., Namkun, P.C., Ross, J.B.A., Charbonneau, H., Walsh, K.A., Griffin, P.R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 1988, Affinity Labeling, Molecular Cloning and Comparative Aminoacid Sequence Analyses of Sex Steroid-Binding Protein of Plasma: a Multidisciplinary Approach for Understanding Steroid-Protein Interaction and its Physiological Role. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 538, 10.
- 46).- Grenot, C., de Montard, A., Blachere, T., Mappus, E., Cuilleron, C.Y., 1988, Identification d'un Site de Photomarquage de la Proteine Plasmatique de Liaison de la Testosterone et de l'oestradiol (SBP) par l'hydroxy-17 $\beta$ oxo 3-androstandiene-4,6 tritie. *CR Acad. Sci. Paris*. 307, 391.
- 47).- Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A., and Rosner, W., 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 6048-6054.
- 48).- Naknla, A.M., Khan, M.S., and Rosner, W., 1990, *J. Clin Endocrinol. Metab.* 71, 398-404.
- 49).- Khan, M.S., Hryb, D.J., Hasliim, G.A., Romas, N.A., Rosner, W., 1990, Delineation and Synthesis of the Membrane Receptor-Binding Domain of Sex Hormone Binding Globulin. *J. Biol. Chem.* 265, 18362-18365.
- 50).- Mischke, W., Weise, H.C., Graesslin, D., Rusch, R., and Tamm, J., 1979, Isolation of Highly Purified Sex Hormone Binding Globulin (SHBG): Evidence for Microheterogeneity. *Acta Endocr., Copenh.* 90, 737-742.
- 51).- Van Baelen, H., Heyns, W., DeMoor, P., 1969, Microheterogeneity of Testosterone Binding Globulin in Human Pregnancy Serum Demonstrated by Isoelectric Focusin. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 30, 199.

- 52).- Ashwell, G., and Morell, A.G., 1974, *Advanc. Enzymol.* 41, 99.
- 53).- Strel'chyonok, O.A., Avvakumov, G.V., Survilo, L.I., 1984, A Recognition System for Sex-Hormone-Binding Protein-Estradiol Complex in Human Decidual Endometrial Plasma Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 802, 459.
- 54).- Hryb, D.J., Khan, M.S., and Rosner, W., 1985, Testosterone- Estradiol-Binding Globulin Binds to Human Prostatic Cell Membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 432-440.
- 55).- Rosner, W., 1990, the Functions of Corticosteroid-Binding Globulin and Sex Hormone-Binding Globulin: Recent Advances. *Endoc. Rev.* 11, 80-91.
- 56).- Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A., and Rosner, R.W., 1989, Solubilization and Partial Characterization of the Sex Hormone-Binding Globulin Receptor from Human Prostate. *J. Biol. Chem.* 264, 5378-5383.
- 57).- Westphal, U., 1986, Steroid-Protein Interactions II. Monographs on Endocrinology. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 27.
- 58).- Cunningham, G.R. Tindall, D.J., Lobl, T.J., Campbell, J., Means, A.R., 1980, Characterization and Comparison of the Steroid Specificity of Human Testosterone-Estrogen Binding Globulin (TeBG) and Rat Cytoplasmic Receptor (CR). *Proceedings VI International Congress of Endocrinology*, Feb. 10-16, Melbourne, Australia, Abstract N° 802.
- 59).- Heyns, W., Van Baelen, H., DeMoor, P., 1969, Study of the Specificity of the Steroid Binding  $\beta$ -Globulin in Human Plasma. *J. Endocrinol.* 43, 67-71.
- 60).- Kato, T., Horton, R., 1968, Studies of Testosterone Binding Globulin. *J. Clin. Endocrinol.* 28, 1160-1168.
- 61).- Thomas, M.J., Gordon, R.D., Smid, J.R., 1974, Physiological Variations in Plasma Testosterone in Normal Adult Male Subjects Measured by a Competitive Protein-Binding Technique. *J. Steroid. Biochem.* 5, 45-53.
- 62).- Vermeulen, A., Verdonch, L., 1968, Studies on the Binding of Testosterone to Human Plasma. *Steroids.* 11, 609-635.
- 63).- Anderson, D. C., 1974, Sex-Hormone Binding Globulin. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 3, 69-96.



64).- Khan, M.S., Knowles, B.B., Aden, D.P., Rosner, W., 1981, Secretion of Testosterone-Estradiol-Binding Globulin by a Human Hepatoma-Derived Cell Line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 448.

65).- Gershagen, S., Ferlund, P., Lundwall, A., 1987, A cDNA Coding for Human Sex Steroid Hormone Binding Globulin. Homology to Vitamin K-Dependent Protein S. *FEBS Lett.* 220, 129.

66).- Bérubé, D., Seralini, G.E., Gagné, R., and Hammond, G.L., 1990, Localization of the Human Sex Hormone-Binding Globulin Gene (SHBG) to the Short Arm of Chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet.* 54, 65-67.

67).- Forest, M.G., Bonneton, A., Lecoq, A., Brebant, C., Pugeat, M., 1986, Ontogenèse de la Protéine de Liaison des Hormones Sexuelles (SBP) et de la Transcortine (CBG) chez les Primates: Variations Physiologiques et Etude dans Différents Milieux Biologiques. In: Forest, M.G., Pugeat, M. (eds), *Binding Proteins of Steroid Hormones*. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, London/Paris, vol. 149, 263.

68).- Abramovich, D.R., and Towler, C.M., 1978, The Binding of Sex Steroids in Human Maternal and Fetal Blood at Different Stages of Gestation. *J. Steroid Biochem.* 9, 791-794.

69).- Caputo, M.J., Hosty, T.A., 1972, The Presence of Sex Hormone Binding Globulin in Amniotic Fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113, 804.

70).- Hammond, G.L., Leinonen, P., Bolton, N.J., Vihko, R., 1983, Measurement of Sex-Hormone Binding Globulin in Human Amniotic Fluid: its Relationship to Protein and Testosterone Concentrations and Fetal Sex. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 18, 377.

71).- Bardin, C.W., Musto, N., Gunsalus, G., Kotite, N., Cheng, S.L., Larrea, F., Becker, R., 1981, Extracellular Androgen Binding Proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 189-198.

72).- Rosner, W., Aden, D.P., Khan, M.S., 1984, Hormonal Influences on the Secretion of Steroid-Binding Protein by Human Hepatoma-Derived Cell Line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59, 806.

73).- Mercier-Bodard, C., Baulieu, E.E., 1986, Hormonal Control of SBP in Human Hepatoma Cells. *J. Steroid Biochem.* 24, 443.

- 74).- Plymate, S.R., Matej, L.A., Jones, R.E., Friedl, K.E., 1988, Inhibition of Sex-Hormone-Binding Globulin Production in the Human Hepatoma (hepg2) Cell Line by Insulyn and Prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 460.
- 75).- Cheng, C.Y., Bardin, C.W., Musto, N.A., Gonsalves, G.L., Cheng, S.L., and Ganguly, M., 1983, Radioimmunoassay of Testosterone-Estradiol Binding Globulin in Humans: a Reassessment of Normal Values. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56, 68-75.
- 76).- Moore, J.W., and Bulbrook, R.D., 1988, The Epidemiology and Function of Sex Hormone-Binding Globulin. *Ox. Rev. Reprod. Biol.* 10, 180-236.
- 77).- Corvol, P., Bardin, C.W., 1973, Species Distribution of Testosterone Binding Globulin. *Biol. Reprod.* 8, 277, 282.
- 78).- Renoir, J.-M., Mercier-Bodard, C., Baulieu, E., 1980, Hormonal and Immunological Aspects of the Phylogeny of Sex Steroid Binding Plasma Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 4578-4582.
- 79).- Bardin, W.C., Gonsalves, G.L., Musto, N.A., Cheng, C.Y., Reventós, J., Smith, C., Underhill, D.A., Hammond, G., Corticosteroid Binding Globulin, Testosterone-Binding Globulin and Androgen Binding Protein Belong to Protein Families Distinct from Steroid Receptors.
- 80).- Hoskin, J., Norman, D.K., Beckman, R.J., and Long, G.L., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 349-353.
- 81).- Furie, B.F., Furie, B.C., 1988, The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell.* 53, 505.
- 82).- Poller, L., 1976, Oral Contraceptives, Blood Clotting and Thrombosis. *Br. Med. Bull.* 34, 151.
- 83).- Hammond, G.L., Underhill, D.A., Rykse, H.M., Smith, L.C., 1989, The Human Sex Hormone-Binding Globulin Gene Contains Exons for Androgen-Binding Protein and Two Other Testicular Messenger RNAs. *Molecular Endocrinology.* 3, 1869-1876.
- 84).- Slauncohlite, W.R., and Sandberg, A.A., 1959, Transcortin: a Corticosteroid Binding Protein of Plasma. *J. Clin. Invest.* 38, 384.
- 85).- Daughaday, W.H., 1959, Steroid Protein Interactions. *Physiological Reviews.* 39, 885.

- 86).- Demisch, K., Grant, J.K., Black, W., 1968, Plasma Testosterone in Women in Late Pregnancy and After Delivery. *J. Endocrinol.* 42, 477.
- 87).- Burke, C.W., Anderson, D.C., 1972, Sex-Hormone-Binding Globulin is an Oestrogen Amplifier. *Nature.* 240, 38.
- 88).- Partridge, W.M., 1981, Transport of Protein-Bound Hormones into Tissues in Vivo. *Endocrine Reviews.* 2, 103-123.
- 89).- Cooper, T.G., Waites, G.M.H., 1979, Factors Affecting the Entry of Testosterone into the Lumen of Cauda Epididymis of the Anesthetized Rat. *J. Reprod. Fertil.* 56, 165-174.
- 90).- Bordin, S., and Petra, P.H., 1980, Immunochemical Localization of the Sex Steroid-Binding Protein of Plasma in Tissues of the Adult Monkey *Maccaca nemestrina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 77, 5678-5682.
- 91).- David, G.F.X., Koeler, J.K., Brown, J.A., Petra, P.H., and Farr, A.G., 1985, Light and Electron Microscopic Studies on the Localization of Steroid-Binding Globulin (SBP) in Rabbit Spermatozoa. *Biology of Reproduction.* 33, 503-514.
- 92).- Sakiyama, R., Partridge, U.M., and Musto, N.A., 1988, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 98-103.
- 93).- Futuyma, D., 1986, *Biología Evolutiva.* Editorial Simauer.
- 94).- Dobzhansky, I., Ayala, F.J., Stebbins, G.L., Valentine, J.W., 1978, *Evolución,* Editorial Omega.
- 95).- Guízar-Vázquez, J.J., 1988, *Genética Clínica. Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias.* Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México.
- 96).- Mettler, L.E., Gregg, T.G., 1982, *Genética de las Poblaciones y Evolución.* Editorial UTEHA, México.
- 97).- Waltz, M.R., Pullman, T.N., Takeda, K., Sobieszcyk, P., and Refetoff, S., 1990, Molecular Basis for the Properties of the Thyroxine-Binding Globulin-Slow Variant in American Blacks. *J. Endocrinol. Invest.* 13, 343-349.
- 98).- Robinson, P.A., Hammond, G.L., 1985, Identification and Characterization of a Human Corticosteroid Binding Globulin Variant with a Reduced Affinity for Cortisol. *J. Endocrinol.* 104, 269.

- 99).- Van Baelen, H., Brepoels, R., and De Moor, P., 1982, Transcortin Leuven: a Variant of Human Corticosteroid-Binding Globulin with Decreased Cortisol-Binding Affinity. *J. Biol. Chem.* 257, 3397-3400.
- 100).- Ahrensens, O.D., Jensen, H.K., Johnsen, G.S., 1982, Sex- Hormone-Binding Globulin Deficiency. *Lancet* II, 377.
- 101).- Luckock, A., and Cavalli-Sforza, D., 1983, Detection of Genetic Variation with Radioactive Ligands V. Genetic Variants of Testosterone-Binding Globulin in Human Serum. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 49-57.
- 102).- Larrea, F., Musto, N.A., Gonsalus, G.L., Mather, J.P., and Bardin, C.W., 1981, Origin of the Heavy and Light Protomers of Androgen-Binding Protein from the Rat Testis. *J. Biol. Chem.* 256, 12566-12573.
- 103).- Scatchard, G., 1949, The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- 104).- Lisker, R., 1981, Estructura Genética de la Población Mexicana. Aspectos Médicos y Antropológicos. Cap. 1, Ed. Salvat.
- 105).- Ritzén, M.E., French, S.F., Weddington, C.S., Nayfeh, N.S. Hansson, V., 1974, Steroid Binding in Polyacrylamide Gels. Quantitation at Steady State Conditions. *J. Biol. Chem.* 249, 6597-6604.
- 106).- Ferguson, K.A., 1964, Starch-Gel Electrophoresis. Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides. *Metabolism.* 13, 985-1002.
- 107).- Nei, M., 1975, Molecular Population Genetics and Evolution. American Elsevier, New York.
- 108).- King, J.L., and Jeikes, T.H., 1969, Non-Darwinian Evolution. *Science.* 188, 107-116.
- 109).- Crow, J.F., and Kimura, M., 1970, An Introduction to Population Genetics Theory. Harper and Row, New York.
- 110).- Kimura, M., and Ohta, T., 1971, Protein Polymorphism as a Phase of Molecular Evolution. *Nature.* 229, 467-469.
- 111).- Cavalli-Sforza, L.L., and Bodmer, W.F., 1971, The Genetics of Human Populations. Freeman, San Francisco.

- 112).- O'Farrel, P.H., 1975, High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- 113).- Takamatsu, J., Michiyasu, A., Weinberg, M., and Refetoff, S., 1986, Isoelectric Focusing of Variant Thyroxine-Binding Globulin in American Blacks: Increased Heat Lability and Reduced Serum Concentration. *J. Clin. Endoc. Metab.* 63, 80.
- 114).- Grimaldi, S., Bartalena, L., Ramacciotti, C., and Robbins, J., 1983, Polymorphism of Human Thyroxine-Binding Globulin. *J. Clin. Endoc. Metab.* 57, 1186.
- 115).- Bornstein, P., and Balian, G., 1977, *Methods Enzymol.* 47, 132.
- 116).- Hammond, G.L., Langley, M.S., Robinson, P.A., 1985, A Liquid-Phase Immunoradiometric Assay (IRMA) for Human Sex Hormone Binding Globulin (SHBG). *J. Steroid Biochem.* 23, 451.