



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LAS DIVERSAS FORMAS  
MOLECULARES DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN  
SUJETOS CON OBESIDAD Y EN SUJETOS DE PESO NORMAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANA CECILIA NORIEGA TAMEZ



DIRECTOR DE TESIS: M. En C. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

2000  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

279481



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
 Jefa de la División de Estudios Profesionales  
 P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Caracterización de las diversas formas moleculares de la hormona luteinizante en sujetos con obesidad y en sujetos de peso normal

realizado por Ana Cecilia Noriega Tamez

Con número de cuenta 9550381-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis M. en C Cristina Aleida Olivares Segura  
 Propietario

Propietario M. en C Jorgelina Barrios de Tomassi

Propietario M. en IBB Saúl Cano Colín

Suplente Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Suplente Biol. David Garcíadiego Cázares

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U. N. A. M



*Edna María Suárez Díaz*  
 Consejo Departamental de Biología  
 Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA

## DEDICATORIA

A Jorge por su incondicional apoyo y por ser estímulo y ejemplo en todo momento.

A mis padres y hermano por sus consejos y gran paciencia.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a las siguientes personas:

A la M. en C. Aleida Olivares por su asesoría para la realización de este trabajo.

A Jorgelina y a Saúl Cano por su contribución para terminar adecuadamente.

A todas las personas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición.

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Obesidad.....	2
Eje Hipotálamo-Hipófisis- Gónada.....	4
Liberación Bifásica de las Gonadotropinas.....	9
Mecanismos de Regulación en la Síntesis de la LH.....	10
Isoformas de la LH.....	12
Objetivos e Hipótesis.....	16
Sujetos y Métodos.....	17
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de sujetos con obesidad.....	18
Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de sujetos de peso normal.....	19
Métodos.....	20
Radioinmunoanálisis.....	22
Análisis Estadístico.....	24
Resultados.....	25
Discusión.....	28
Conclusiones.....	33
Referencias.....	34

## RESUMEN

La síntesis y secreción de la hormona luteinizante y de la estimulante del folículo está regulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Ambas gonadotropinas ejercen su acción biológica sobre las gónadas. Dichas gonadotropinas se sintetizan en diferentes variantes moleculares. Estructuralmente dichas isoformas son diferentes en composición de carbohidratos principalmente de sulfatos. Bioquímicamente cada isoforma presenta características fisicoquímicas y biológicas particulares.

El objetivo de este trabajo es caracterizar las diferentes formas moleculares de la hormona luteinizante en sujetos con obesidad y en sujetos de peso normal. Se incluyeron 5 sujetos obesos y 5 sujetos control; a cada uno se le extrajo sangre cada 10 minutos durante 2 horas basales; posterior a ello se le administraron 10 $\mu$ g de GnRH y se extrajo sangre cada 10 minutos durante 4 horas, por último se le administraron 90 $\mu$ g de GnRH y se procedió al muestreo antes indicado. Se consiguieron 3 pozas y cada poza fue sometida a un cromatofoco con el fin de analizar la distribución de carga eléctrica por pH de las diversas isoformas secretadas. En ambos grupos, en condiciones basales las isoformas fueron predominantemente ácidas, lo cual puede explicarse como una consecuencia tanto de una sobrevivencia selectiva en la circulación de las isoformas ácidas, así como de una producción y secreción disminuida de las isoformas básicas. Sin embargo, los sujetos con obesidad presentaron mayor cantidad de isoformas básicas. Al aplicar los estímulos con 10 y 90 $\mu$ g de GnRH las proporciones de isoformas básicas se incrementaron notablemente en los sujetos con obesidad y en los sujetos de peso normal permanecieron sin cambios notables. Estos resultados indican que el estado endocrinológico de los sujetos obesos se encuentra alterado, lo cual provoca una secreción preferencial de isoformas menos ácidas probablemente debido al ambiente endocrino existente en los sujetos obesos ( mayor aromatización periférica de los andrógenos y /o mayor sensibilidad a la GnRH).

## INTRODUCCIÓN

### OBESIDAD

La obesidad se define como un aumento excesivo de grasa corporal que puede ser un importante factor de riesgo para la salud, ya que existen estudios hechos en personas obesas en los cuales se encontró que son 1.8 veces más propensas a presentar enfermedades coronarias e hipertensión, entre otras (Must, et al 1992). La causa de la obesidad se desconoce; sin embargo, el mecanismo básico de la obesidad es el resultado del desequilibrio entre la ingestión de alimentos y el gasto de los mismos. Es difícil establecer criterios precisos para evaluar la obesidad, ya que desafortunadamente, los diversos modelos existentes no dan las mismas respuestas al ser comparados entre sí. (Lukaski, 1987). Existen técnicas directas para determinar dicha condición, como son la densitometría, el estimado de agua total, la cuantificación del potasio corporal total y la excreción de creatinina (Lukaski,1987;Bray,1987). Existen otros métodos indirectos como son la medición de pliegues subcutáneos, el índice peso/talla y el índice cintura/cadera. Estos últimos son considerados como los más precisos para poder clasificar a determinados individuos como obesos (Black et al,1983; Frisancho, 1985; Kissebah y Peiris,1989; Stensland, 1990).

Las causas de la obesidad han sido objeto de una intensa investigación, los factores ambientales y genéticos participan en una interacción compleja que incluyen influencias psíquicas, culturales y mecanismos de regulación fisiológica. El desarrollo de la obesidad generalmente comienza en la infancia, algunos estudios retrospectivos han sugerido que existe progresión directa de un niño obeso a un adulto obeso, se ha estimado que un 30% de los adultos que son obesos lo fueron durante la niñez y un 80% de adolescentes obesos son adultos obesos (Price et al, 1990).



En estudios realizados con ratas y ratones hay evidencia de algunos factores genéticos relacionados en el desarrollo de la obesidad, ya que se encontraron genes que pueden causar obesidad extrema, y se ha observado la existencia de genes homólogos en el humano (Zhang et al, 1994).

Uno de los principales genes que intervienen en los mecanismos relacionados con el desarrollo de la obesidad es el gen *ob*. El producto de este gen, la leptina, es una proteína de 16 kilodaltones (KDa) circulante en el suero, y es producida en el tejido adiposo blanco. La leptina, se une a receptores específicos en regiones extrahipotálamicas alterando la expresión de algunos neuropéptidos (dopamina, norepinefrina, el neuropéptido Y (NPY), la galanina y los opioides) que regulan la función neuroendócrina y el consumo energético (Elmqvist, et al 1998; Mantzoros,1999). Las concentraciones de leptina en el suero de sujetos obesos se encuentran elevadas, en comparación con sujetos de peso normal. Estos altos niveles parecen estar correlacionados con el porcentaje de la masa corporal. Los mecanismos responsables de esto, parecen estar vinculando la inducción del gene *ob*, ya que se ha encontrado una mayor cantidad de mRNA *ob* en los adipocitos de sujetos obesos que en aquellos de peso normal. Los cambios en el porcentaje de grasa corporal son traducidos en cambios en las concentraciones de leptina sérica a nivel de la expresión del gene *ob*. Existe una gran variabilidad en los niveles plasmáticos de leptina en los diferentes grados de obesidad y la pérdida de peso resulta en una disminución de los niveles plasmáticos de la misma (Beales y Kopelman,1996). Las altas concentraciones de leptina encontradas en el suero de sujetos obesos se debe quizá, a que en ellos existe una capacidad de respuesta menor a la proteína y el organismo intenta compensarlo produciendo más leptina. (Hamilton, et al 1995)

## **EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA**

La función hipotálamica se manifiesta a través de vías eferentes y de una íntima relación con la hipófisis por medio de células neurosecretoras. Es bien sabido que la secreción de la hipófisis esta controlada por señales hormonales originadas en el hipotálamo, estas hormonas llamadas factores hipotalámicos, son conducidos a la hipófisis anterior por pequeños vasos portales hipotálamo-hipofisarios (Conn, 1984). Una de estas hormonas o factor es la denominada hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), quien controla la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Hseuh, 1983).

La síntesis de la GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico, y el decapeptido es secretado de manera pulsátil, por las terminales neuronales, hacia una red capilar especializada que rodea la eminencia media, que es una pequeña arteria que irriga la parte más baja del hipotálamo. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisaria, la GnRH es transportada hacia la hipófisis anterior donde efectúa la estimulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Labrie, 1979).

Ciertos neurotransmisores modifican el control central de la GnRH, la dopamina tiene una acción inhibitoria en las neuronas que producen GnRH. La progesterona puede inhibir los pulsos de la GnRH, pero en determinadas circunstancias puede estimular la secreción de la LH. Los estrógenos administrados en dosis bajas, disminuyen la frecuencia de los pulsos de la hormona así como, la respuesta de las gonadotropinas (Marshall, 1986).

La GnRH, como otros péptidos se encuentra distribuida en el sistema nervioso central y límbico, se sabe que participa en el control de la conducta sexual de las ratas, en las ranas funciona como neurotransmisor y además, esta presente en la placenta

humana estimulando la secreción de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) (Marshall,1988; Amarant, 1982; Moghissi,1992).

La primera etapa de acción hormonal es la unión a receptores hormonales, que se localizan dentro de la célula o en la membrana plasmática. La combinación de hormona-receptor suele desencadenar una serie de reacciones intracelulares en cascada. Para el caso específico de la GnRH, ésta se une a receptores específicos localizados en la membrana plasmática del gonadotropo, células que forman parte de la hipófisis, esta unión altera la permeabilidad de la membrana para la entrada de algunos iones y permite la movilización de calcio extra e intracelularmente. La GnRH activa su receptor y esto a su vez provoca la activación de las proteínas G, las cuales estimulan a la fosfolipasa C, para que produzca la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2), en inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y el diacil glicerol (DAG), el mecanismo de acción del IP3 todavía no es muy claro, pero el DAG activa a la proteína cinasa C, la cual en forma directa provoca la liberación de la hormona luteinizante (Conn y Hawes,1993; Catt y Stojilkovic,1989). La GnRH también induce un incremento en el calcio intracelular que actúa como un segundo mensajero en la liberación de la LH. El aumento de calcio citosólico induce la liberación de las gonadotropinas (Catt y Stojilkovic, 1989; Conn et al, 1995). La calmodulina es un mediador intracelular del calcio, ya que cuando se le une altera la actividad de varias enzimas del citoesqueleto que se encuentran relacionadas en los procesos secretorios (Conn et al, 1995). Los mecanismos dependientes del calcio, son los responsables de la liberación inmediata de las gonadotropinas almacenadas en los gránulos secretorios, y de la síntesis de las subunidades de las gonadotropinas (Catt y Stojilkovic, 1989).

Las hormonas hipofisarias: hormona estimulante del foliculo (FSH), luteinizante (LH), gonadotropina coriónica (hCG) así como la estimulante de la tiroides,(TSH) son glicoproteínas, estructuralmente similares que están formadas por dos cadenas

polipeptídicas, unidas por puentes de hidrógeno, denominadas subunidad  $\alpha$ , que es común en todas las gonadotropinas y la subunidad  $\beta$  que confiere la especificidad biológica e inmunológica a cada una de ellas (Chappel et al, 1983; Ulloa et al, 1995).

Las gonadotropinas regulan directamente el funcionamiento de las gónadas (testículo y ovario), las cuales tienen la doble función de formar y madurar los gametos, así como de sintetizar las hormonas esteroideas sexuales necesarias para preparar al aparato reproductor, tanto para el apareamiento e implantación como, para la fertilización (Chappel et al, 1983).

En los testículos la LH promueve que las células de Leydig sintetizen altas concentraciones de testosterona el cual es un requisito para que exista un buen funcionamiento de la espermatogénesis. Modula la actividad de algunas enzimas que participan en la entrada, reparto y uso del colesterol; en la biosíntesis de ciertos andrógenos (Veldhuis, 1987). Interviene en la estimulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas y enzimas para la adquisición y distribución del colesterol. De igual manera, juega un papel crítico en la regulación de la gametogénesis y esteroidogénesis en los testículos. En la mujer, estimula al ovocito para su maduración y ovulación; además de provocar la secreción de progesterona en el ovario (Veldhuis, 1991). En el ovario el receptor de LH, se encuentra en las células de la granulosa (Richards, 1994).

El receptor de LH es un miembro de la superfamilia de receptores unidos a proteínas G, (Fig. 1) (Simoni et al, 1997; Ulloa-Aguirre y Conn, 1998), el cual consiste de una cadena simple polipeptídica que varía en tamaño, ya que oscila entre los 669 y 742 residuos de aminoácidos. Presenta un dominio extracelular largo, con múltiples segmentos repetidos ricos en Leucina (Segalof et al, 1990; Thomas et al, 1996) donde se encuentran 6 sitios de N-glicosilación. Esta es la parte fundamental del receptor que proporciona la

especificidad y la alta afinidad de la unión con la hormona (Thomas et al, 1996). Presentan una región intracelular carboxilo terminal, con 7 segmentos transmembranales, se conectan por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares, estas últimas en especial la tercera asa y la región carboxilo terminal son las porciones responsables del acoplamiento del receptor con las proteínas G y activan la adenilato ciclasa, que se localiza en la superficie citoplásmica de la membrana celular, después de que se lleva a cabo la unión de la hormona con dicho receptor (Ketton, 1992; Dattatreymurty, 1992; Roth, 1996).

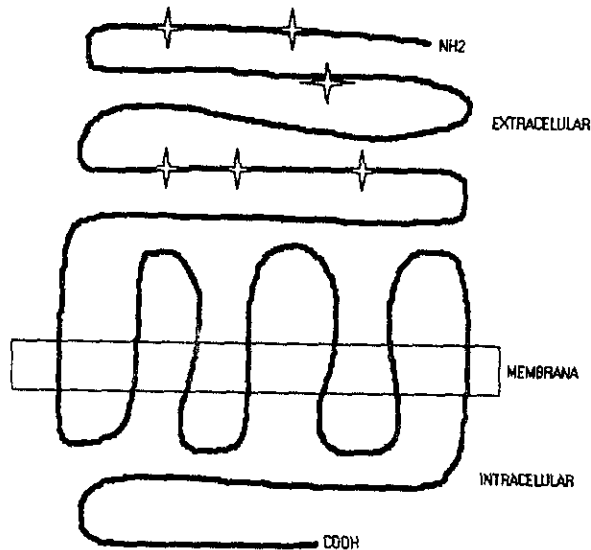


Fig. 1 Receptor de la hormona luteinizante

El gen que codifica para el receptor de la LH/hCG en el humano, se encuentra localizado en los brazos cortos del cromosoma 2, en la banda p<sup>21</sup> (Rousseau et al, 1990), este gen tiene una región codificante constituida por 11 exones y 10 intrones que corresponde a una proteína de 699 aminoácidos.

Algunos estudios donde se emplearon receptores mutantes demostraron la existencia de un sitio adicional importante para la afinidad de unión de la LH, localizado en el segundo dominio transmembranal (Asn383), así como un sitio de unión al ligando de baja afinidad, en una región específica de la tercera asa extracelular (Lys 583) (Gilchrist et al, 1996; Ryu et al, 1996). Aparentemente, este sitio de unión es crítico para activar canales transmembranales específicos que eventualmente llevan a la generación de señales intracelulares particulares, tales como elevación y descenso en la concentración de AMPc (Gilchrist et al, 1996).

Cuando la hormona se une con el receptor ocurre un cambio conformacional, el complejo activa una proteína G estimuladora (Gs) con la subsecuente activación de la enzima denominada adenilato ciclasa la cual cataliza una reacción de síntesis del AMPc (adenil monofosfato ciclico), el cual funciona como un efector (mensajero secundario) que activa a las proteínas cinasas dependientes de AMPc, quienes a su vez fosforilan y activan a varias proteínas endógenas, las cuales regulan una gran diversidad de procesos celulares (Richards, 1994).

Esta síntesis de AMPc continúa, hasta que el complejo adenilato ciclasa- proteína G se separa, y el AMPc comienza a ser rápidamente hidrolizado por las fosfodiesterasas. Otra señal que se desencadena es la apertura de los canales de calcio, el cual penetra en el citosol para iniciar una respuesta intracelular ya que actúa como segundo mensajero.

El incremento en las concentraciones de calcio intracelular no es permanente, ya que éste es rápidamente bombeado hacia el exterior de la célula (Huckle, 1988).

### **LIBERACIÓN BIFÁSICA DE LAS GONADOTROPINAS**

Es bien sabido que las gonadotropinas se secretan de forma tónica o cíclica por pulsos condicionados por la GnRH. El patrón de secreción observado en los varones es el tónico aunque también es uno de los mecanismos observados en la mujer. Sin embargo, la secreción cíclica es la que generalmente se efectúa en la mujer en edad reproductiva.

La insulina, la vasopresina, el glucagon, al igual que las gonadotropinas son almacenadas en gránulos secretores de las células y se liberan en forma bifásica (Lacy, 1973). Esta liberación se caracteriza por un aumento agudo inicial; posteriormente, se presenta un periodo de estabilización o de caída seguido por una segunda fase de incremento en la tasa de secreción. El fenómeno de la liberación bifásica se ha explicado mediante la hipótesis que señala la existencia de dos pozas metabólicas de hormona liberable. Se estima que la primera poza metabólica es sintetizada en gránulos cercanos a la membrana celular y que es fácilmente liberable. La segunda poza metabólica originada en gránulos no tan cercanos a la membrana de la célula, posiblemente requiere de la síntesis de "novo" de hormona y de la activación del sistema de microtúbulos y microfilamentos, en respuesta a un aumento sostenido de calcio, lo cual ocasiona la migración de gránulos hacia la membrana celular y la subsecuente liberación de la hormona (Leong, 1991 y Conn, 1995).

Se ha descrito que durante la administración farmacológica de GnRH en varones normales (por 4 horas) las concentraciones de LH sérica presentan un patrón bifásico de elevación; es decir, hay un aumento en los primeros 30 minutos, seguido

por una meseta hasta los 90 minutos, momento en el cual se intensifica de nuevo el aumento hasta el final de la infusión de GnRH (Bremner, 1974). Esto demuestra que en las dos fases de liberación de la LH existen 2 pozas metabólicas funcionalmente activas, una que es rápidamente liberable y otra que requiere una mayor estimulación sostenida para poder liberarse al torrente sanguíneo (Bremner, 1974 y Beitins, 1977).

Cada una de estas pozas representa diferentes condiciones fisiológicas, es decir la primera nos habla de la sensibilidad del gonadotropo y la segunda de la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos pozas metabólicas hipofisarias de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional, tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisaria. Si la estimulación con GnRH es breve (10 µg) el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisaria, requiere de una duración más prolongada del estímulo o mayor cantidad de GnRH (90 µg). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje, la cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100 µg) no se pueden apreciar por separado los componentes de sensibilidad y reserva, ya que la existencia de una acción más potente ocasiona la liberación de ambas pozas (Wang, et al 1976).

### **MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LH**

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas (Winters et al 1979; Gharib et al, 1987; Winters et al, 1992). Los receptores esteroideos se encuentran ampliamente en las



células cerebrales, donde se han relacionado con la regulación de la conducta sexual y la diferenciación del cerebro (Urban et al, 1991). La secreción de la LH está controlada por la acción de retroalimentación negativa ejercida por la testosterona (T) y el estradiol (E<sub>2</sub>). La T o sus metabolitos actúan en el Sistema Nervioso Central para retardar el generador de pulsos hipotálamicos y consecuentemente disminuir la frecuencia de la liberación pulsátil de LH (Matsumoto y Bremner, 1984). La inyección aguda de E<sub>2</sub> disminuye los niveles de LH asociándose con un incremento en la frecuencia y una disminución en la amplitud de los pulsos de LH, (Santen, 1975). Los opioides endógenos desempeñan un papel en las acciones de retroalimentación negativa de los andrógenos y estrógenos en la secreción pulsátil de LH en el varón (Veldhuis et al, 1984). Existen otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas a nivel central. La prolactina inhibe directamente la secreción de la GnRH (Milenkovic et al, 1994; Calogero et al, 1996). La dopamina, inhibe la secreción de LH (Quigley et al, 1981). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar en el hipotálamo, al modular la secreción de la GnRH (endócrino), mientras que a su vez la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (autócrino) (Marshall y Kelch, 1986).

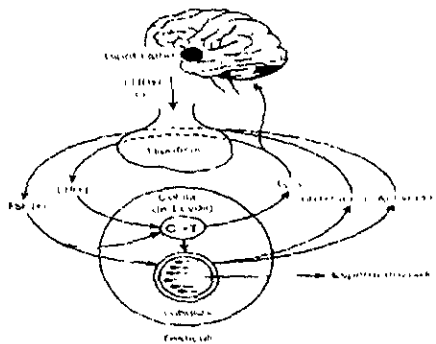


Figura 2. Mecanismos de regulación

## ISOFORMAS DE LA LH

La hormona luteinizante no es una hormona de estructura única, sino que existe en múltiples formas moleculares (isoformas), debido a la diversidad de oligosacáridos que se pueden unir a la proteína base, los cuales juegan un papel determinante para la formación de las isoformas. Por medio de los avances científicos en las técnicas moleculares sabemos que esos diferentes carbohidratos son esenciales para el ensamblaje de las subunidades, la secreción, la interacción de la hormona con su receptor y la regulación de su vida media. Cada isoforma presenta características biológicas y fisicoquímicas particulares, como: la capacidad de unión al receptor, la vida media plasmática, su actividad biológica *in vivo* e *in vitro*, carga eléctrica media y puntos isoeléctricos específicos (Ulloa-Aguirre, 1998). La hormona luteinizante está formada por dos subunidades glicosiladas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), la subunidad  $\alpha$  presenta dos sitios de N-glicosilación localizados en N-52 y N-78, mientras que la subunidad  $\beta$  presenta un solo sitio de glicosilación en N-30 (Costagiliola et al. 1994). Cada oligosacárido está ramificado y es aparentemente heterogéneo en su periferia, con bifurcaciones que terminan principalmente en sulfatos. (Spratt, 1988). El peso molecular de la LH es aproximadamente de 30 KDa; éste no se puede establecer con exactitud debido a la variabilidad de los carbohidratos unidos a la molécula. Sin embargo, estos carbohidratos no son constantes en la molécula de LH, la cual es sintetizada y secretada en diferentes variantes moleculares. La hormona luteinizante se encuentra regulada por la GnRH y otros factores, la hormona liberadora de gonadotropinas interviene en la glicosilación de la hormona. Los sulfatos terminales favorecen la remoción de las gonadotropinas de la circulación a su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor específico (Fiete et al, 1991). Por el contrario el ácido siálico disminuye la captación hepática (Baenziger, 1996). Estudios de

las isoformas de LH, ratifican que los carbohidratos y, en particular el contenido de ácido siálico, es determinante para la unión al receptor y para la actividad biológica *in vivo*, ya que las isoformas con menor cantidad de ácido siálico son rápidamente depuradas de la circulación (Burgon et al, 1996). La diferencia de isoformas circulantes, puede estar modulada por la regulación de la secreción preferencial de una u otra isoforma, o por la desproporción en la circulación de enzimas capaces de remover carbohidratos de la LH y cambios en la depuración metabólica. Se han identificado varias isoformas de LH en la hipófisis, en el suero y orina de varias especies de animales, incluido el humano (Van Damme, 1977). La estimación de su número y cantidad dependen de diversas variables, tales como la técnica utilizada para su separación y el estado fisiológico del donador.

La separación de las isoformas se puede obtener mediante diversos métodos; sin embargo, el que ofrece una ventaja adicional es el cromatofoco (CF) ya que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana del pH empleado pueden ser recuperadas, identificadas y nuevamente procesadas por un pH distinto, sin que exista pérdida de su actividad biológica (Ulloa y Chappel, 1982).

Dentro de las isoformas identificadas por medio del CF o Isoelectroenfoco en animales como las ratas y hámsters se ha visto que existen de 6 a 7 isoformas inmunorreactivas (Keel y Grotjan, 1985).

En bovinos y ovinos se presentan isoformas que oscilan en los intervalos de puntos isoelectrónicos de 5.12- 10.58 (pI) (Zalesky y Grotjan, 1991). El intervalo de las isoformas intrahipofisarias y séricas presentan un intervalo de 6.5-10.0 (pI) y las urinarias oscilan en 6.7- 8.14(pI) (Van Damme et al, 1977).

Diversos estudios concuerdan en que las concentraciones de T y de globulina transportadora de esteroides sexuales se encuentran disminuidas en varones obesos,

y, por el contrario, el estradiol se ve incrementado debido, a la conversión de precursores de andrógenos a estrógenos. Asimismo, puede existir un aumento en la secreción de estrógenos en los testículos (Schneider et al, 1979). La aromatización de los andrógenos a estrógenos se puede llevar a cabo en diversos tejidos, pero principalmente en el tejido adiposo, y este proceso se ve incrementado con la edad y la obesidad (Stifter y MacDonald, 1973). Sin embargo, se sabe que al disminuir el peso actúa reversiblemente sobre las concentraciones de testosterona y de globulina transportadora de esteroides sexuales (Pasqualli, 1988). Con respecto a las concentraciones de LH y FSH en sujetos obesos, existe controversia debido a que, mientras ciertos investigadores afirman que las concentraciones son normales (Kley et al, 1981; Starin et al, 1987), otros postulan lo contrario, ya que en un estudio se observó que las concentraciones de LH eran significativamente menores en obesos en comparación con sujetos de peso normal (Vermeulen, 1993).

Dufau y Veldhuis, (1987) observaron que el E<sub>2</sub> puede influir en el proceso de glicosilación terminal de la hormona luteinizante y la administración de estrógenos induce la secreción de isoformas básicas, aunque aún no se conoce del todo dicho efecto. Por otro lado, se sabe que la T aumenta los niveles de sialización de las proteínas en la hipófisis y que al encontrar los niveles de T disminuidas se puede inducir a una síntesis y liberación de formas de LH más básicas (Mitchell et al, 1994).

El planteamiento experimental contempla la posibilidad de analizar los cambios de la hormona circulante de manera basal, como de aquella que se encuentra lista para ser secretada así como de sus variantes moleculares. Este estudio resulta interesante ya que intenta explorar de forma mas detallada las características bioquímicas de la hormona secretada en condiciones basales así como, después de los estímulos farmacológicos. Asimismo, nos ayuda a comprender el impacto que pueden tener los

niveles de andrógenos y estrógenos en los sujetos con obesidad en la distribución de las isoformas.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar bioquímicamente las diversas formas moleculares de LH secretadas en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH, en sujetos obesos y comparar los hallazgos con lo encontrado en sujetos de peso normal.

## **HIPOTESIS**

Las isoformas circulantes de LH presentarán variaciones en su distribución por carga eléctrica en sujetos con obesidad, probablemente presentando mayor cantidad de isoformas básicas, en comparación a lo encontrado en sujetos de peso normal.

## SUJETOS Y METODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de la Nutrición, se incluyeron un total de 10 varones (5 controles y 5 obesos) clasificados de acuerdo al índice de masa corporal (IMC) (Tabla 1). Este se define de la forma siguiente: el peso dividido entre el cuadrado de la altura ( $P/A^2$ ) expresado en kilogramos por metro al cuadrado. Se considera a un IMC de 25 como el límite superior normal, se considera como sobrepeso al índice entre 25 y 29.9, y de 30 en adelante se clasifica a un individuo como obeso.

Para realizar el estudio se obtuvo la aprobación del comité de estudios en humanos, así como de los sujetos participantes. Los pacientes acudieron al hospital media hora antes del inicio del muestreo (8:00h) para ser canalizados adecuadamente, instalándoseles una mariposa # 21, en una vena antecubital. Previo a la obtención de la muestra se desecharon 0.4mL correspondientes a la solución salina administrada. El protocolo experimental consistió en lo siguiente: a cada sujeto se les extrajeron inicialmente 3 mL de sangre para la cuantificación de LH, FSH, T y  $E_2$  basales, posteriormente se les extrajeron 1.5 mL de sangre cada 10 min durante dos horas en forma basal; posterior a ello, se administraron 10  $\mu$ g de GnRH sintética (i.v), (SERONO de México D. F., SA de CV) y se extrajeron 1.5 mL de sangre cada 10 minutos durante 4 horas. Inmediatamente después se administraron 90  $\mu$ g de GnRH (i.v) y se repitió el muestreo antes indicado durante 4 horas más.

En ninguno de los sujetos estudiados existía antecedente alguno de enfermedad endocrinológica y todos ellos cumplieron con los criterios de inclusión señalados. Durante las 10.5 horas, los pacientes permanecieron en posición de decúbito e ingirieron una dieta baja en grasas, a las 9:00h y 14:00h

**TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

SUJETO	EDAD	IMC Kg/m <sup>2</sup>
OBESO		
1	24	37.69
2	33	39.73
3	25	45.48
4	27	36.84
5	28	41
CONTROL		
1	28	23.5
2	25	24.21
3	23	24.22
4	21	22.85
5	23	22.52

Valores de referencia  
OBESOS IMC  $\geq$  35



### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD**

1. Sujetos masculinos entre los 20 y 35 años de edad.
2. Presentar un índice de masa corporal mayor o igual a 35 kg/m<sup>2</sup>

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD**

1. Presencia de cualquier tipo de enfermedad endócrina asociada o crónica debilitante después de una evaluación clínica.

### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD**

1. Alteración de signos vitales durante el muestreo.
2. Reacción de cualquier tipo a la GnRH administrada en la prueba de estimulación.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS SUJETOS CONTROL**

1. Sujetos masculinos entre 20 y 35 años de edad.
- 2.- Encontrarse entre las percentilas de 25 y 75 de peso

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA LOS SUJETOS CONTROL**

1. Presencia de cualquier tipo de enfermedad endócrina asociada o crónica después de una evaluación clínica

### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN PARA LOS SUJETOS CONTROL**

1. Alteración de signos vitales durante el muestreo.
2. Reacción de cualquier tipo atribuible a la GnRH administrada en la prueba de estimulación.

**Tabla 2. CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES**

SUJETO	LH* (mUI/mL)	FSH* (mUI/mL)	T ng/mL	E <sub>2</sub> pg/mL
OBESO				
1	2.45	2.05	3.38	58.89
2	2.45	1.65	3.11	56.44
3	5.75	3.00	3.85	58.59
4	4.40	4.15	4.61	51.74
5	4.80	8.25	3.32	36.81
CONTROL				
1	4.00	8.60	4.00	34.92
2	0.75	2.00	5.30	46.87
3	2.05	3.25	4.00	46.87
4	3.55	2.00	6.24	43.47
5	1.30	3.60	7.72	39.80

Valores de referencia en adultos normales.

LH = 0.5 - 7.0

FSH = 1.0 - 8.0

T = 3.7-10.0

E<sub>2</sub> = <60

\* Media de dos muestras basales tomadas en intervalos de 20min.

### CROMATOENFOQUE

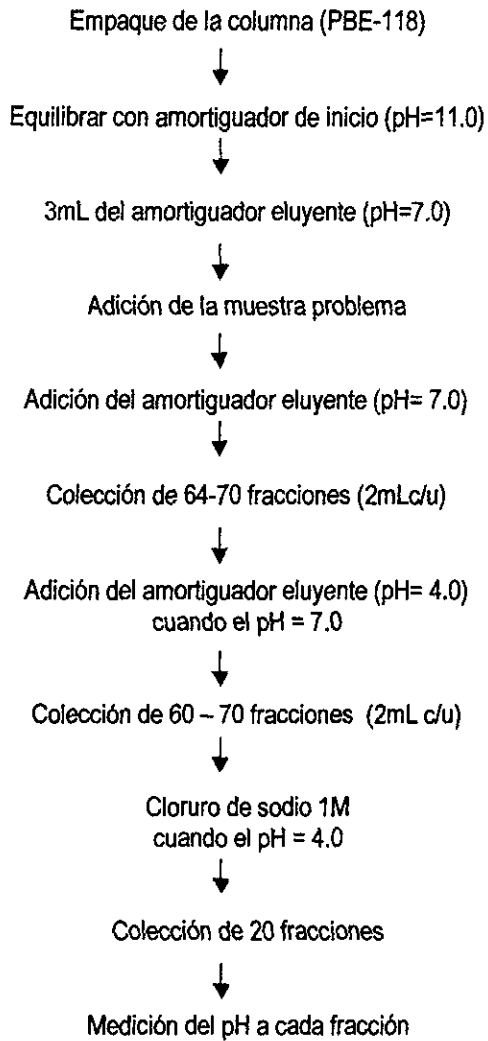


Figura 3. Técnica del cromatoenfoco para la separación de las isoformas de la hormona luteinizante en las muestras problema.

## METODOS

La determinación de las concentraciones hormonales basales de LH y FSH, se determinaron mediante un análisis inmunoenzimático (ELISA) por los técnicos del hospital y los resultados se encuentran expresados en mUI/mL (Tabla 2).

Las muestras de sangre permanecieron durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de que se coagulase, posteriormente se centrifugaron a 1000 r.p.m y se obtuvo el suero resultante.

Con el fin de evaluar el patrón de distribución de las diversas formas moleculares de la LH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos de 10 y 90 µg de GnRH, se constituyeron tres grupos de muestras, (GDM) por separado, para cada sujeto; dos horas basales (GDM 1), cuatro horas pos 10 µg de GnRH (GDM 2), y las cuatro horas pos 90 µg de GnRH (GDM 3). Cada una de las pozas fue transferida a bolsas de diálisis con corte de poro de 12,000- 14,000 (Mr Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA. EUA), dializándose inicialmente durante 24 horas contra agua bidestilada y desionizada y posteriormente contra una solución de carbonato de amonio 0.01 M, durante 24 horas más y, por último se congelaron a -70° C durante 24 h para finalmente, ser liofilizadas con el fin de resuspenderlas en el menor volumen posible para su separación en el cromatoenfoco.

Las diferentes formas moleculares de la hormona luteinizante se separaron mediante un cromatoenfoco (CF) (Fig. 3); método que separa proteínas mediante la interacción de la carga de la molécula con un soporte de carga inmovilizado.

El amortiguador de corrimiento empleado forma un gradiente de pH, de tal forma que la isoforma eluye cuando alcanza su punto isoeléctrico. El CF ofrece la ventaja sobre

otros procedimientos, en que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo de pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y reenocadas con diferentes gradientes de pH. En este caso se utilizó un gradiente de pH de 11.0 a 4.0.

El CF se realizó utilizando como intercambiador iónico a la resina PBE-118 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) para poder incrementar la resolución de la separación de las isoformas, se emplearon columnas de 20 x 1 cm, equilibradas con 15 volúmenes del amortiguador de inicio (Trietilamina-HCL 0.025M, pH 11.0).

Cada una de las series de sueros liofilizados, se resuspendieron en el menor volumen posible (2.5-5.0mL) del amortiguador Pharmalyte (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:45 v/v) pH 7.0. Antes de depositar los sueros liofilizados en la superficie de la columna, se corrieron 4 mL del amortiguador de corrimiento para evitar la exposición de la muestra a valores extremos de pH. El intercambiador iónico y el amortiguador utilizados en el CF, fueron previamente desgasificados 30 minutos, con el propósito de evitar que los iones de bicarbonato provocaran fluctuaciones en el gradiente de pH. Al término de que la muestra se depositó en la columna, y una vez completada su incorporación, se agregó el amortiguador de corrimiento (Pharmalyte pH 7.0). Posteriormente se colectaron 64 a 70 fracciones de 2 mL cada una a 4 C, se midió el pH a cada fracción y cuando este alcanzó un valor de pH menor o igual a 7.0 el amortiguador de corrimiento se sustituyó por un segundo amortiguador de corrimiento Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:8 v/v) pH 4.0. Se colectaron 60 a 70 fracciones hasta detectar un pH menor o igual a 4.0, momento en el cual el segundo amortiguador se cambió por una solución de NaCl 1M para recuperar el material no eluido dentro del intervalo de pH 11.0 – 4.0 (pico de sal).

## PREPARACIÓN DE LOS CONCENTRADOS DE FRACCIONES

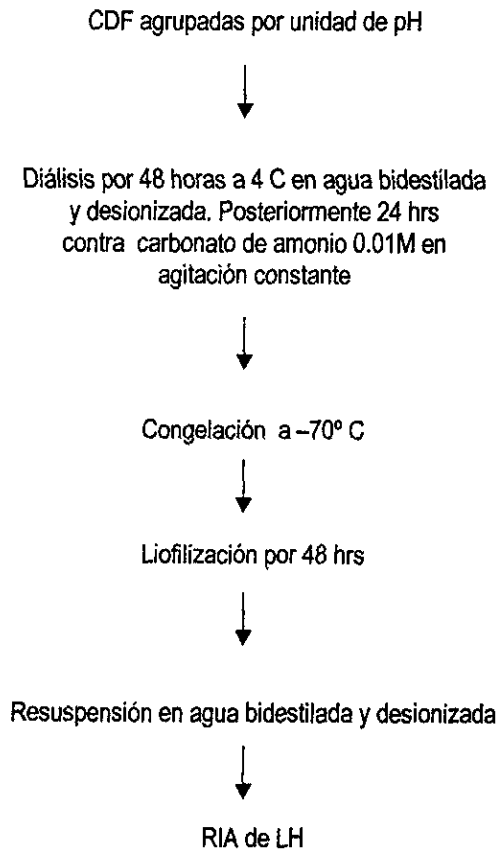


Figura 4. Técnica utilizada para el manejo de los concentrados de fracciones obtenidos después del cromatofluoreo.

## RADIOINMUNOANÁLISIS DE LH

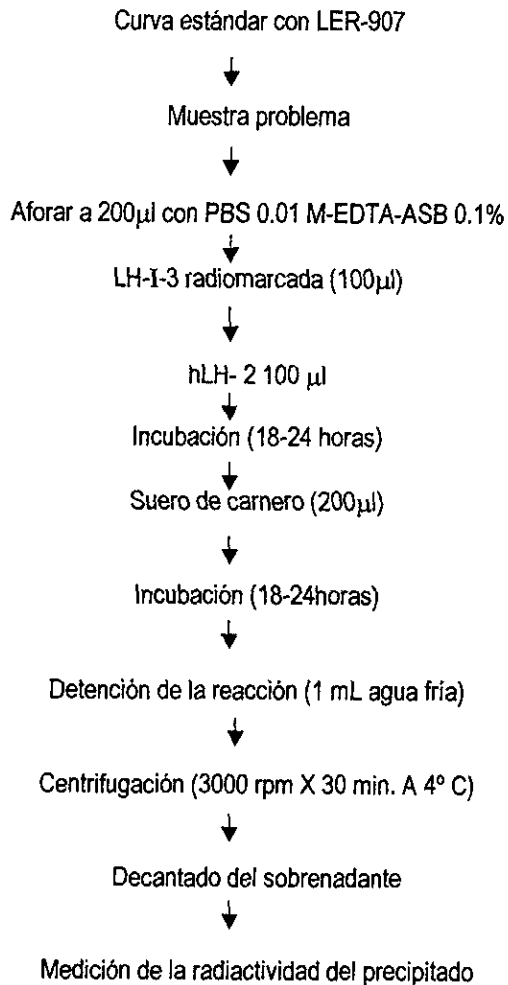


Figura 5. Técnica del radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de LH Inmunorreactiva.



## RADIOMARCAJE DE LH POR EL METODO DE CLORAMINA T

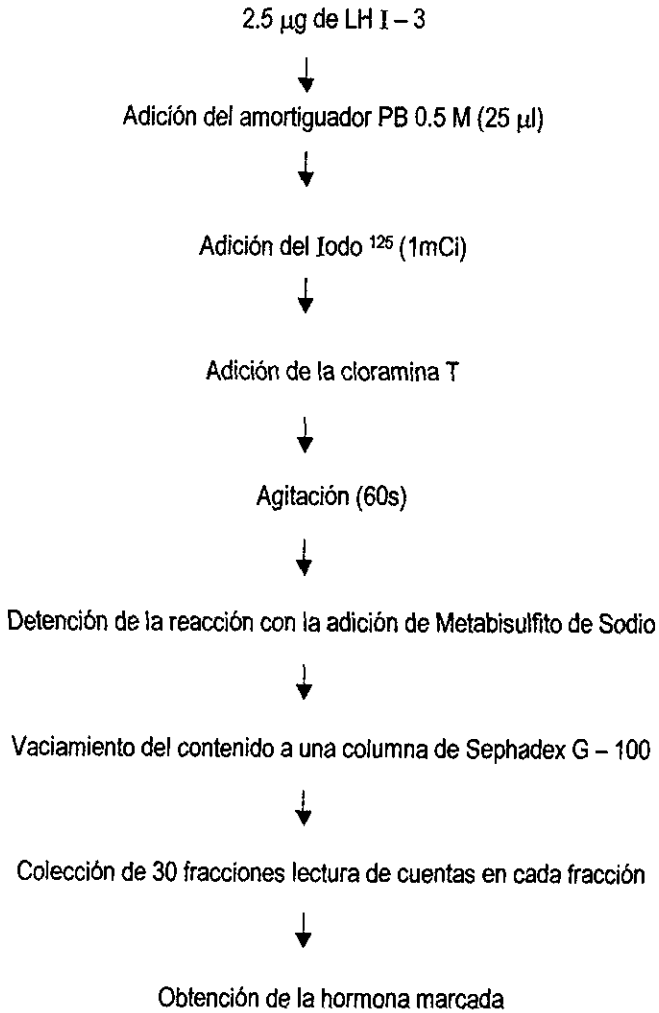


Figura 6. Técnica utilizada para radiomarcarse la hormona luteinizante

Después se colectaron 20 fracciones más y se procedió a medir el pH a cada una de las mismas. Las fracciones se agruparon por unidad de pH, teniéndose un total de 7 concentrados de fracciones (CDF): de 9.99 – 9.0 (CDF 1), de 8.99 – 8.0 (CDF 2), de 7.99 – 7.0 (CDF 3), de 6.99 – 6.0 (CDF 4), de 5.99 – 5.0 (CDF 5), de 4.99 – 4.0 (CDF 6), y el pico de sal (CDF 7). Cada uno de estos concentrados se dializaron por separado con agua bidestilada y deionizada durante 48 horas a 4 C y posteriormente contra una solución de carbonato de amonio 0.01M durante 24 horas más. Finalmente, las muestras se liofilizaron para resuspenderlas en el menor volumen posible de agua bidestilada y desionizada y de esta forma poder determinar la concentración de LH por medio del RIA. (Fig. 4) Los resultados fueron expresados como el porcentaje de recuperación de LH total agregada al cromatofoco.

### **RADIOINMUNOANÁLISIS DE LH**

La inmunorreactividad se cuantificó mediante un RIA específico para la hormona luteinizante (Fig 5). Para dicho ensayo se utilizó el estándar LER-907 (National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney diseases, Bethesda, MD, EUA) (NIADDK) con una sensibilidad de 0.26 ng de LH inmunorreactiva, diluida en PBS 0.01 M-EDTA-albúmina (ASB) 0.1%. El anticuerpo anti-hLH-2 se utilizó a una dilución final de 1:800,000 en PBS 0.1M-EDTA- ASB 0.1%.

Como trazador se utilizó al estándar hLH-I-3 radiomarcado con NaI<sup>125</sup> (Amersham international Limited, Amerhsham, Reino Unido) por el método de Cloramina T descrito por Greenwood et al (1963) (Fig. 6).

La curva estándar y las muestras problema se aforaron a 200 µl con PBS 0.1M-EDTA-ASB 0.1%, incubándose de 18 a 24 horas a temperatura ambiente, momento

en el cual se adicionaron 200  $\mu$ l del segundo anticuerpo (suero de carnero inmunizado con gamma globulina de conejo a una dilución 1:10 v/v con PBS 0.01 M-PEG 8% y se incubaron durante otras 18-24 horas. La reacción se detuvo con 1 mL de agua fría bidestilada y desionizada, seguido por una centrifugación a 3000 r.p.m durante 10 min a 4 C. Posterior a su decantación, se cuantificó la radiactividad del precipitado mediante espectrofotometría utilizando un contador gamma, calculándose la concentración de LH.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para valorar las diferencias entre grupos, tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90  $\mu\text{g}$  de GnRH, se empleó una prueba de T o suma de intervalos de Mann-Whitney, según fuese el resultado de la prueba de normalidad inicialmente aplicada.

Finalmente, para las comparaciones entre todos los concentrados de fracciones se utilizó análisis de varianza y intervalos de 1 vía de Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS

La edad y el IMC de cada sujeto incluido en el estudio se encuentran detallados en la Tabla 1. Las concentraciones basales de LH, FSH, y E<sub>2</sub> de todos los sujetos estudiados se encuentran dentro de los límites establecidos como normales (Tabla 2). Los valores basales de T en dos sujetos obesos se encuentran dentro de los valores de referencia y los tres sujetos restantes están fuera de dichos valores (Tabla 2). El análisis de las muestras séricas por cromatofluorescencia demostró que, bajo las tres condiciones experimentales (basal, pos 10 y pos 90 µg de GnRH), en todos los individuos estudiados, la presencia de múltiples isoformas inmunorreactivas de la hormona luteinizante, éstas se encontraron en un intervalo de pH de 10 – 4.0, así como en aquellas fracciones que no lograron eluir en ese intervalo de pH y que fueron recuperadas después de añadir 1.0mol/NaCl.

Para cuantificar las diferencias existentes en los patrones de distribución de las isoformas de LH, entre ambos grupos de sujetos así como entre las diferentes fases del estudio, cada patrón de CF se dividió en dos regiones de pH, considerándose el pH de 7.0 como punto de corte específico y subdividiéndose así, en isoformas ácidas y básicas. Los cambios existentes en el patrón de distribución de las isoformas de LH se expresaron como el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de LH con valores de pH de elución menor o igual a 6.99, en relación con aquellos en los cuales los valores de elución de pH fueron mayores o iguales a 7.0 (Figura. 7, Figura. 8 y Tabla. 3).

En todos los sujetos estudiados en condiciones basales las isoformas de LH predominantemente se recuperaron en valores de pH menores a 7.0, incluyendo la zona de elución con NaCl. Al comparar los grupos estudiados se encontró que, en

condiciones basales, los sujetos obesos presentaron una mayor abundancia de las formas básicas ( $38.61 \pm 5.27$ ) en relación con sujetos de peso normal ( $18.23 \pm 6.24$ ), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.001$ ).

Las comparaciones entre los dos grupos de sujetos (obesos y controles) después del estímulo con  $10 \mu\text{g}$  de GnRH demostraron diferencias significativas en cuanto a la proporción de isoformas mayores y menores de pH 7.0 ( $p=0.017$ ). Presentándose mayor cantidad de isoformas básicas en los sujetos con obesidad y menor cantidad de isoformas ácidas.

Sin embargo, después del estímulo con  $90 \mu\text{g}$  de GnRH no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, en la proporción de isoformas por arriba y por abajo del pH 7.0 pero, al igual que en condiciones basales, los sujetos con obesidad presentaron una mayor abundancia de isoformas básicas en relación con lo encontrado en los sujetos de peso normal (Tabla. 3 y Figura. 7).

Al aplicar el estímulo con  $10 \mu\text{g}$  de GnRH se observó que todos los sujetos estudiados presentaron un incremento en el porcentaje de las formas básicas, comparándolas con los porcentajes obtenidos en condiciones basales, siendo los sujetos con obesidad de  $38.610 \pm 5.23$  vs  $54.641 \pm 6.23$  ( $p= 0.002$ ) y para los sujetos de peso normal de  $18.237 \pm 6.24$  vs  $40.948 \pm 7.99$  ( $p=0.001$ ). En cuanto al porcentaje de las isoformas ácidas después del estímulo con  $10 \mu\text{l}$  de GnRH éste presentó una disminución con respecto al porcentaje basal. Las diferencias obtenidas fueron estadísticamente significativas, al hacerse la comparación de basal vs pos  $10 \mu\text{g}$  de GnRH que fue en los sujetos obesos de  $61.385 \pm 5.27$  vs  $45.355 \pm 6.234$  ( $p= 0.002$ ) y en los sujetos de peso normal de  $81.760 \pm 6.29$  vs  $59.049 \pm 7.99$  ( $p= 0.001$ ).

Después del estímulo con  $90 \mu\text{g}$  de GnRH hubo una diferencia significativa al compararse los porcentajes de las isoformas de LH básicas en condiciones basales

vs pos 90  $\mu\text{g}$ , los cuales fueron de  $38.610 \pm 5.27$  vs  $58.182 \pm 11.37$  ( $p= 0.008$ ) en los sujetos con obesidad y en los sujetos de peso normal de  $18.237 \pm 6.24$  vs  $46.620 \pm 3.78$  ( $p= 0.001$ ). Y en cuanto a las isoformas ácidas después del estímulo con  $90 \mu\text{g}$  este tuvo una disminución siendo para los sujetos obesos de  $61.385 \pm 5.273$  ( $p= 0.001$ ) y en los sujetos de peso normal de  $81.760 \pm 6.295$  ( $p=0.004$ ).

Por último, al hacerse la comparación de los porcentajes de LH entre los estímulos de 10 y  $90 \mu\text{g}$  no hubo diferencias en la distribución de las isoformas ácidas ni básicas ( $p= 0.1$ ).

**Tabla 3. PORCENTAJES DE FORMAS MOLECULARES DE LH EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS**

	pH	SUJETOS OBESOS (promedio ± DE)	SUJETOS CONTROL (promedio ± DE)
BASAL	≥7.00	38.610 ± 5.273 <sup>*,&amp;a</sup>	18.237 ± 6.246 <sup>&amp;a</sup>
	≤6.99	61.385 ± 5.273 <sup>*,c</sup>	81.760 ± 6.295 <sup>c</sup>
POS 10 µg GnRH	≥7.00	54.641 ± 6.233 <sup>*,&amp;b</sup>	40.948 ± 7.990 <sup>&amp;b</sup>
	≤6.99	45.355 ± 6.234 <sup>*,d</sup>	59.049 ± 7.990 <sup>d</sup>
POS 90 µg GnRH	≥7.00	58.182 ± 11.373 <sup>&amp;b</sup>	46.620 ± 3.728 <sup>b</sup>
	≤6.99	41.815 ± 11.370 <sup>d</sup>	53.375 ± 3.728 <sup>d</sup>

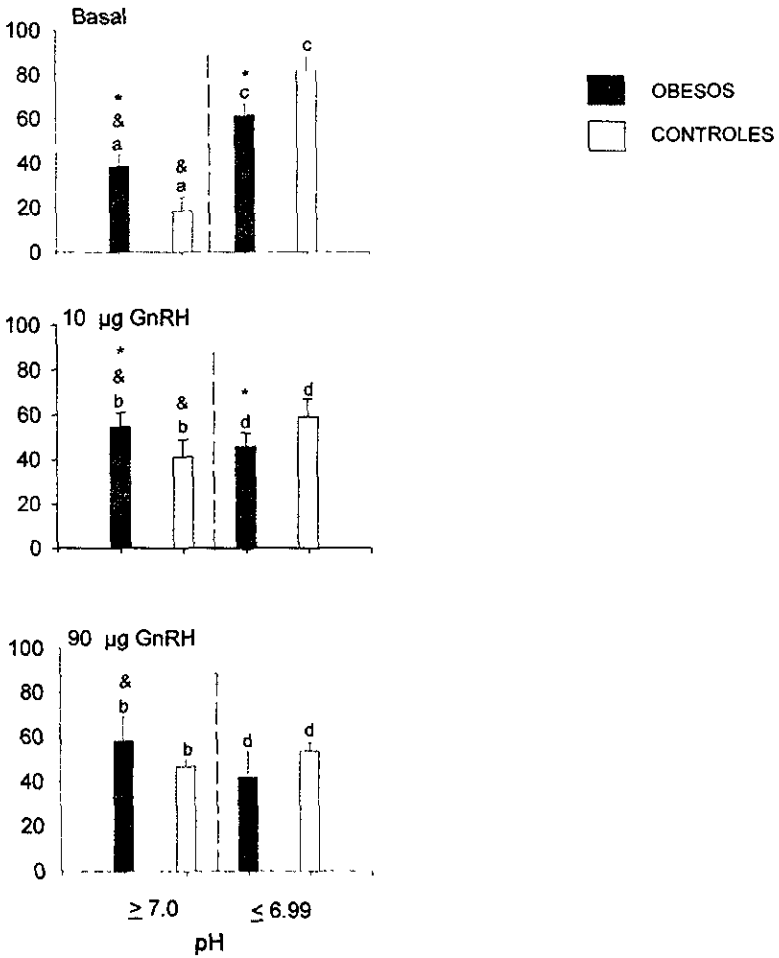
\* p < 0.05 vs controles

& p < 0.05 vs pH ≤ 6.99 en el mismo grupo de sujetos.

Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05) dentro de la misma área de pH en la misma población de sujetos.



% RECUPERACIÓN LH



\*  $p < 0.05$  controles

&  $p < 0.05$  vs  $pH \leq 6.99$  en el mismo grupo de sujetos.

Letras diferentes sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de la misma área de pH en la misma población de sujetos

Fig. 7 Cambios en el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de LH con valores de pH de elución menor o igual a 6.99, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores o igual a 7.0 en 5 sujetos obesos y 5 sujetos control.

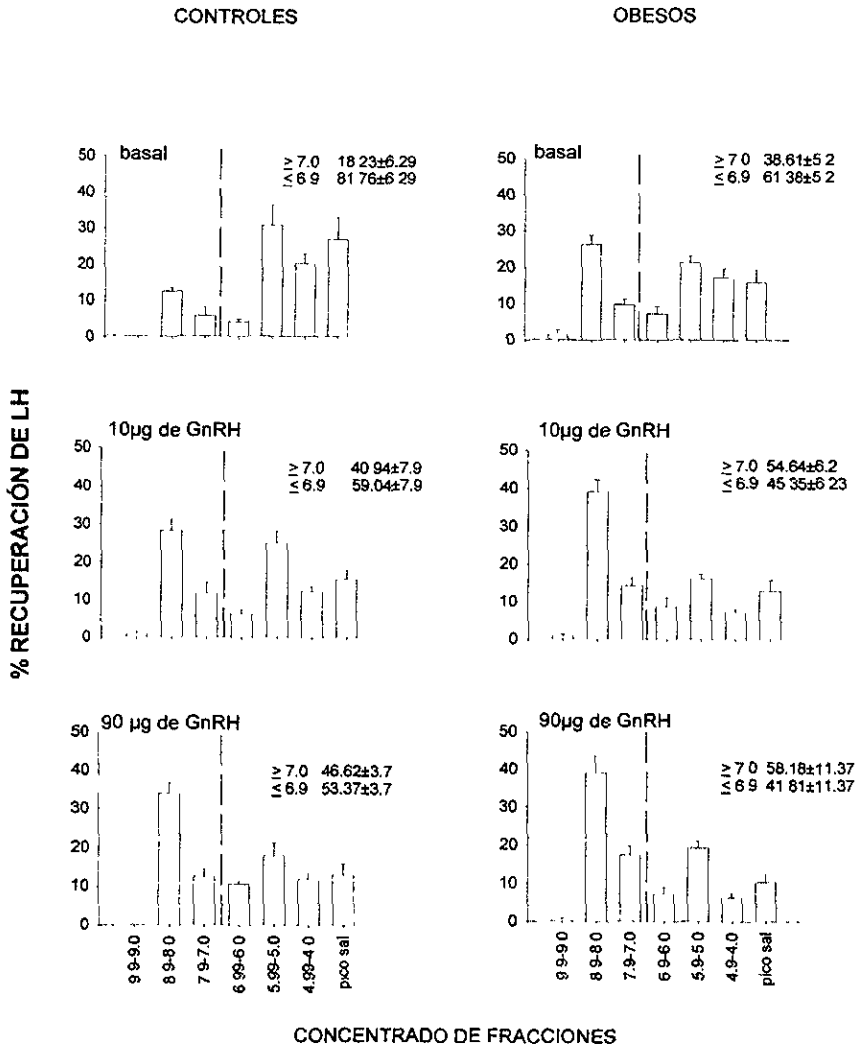


Figura 6. Patrón de distribución por carga de la LH circulante después de su separación por cromatografía en 5 sujetos obesos y en 5 sujetos control cada una de las barras representa la media y la desviación estándar de los porcentajes de LH recuperada de las muestras basales (panel superior) y estimuladas con 10µg (panel intermedio) y 90µg de GnRH (panel inferior). La línea vertical discontinua indican un valor de pH de elución de 7.0

## DISCUSION

Ha sido ampliamente demostrado que las glicoproteínas (LH, FSH, TSH y hCG) no son hormonas de estructura única, sino que comprenden un grupo de isoformas. Cada isoforma posee características biológicas particulares, tales como: la capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades *in vitro e in vivo*, características que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas (Ulloa et al, 1991).

Diversos estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de testosterona y de la globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG) se encuentran disminuidas en varones obesos. A pesar que los mecanismos internos responsables de esta disminución se desconocen en la actualidad, se ha demostrado que la pérdida de peso puede revertirlos, lo que ha confirmado que son secundarios al desarrollo de la obesidad (Stanik et al, 1981; Zumoff et al, 1990, Glass et al, 1977, Strain et al, 1987; Pasqualli et al 1988).

Asimismo, se ha demostrado que la respuesta de las células de Leydig, a la estimulación farmacológica con hCG se encuentra dentro de los valores de referencia, (normales) en los sujetos obesos; sugiriendo con ello que la causa primaria de la disminución de las concentraciones de testosterona no se encuentra a nivel testicular sino que es debida a una alteración hipotálamo-hipofisiaria (Glass, 1977).

Un estudio practicado por Vermeulen et al, (1993) demostró que las concentraciones, de LH eran significativamente menores, en sujetos obesos que en los no obesos, además que la amplitud de los pulsos de LH y la cantidad total de LH secretada también se encontraron disminuidas en estos sujetos.

También, es importante señalar que las concentraciones de E<sub>2</sub> y estrona se

encuentran incrementadas en los sujetos obesos (Schneider et al, 1979). Este incremento se debe en gran parte, a la conversión extraglandular de precursores de andrógenos a estrógenos, pero también puede haber un incremento en la secreción de  $E_2$  en los testículos (Schneider et al, 1979). El  $E_2$  puede influir en uno o más aspectos de la glicosilación terminal de las moléculas de LH (Veldhuis y Dufau, 1987).

La administración de estrógenos en el humano, induce la secreción de isoformas básicas de LH, sin que se haya aclarado si este es un efecto directo o indirecto del estrógeno sobre la hipófisis (Wide et al, 1996). De igual manera se sabe que la testosterona aumenta los niveles de sialización en la hipófisis.

En esta tesis hemos demostrado que la secreción de LH en varones tanto obesos como de peso normal, en las 3 condiciones experimentales, es altamente heterogénea liberándose como una mezcla de isoformas, observándose la presencia de múltiples picos de LH inmunorreactiva, los cuales se encontraron a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado. En ambos grupos, en condiciones basales, las isoformas séricas de la gonadotropina fueron predominantemente ácidas. La predominancia de dichas isoformas en la circulación, no se había descrito anteriormente, ya que en ningún estudio previo se había utilizado un pH menor a 5.0 (Robertson et al, 1977; Van Damme et al, 1977; Wide, 1985). Nuestros hallazgos demuestran que, independientemente de si el varón presenta obesidad o no, las isoformas ácidas en condiciones basales siempre predominarán (Burgon et al, 1996).

En los dos grupos estudiados, todos los individuos presentaron variaciones en la proporción relativa de las isoformas por arriba y por debajo de un pH 7.0, después de los estímulos con GnRH. Posterior al estímulo con 10  $\mu$ g de GnRH, en los dos grupos aumentó la proporción de las isoformas básicas. Las proporciones relativas encontradas después del estímulo con 90  $\mu$ g fueron similares a las observadas

después del estímulo con 10 µg de GnRH, incrementándose discretamente las isoformas con un pH por arriba o igual a 7.0 en todos los sujetos de estudio. La respuesta al estímulo con GnRH concuerda con diversos estudios practicados en animales (Smith, 1982; Ulloa-Aguirre et al, 1992) así como, en humanos (Phillips y Wide, 1994).

Los cambios observados en la distribución de las isoformas de LH después de la estimulación con GnRH podrían deberse a la inducción de cambios en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH, a cambios en el ambiente esteroideogénico o a una combinación de ambos factores. Asimismo, este fenómeno puede deberse a una secreción selectiva de dicho tipo de isoformas (Zalesky y Grotjan, 1991) o a que determinadas isoformas poseen una sobrevivencia selectiva, ya que las isoformas básicas de LH tienen una vida media menor (Burgon et al, 1996).

Ahora bien, hay que considerar que la administración del decapeptido, aún en dosis de 10 µg es una prueba farmacológica y que los cambios que se presenten no pueden ser extrapolables al considerar las condiciones fisiológicas existentes en los sujetos de estudio. Consecuentemente, la mayor proporción de isoformas básicas presentes después del estímulo con GnRH, representa a las formas recientemente sintetizadas. Posteriormente, el incremento en el porcentaje de las isoformas ácidas se presenta cuando las isoformas básicas desaparecen más rápidamente de la circulación (Burgon et al, 1996).

Es importante resaltar que aunque las formas ácidas siempre predominan en estas condiciones, éstas lo hacen en menor proporción en los sujetos con obesidad que en los sujetos de peso normal, encontrándose diferencias estadísticamente significativas al comparar a los grupos entre sí.

La menor proporción de isoformas ácidas en los sujetos obesos puede deberse a los cambios en la síntesis de estas formas moleculares, promovidos por el ambiente

endocrinológico existente en estos sujetos, bien sea por las mayores concentraciones de E<sub>2</sub>, lo cual pudiese influir en el proceso bioquímico de la glicosilación terminal de las moléculas de LH (Vekhuis y Dufau, 1987) o bien, debido a la disminución en las concentraciones de testosterona, por lo tanto la hipófisis induce una síntesis y secreción de isoformas de LH básicas (Mitchel et al, 1994). Después del estímulo con 10 µg de GnRH se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, con lo cual se podría suponer que la secreción basal de GnRH en los sujetos con obesidad no es igual a la de sujetos control; consecuentemente, estos sujetos no poseen concentraciones suficientes de GnRH endógena, por lo tanto no responden de igual manera a la GnRH exógena. Posterior al estímulo con 90 µg de GnRH no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

Los hallazgos previos nos muestran las diferencias existentes en la síntesis y secreción de isoformas observadas entre los sujetos con obesidad y los de peso normal. Los mecanismos intrínsecos que regulan los cambios de las isoformas de LH en los sujetos con obesidad, con respecto a los sujetos de peso normal no han sido definidos, y aunque nuestros resultados contribuyen a un mejor entendimiento de dichos mecanismos, no permiten aún definirlos con precisión. Con base a los hallazgos de nuestro estudio y en el hecho de que el tratamiento con GnRH se altera la glicosilación *in vitro* de la molécula de LH (Lui, et al, 1976; Vogel et al, 1986; Ramey et al, 1987) se puede inferir que existe un efecto directo de la GnRH sobre la regulación de la microheterogeneidad de la LH.

Por último, hay que considerar que para atribuir un significado fisiológico a la regulación del pleomorfismo de LH es necesario demostrar, como lo hemos hecho en este estudio, que las diversas isoformas son secretadas a la circulación y así alcanzan la célula blanco, y que la producción y secreción de las isoformas se encuentra

hormonalmente regulada. Sin embargo, quedaría por demostrar el que estas isoformas difieren funcionalmente, por lo que será necesario llevar a cabo un análisis de la actividad biológica que cada una de estas formas moleculares de la gonadotropina posee y, así será posible entender con mayor precisión los mecanismos de regulación de diversos procesos fisiológicos.

## **CONCLUSIONES**

La distribución de las isoformas de LH en los sujetos obesos en condiciones basales es diferente a la distribución existente en los sujetos control, lo cual pudiese ser consecuencia del ambiente endocrino existente en estos sujetos (mayor aromatización periférica de los andrógenos y/o mayor sensibilidad a la GnRH).



## **REFERENCIAS CITADAS:**

- Amarant, T. Fridkin, M. 1982. Luteinizing hormone-releasing hormone and thyrotropin releasing-hormone in human and bovine milk. *Eur J Biochem* 127:647-650.
- Baezinger JU, Green DE. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of asparagine linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem Biophys Acta* 947: 287.
- Beales PL, Kopelman PG. 1996. Obesity Genes. *Clin Endocrinol* 45:373.
- Beitins, IZ, Dufau, M L. 1977. Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH release during constant infusion of LHRH in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 45: 605-608.
- Black D, James WPT, Besser GM. 1983. Obesity. A report of the royal College of Physicians. *JR Coll Physicians Lond.,* 17:5-12.
- Bremner, WJ. Paulsen, SA. 1974 Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: Evidence from constant administration of luteinizing hormone releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab,* 39: 811-815.
- Bray, GA. 1987. Overweight in risking fate, definition, classification, prevalence and risks. *Ann NY Acad Sci* 499:14.
- Bray, GA. 1987. Obesity. A disease of nutrient or energy balance? *Nutr Rev* 45: 33.
- Burgon PG, Stanton PG, Robertson MD. 1996. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology,* 137:4827-4836.
- Catt KJ, Stojilkovic SS. 1989. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1:15.
- Catt KJ, Dufau ML. 1976. Basic Concepts of Mechanism of Action Peptide Hormones. *Biol. Reprod.* 14:1.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 4: 179.
- Conn, PM, Crowley, WF. 1991. Gonadotropin releasing hormone and its analogues. *New Engl J Med* 324:93-103.
- Conn, MP, 1984. Gonadotropin Releasing hormone. *Molecular and cell biology, physiology, and clinical applications.* *Fed Proc* 43:2351.

- Conn,MP, Janovick,JA, Stanislaus D.1995. Molecular and cellular bases of gonadotropin releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vit Hor*, 50:151.
- Costagliola, S. Niccoli,P. 1994. Glycoprotein hormone isomorphism and assay discrepancy: The paradigm of luteinizing hormone (LH). *J. Endocrinol Inves* 17:291-299.
- Dattatreyamurty,B. Reicher, LE. 1992. A Synthetic peptide corresponding to aminoacid 9-30 of the extracellular domains of the follitropine (FSH) receptor specifically binds LH . *Moll Cell Endocrinology*. 87: 9-17.
- Dufau ML, Catt KJ, 1978, Gonadotropins receptors and regulation of steroidogenesis in testies and ovary. *Vit Horm* 36:461.
- Dunaif A, Mandeli J, Fhlhr H. 1988. The impact of obesity and chronic hyperinsulinemia on gonadotropin release and gonadal steroid secretion in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 66:131.
- Durnin JVGA, Womersley J. 1974. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged 16-72 years old. *Br J Nutr* 32:77.
- Elmquist JK, Maratos Flier E, Spaer CB, Flier JS. 199. Unravwling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1:445.
- Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenzinger JU. 1991. A hepatic reticuloendotelial cell receptor for SO4- 4 Gal Nac beta 1,2 Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67: 1103-1110.
- Fiddes JC, Goodman HM. 1981. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet* 1:3.
- Flores,JA. Aguirre, C. 1998. Luteinizing Hormone Stimulates Both Intracellular Calcium Ion mobilization and Transmembrane Cation Influx in Single Ovarian Granulosa Cells. Recruitment as a Cellular Mechanism of (LH)- (Ca) Dose Response. *Endocrinology*. 139:3606-3612.
- Frisancho, AR .1985. New standars of weight and body composition by frame size and frame for assesement of nutritional status of adults and the eldrly. *Am. Jomal Nutri*. 40: 808.
- Gilchrist RL, Ryu KS, Ji I, JiTH. 1996. The luteinizing hormone/ chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for AMPc and inositol phosphate signals. *J Biol Chem* 271:1928.

- Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, Dahams W, Atkinson RL. 1977. Low serum testosterone and sex hormone binding globuline in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 1211-1219.
- Gotjan, HE. 1989. *Microheterogeneity of Glicoprotein Hormones* (B A Keel and HE Grotjan) 23-52 VRC Press, Boca Raton, Florida.3:11-25
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. 1963. The preparation to <sup>131</sup>I- labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J.* 89: 114.
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Deitel M. 1995. Increased obese mRNA expression on omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine* 89:114.
- Hawes BE, Conn PM. 1993. Molecular mechanism of GnRH action do G proteins and inositol phosphates have role? En : Bouchard P, Caraty Acoelingh Bennink HJT, & Tanner. 35: 63.
- Hseuh,A.J. and Jones,P.B.C. 1983. Gonadotropin releasing hormone: extrapituitary actions and paracrine control mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 45:83-95.
- Huckle,WR y Conn, P.M. 1988. Molecular Mechanism of Gonadotropine Releasing Hormone Action The effector System. *Endo Rev* 19:387.
- Keel BA, Grotjan Jr HE. 1985. Characterization of rat pituitary luteinizing hormone charge microheterogeneity in male and female rats using chromatofocusing: effects of castration. *Endocrinology* 117:354-380.
- Kelton,CA. Cheng, SU. 1992. The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinology.* 89: 141-151.
- Kissebah AH, Peiris AN. 1989. Biology of regional body fat distribution:relationship to non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Met Rev,* 5:83-100.
- Kley HK, Deselaers T, Peerenboom H. 1981. Evidence of hypogonadism in massively obese males, due to decreased free testosterone. *Horm Metab Res* 13:639-700.
- Koninckx, P. Hertogh, R. Heyn, E. 1975. Secretion Rates of LH and FSH During infusion of GnRH in Normal Women an in Patients with Secondary Amenorrhea : Sugestive evidence for Twoo Pools of LH and FSH.*Journal Clinical Endocrinology & Metabolism.* 43: 159-167.
- Kopelman, PG. 1994. Hormones and Obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8:549-560.
- Labrie,F. 1979. Mechanism of action hypotalamic hormones in the adenohipophysis.*Ann. Rev. Physiol* , 41:555-600.

- Lacy, PE. Klein, LN; Fink,JC. 1973. Effect of Cytochasin B on the bifasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology*. 92:1458-1468.
- Leong, DA. Thoner, MO. Lau, SK. 1991. A Potential Code of GnRH induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *Jou Biol. Chem.* 266: 9016-9022.
- Lui TC, Jackson GL, Gorski J. 1976. Effects of synthetic GnRH on incorporation of pituitaries " in vitro" . *Endocrinology* 98:151
- Lukaski HC. 1987. Methods for the assessment of human body composition: traditional an new. *Am J Clin Nutr* 46: 537-560.
- Maitre,C. and Bouchard, P. 1995. Bioassay of gonadotropins based on cloned receptors. *Molecular and Cell Endocrinology*. 125:151-159.
- Mantzoros CS. 1999. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 130:671-685.
- Marshall,LA.Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. *Neuroendocrinology*.1988 10: 239-278.
- Marshall,JC, Kelch,RP. 1986. Gonadotropin releasing hormone: Role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N England J Med* 313:1459.
- Mitchel,R. Bauerfeld, C. Robertson,W. 1994. Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis treatment. *Clinical Endocrinology*. 41:65-73.
- Moghissi,KS. 1992. Clinical applications of gonadotropine releasing-hormone in reproductive disorders. *Endocrin Metab Clin North Am*. 21:125-140.
- Must,A Jacques, PF. Dallai,GE. 1992 .Long term morbidity and mortality of overweight adolescents. *N Eng J Med* 327:1350-1355.
- Parsons, P&T. 1981. Glicoproteins Hormones Structure and Function. *Annual Reviews Inc.* 465-492.
- Pasqualli,R. Cassimirri,F. 1994. Insuline regulates testosterone and sex hormone binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 80:654-658.
- Pasqualli, R Cassimirri F. 1991. Effects of obesity and Body fat distribution on sex hormone and insuline in men. *Metabolism* 40: 101-104.

- Philips DJ, Wide L. 1994. Serum gonadotropins isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endoc Metab* 79:814-900.
- Price, RA, Stunkard AJ, Ness R. 1990. Childhood onset (age less than 10) obesity has high familial risk. *Int J Obes.* 14:185.
- Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger WW. 1987. The effects of gonadotropin-releasing hormone, and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultures rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1503
- Richards ,JC. 1994. Hormonal of gene expresion in the ovary. *Endo. Rev.*15: 725 – 752.
- Robertson DM, Diczfalusy E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Moll Cell Endocrinol* 9:57.
- Rosemberg, E. 1979. Immunoreactivity of standards and reference preparations used in the radioimmunoassay of follicle- stimulating and luteinizing hormones in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 48:163.
- Rosseau MF, Misrahi M, Atger M. 1990. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 54:77
- Roth,KE, Diaz JA. 1996. Filittropin Conformational stability mediates by loop 2 beta effects fillittropin-receptor interaction. *Biochemistry.* 35:7928-7935.
- Ryu KS, Gilchrist RL, Ji L. 1996. Exoloop 3 of the luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor Lys 589 is essential and irreplaceable for human choriogonadotropin (hCG)- dependent receptor activation but not for high affinity hCG binding *J Biol Chem* 271:7301
- Schneider,G, Marvin, A. 1979 Increased Estrogen Production in Obese Men. *J Clin Endocrinol & Metab..* 48: 633-638.
- Segalof DL, Sprengel R, Nikolies K, Ascoli M. 1990. The structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Recent Prog Horm Res* 46::261.
- Siiteri PK, MacDonald PC. 1973. Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. Male reproductive System. Part I. Washington, DC: American Physiological Society, 2: 615.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739.

- Smith S. 1982. Effect of pulsatile GnRH on the release of LH and FSH in vitro by anterior pituitaries from lactating and cycling rats. *Endocrinology* 110:882.
- Soheyla, D. Gharib, M. 1990. Molecular Biology of the Pituitary Gonadotropins. *Endocrine Rew.* 11:177-199.
- Spratt DI, O'dea LSL 1988. Neuroendocrine-gonadal axis in men: Frequent sampling of LH FSH and testosterone. *AM J Physiol* 254:658-666
- Stanik S, Domfeld LP, Maxwell MH. 1988. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 110:882.
- Stanten, J. 1975. Is Aromatization of Testosterone to Estradiol Required for Inhibition of Luteinizing Hormone Secretion in Men. *The Journal Clinic Investigation.* 56:1555- 1563.
- Strain, GW. Zumoff, B. 1981. Mild hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism* 30: 871-875
- Stensland, SH. Margolis, S. 1990. Simplifying the calculation of body mass index for quick reference. *Jam Diet Assoc.* 90:856
- Stephen, J. Winters, P. 1985. Evidence for a Role of Endogenous Estrogen in the Hypothalamic Control Of Gonadotropin Secretion in Men. *J Clinic Endocrinol & Metab.* 61:842-845.
- Steven, R. Smith, MD. 1996. The Endocrinology of Obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 25: 921-939.
- Thomas D, Rozzel G, Lui X, Segaloff DL. 1996. Mutational analyses of the extracellular domain of the full length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine- rich repeats 1-6 are involved in hormone binding. *Mol Endocrinol* 10:760
- Ulloa-Aguirre, A. Espinoza, R. Damián-Matsumura P. 1988. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Human Reproduction.* 3:491-501.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley R, Beitinis IZ, Padmanabhan V. 1995. Follicle stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Enocr Rev* 16:1-10.
- Ulloa-Aguirre, A. Timossi, C. 1998. Structure function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction* 4:260-283
- Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. 1982. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *Journal Endocrinology* 95:257-280

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V. 1991. Specific Regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in humans. *Journal Andrology*. 12:27.
- Van Damme MP, Robertson DM, Diczfalusy E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. III. Biological and immunological profiles of urine preparations after electrofocusing. *Moll Cell Endocrinol* 9:69-80.
- Veldhuis, J Dufau, ML. 1987. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biological active luteinizing hormone in man. *J Clin Investigation*. 80:631-637.
- Veldhuis, JD: Dufau, ML: 1990. Endocrine testis of gonadal function: Testes and Ovary in Kovacs K, Asa SLD (eds): *Biochemical Testes Functional Endocrine Pathology*. Boston, Blackwell Scientific Publication, 34.
- Veldhuis, JD. 1991. Dynamics of the hypothalamic pituitary-testis axis. *Reproductive Endocrinology*. 409.
- Vermeluen A Kaufman JM, Deslypere JP, Thomas G. 1993. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation in plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1140.
- Vogel DL, Magner JA, Shermis RJ. 1986. Biosynthesis, glycosilation and secretion of rat luteinizing hormone alpha and beta-subunits: differential effects of orchietomy and GnRH. *Endocrinology* 119:202.
- Wang,CF. Lassely, BL. Lein, A. 1976. The Functional Changes of the Pituitary Gonadotrophs during the Menstrual Cycle. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 42: 718-728.
- Williams,J. Bremmer y Paulsen, A. 1974. Two Pools of Luteinizing Hormone in the Human Pituitary Evidence from Constant Administration of Luteinizing Hormone Releasing Hormone. *Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 39: 811-815p.
- Wilson DJ, Foster DW, 1998. *Williams Textbook of Endocrinology*. W.B Saunders CO. Philadelphia 165-379
- Wilson, CA. Leight. AJ. Chapmann, AJ. 1990. Gonadotrophin glycosilation and function. *J Endocrin*. 125:3-10.
- Zalesky DD, Nett TM, Grotjan HE. 1992. Ovine luteinizing hormone isoforms in the anaestrus. *J Anim Sci* 70: 3851.