

11282
3



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en
pacientes con Diabetes Mellitus insulino-dependiente
en diferentes condiciones de control metabólico

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Médicas
que presenta el Maestro en Ciencias

Juan Carlos López Alvarenga

Tutor de Tesis: Doctor Alfredo A. Ulloa Aguirre



La Dirección General de Bibliotecas se
compromete a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo excepcional.
NOMBRE: Juan Carlos López Al-
varenga
FECHA: _____
LUGAR: _____

México, D. F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

**Función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en pacientes con
Diabetes Mellitus insulino-dependiente en diferentes condiciones de
control metabólico**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Médicas que presenta
el Maestro en Ciencias

Juan Carlos López Alvarenga

Tutor: Doctor Alfredo A. Ulloa Aguirre

Mex. D.F. , 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Terminar un proceso... o en realidad empezar uno nuevo. Los seres humanos estamos sometidos a esta variabilidad que a su vez tiene características deterministas, como los modelos caóticos de la reacción química de los gases. Una variabilidad dentro de ciertos límites que, aunque se mueva casi en el mismo lugar, cada vez profundiza el conocimiento en función del tiempo de estudio, idea acorde al movimiento taxanómico de Ortega y Gasset.

El camino de la medicina empieza con un pregrado muy bien trazado, con materias que no dejan duda del conocimiento médico. Esta etapa derrocha juventud y sueños de un ser Médico que quebrará de forma implacable a la enfermedad. Pronto pasamos a la incertidumbre del área clínica y en la práctica hospitalaria percibimos que tal vez la Medicina no tiene la clava de acero como parecía e incluso se comprende a resolos que se debe consolar al paciente que buscó nuestra ayuda limitada, por lo que se apaña la idea primigenia de curación en la infancia estudiantil. En la especialidad se aprenden habilidades que, aunque parecen estereotipadas, son útiles en el tratamiento del paciente. Además, se solidifica una forma de pensar, de abordar un problema con modelos preestablecidos.

Pero cuando se decide ser investigador, aparece la insatisfacción en cuanto a los modelos aprendidos. Empezamos a demoler lo que sabemos y entonces reconstruimos sobre los rastrojos de la incertidumbre. El escepticismo predomina en la nueva forma de pensamiento, pero aún debe ser presionado en su molde de barro todavía fresco por los ya iniciados: los investigadores con experiencia.

El investigador novel se ve rodeado de una carga de exigencias, muchas de ellas burocráticas, que le obligan a mantenerse escribiendo o morir. La mediocridad se hace una amenaza seria a la que se debe aplastar con tenacidad y paciencia. ¿Qué será del que tomó un bote hacia el mar de lo desconocido? ¿Escila y Caribdis o el jardín de las Hespérides será su meta?

Ahora que he finalizado mi trabajo en el astillero, he construido una barca. Ya dispuesto, veo atrás y distingo a lo largo de mi vida una serie de personas cuyo contacto, en su mayoría, ha resultado en crecimiento. Algunas de éstas personas a quienes expreso mi agradecimiento, son:

El comité tutorial integrado por el Dr. Francisco Javier Gómez Pérez, quién me inició en los primeros pasos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de investigador, y el Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, que escucharon las presentaciones iniciales de esta tesis. También a los investigadores que formaron parte del comité previo el Dr. Julio Granados, Dr. Israel Lerman, y ante todo al Dr. Juan José Calva, que en momentos difíciles estuvieron prestos a ayudarme, cuando el primer anteproyecto no pudo llevarse a cabo. A la M en C Teresa Zariñán, cuya destreza en el laboratorio es admirable. Al Dr. Jorge González Barranco que, además de apoyo económico, permitió la disponibilidad de las 896 horas invertidas en las muestras de las personas participantes en el estudio y en 3200 horas de búsqueda de los pacientes.

La Lic. En Enfermería María Luisa Velazco y la QFB Lucy Guillén Pineda, quienes tomaron muestras de los pacientes para análisis químico de rutina, además me enseñaron la técnica del difícil arte de mantener una vena permeable durante 10 horas. El equipo de nutriólogos, cuyas opciones dietoterapéuticas fueron aceptadas con gusto por los pacientes, las Lic. Nutr. Laura Y. Triana Carmona, Lic. Nutr. Sagrario Orellana y Lic. Nutr. Monserrat Pérez Navarro.

La Lic. Nutr. Victoria E. Bolado García, coordinó en forma eficiente el equipo de nutriólogos durante muchos años con lo que ganamos experiencia y aprendizaje académicos. La Lic. Teresa García quien hace varios años me dio orientación con la beca 117634 del CONACyT.

Agradezco también al grupo de sinodales del examen de grado, todos ellos investigadores experimentados, quienes revisaron esta tesis: Dr. Juan A. Rull Rodrigo, Dr. Fernando Larrea Gallo, Dra. Patricia I. Canto, Dra. Ivonne Castro Romero, Dr. Carlos Villanueva y Dr. Moisés Mercado.

He pasado agradables horas comentando, además de música, los hallazgos del estudio y en la discusión de la interpretación de los resultados con el Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, tutor de la tesis. Sin su interés y la pasión por la investigación no hubiera sido posible un nuevo enfoque en mi formación como Doctor.

Finalmente, agradezco a la Dra. Rosa E. Sosa Camas quien me dio una preciosa luz de alegría: Elena Beatriz, que ha sido fuente de inspiración. Algunos, que aunque no se encuentran cerca (Aminta AM, Carlos LD, Roxana C, Rafael LA, Jorge E LA, Adriana EP, Luis B, Howard C, Beatriz C, Laura Marcela, Stephen C, Carlos C, Carlos y Pablo LC, Lorena L, Kimberly y Karlita) si lo están en mi interior.

¡Iniciamos la travesía!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

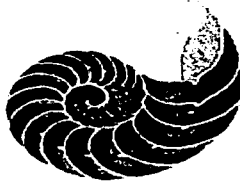
INDICE

RESUMEN	6
I. INTRODUCCION	8
A. Mecanismos de control del eje reproductor en el varón	8
E. Diabetes Mellitus tipo I.	13
D. Estudios recientes en animales de experimentación	15
II. JUSTIFICACION	17
III. OBJETIVOS	17
A. Objetivo General:	17
B. Objetivos particulares	18
IV. HIPOTESIS GENERAL	18
V. DISEÑO DEL ESTUDIO	19
VI. SUJETOS Y METODOS	20
A. Sujetos	20
B. Criterios de elegibilidad	21
Criterios de inclusión	21
Criterios de exclusión	22
C. Método y procedimiento	22
D. Determinaciones hormonales	24
Bioensayo <i>in vitro</i> de la LH	25
E. Análisis estadístico	27
VII. Implicaciones éticas	27
VIII. Resultados	28
A. Desgaste (attrition) de la muestra de sujetos estudiados	28
B. Secreción episódica de LH y estímulos con GnRH	31

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C. Estimulo de testosterona con hCG	34
E. Bioanálisis in vitro de LH y el cociente B/l.	36
IX. Discusión	37
A. Método empleado	37
B. Pulsos de LH, estímulos con GnRH y el papel de la insulina	39
C. Estimulo de testosterona con hCG.	42
D. Conclusión	44
X. Referencias	45

Anexo: Poorly controlled type I Diabetes mellitus in young men selectively suppresses luteinizing hormone secretory burst mass. J Clin Endocrinol Metab 2002, 87: 5507-5515.



TESIS CON
FALLA DE CONTEN

RESUMEN

Diferentes estudios en animales han analizado la acción de la insulina sobre el eje reproductivo; sin embargo, en humanos la acción sobre la regulación de la LH aún permanece en controversia. Debido a que los sujetos con diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) muestran reducción absoluta de la producción de insulina, representan un modelo de estudio para explorar cuál es la acción de la insulina sobre la función reproductiva.

En el presente estudio se analizaron las posibles alteraciones en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Se diseñó un estudio transversal en el que se formaron tres grupos: Personas con DM-1 controlados (A1C <8%), DM-1 descontrolados (A1C >10%) y sujetos controles normales, todos con actividad sexual adecuada. Los participantes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Estudios Biomédicos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se les invitó a dos días de estudios en la Unidad Metabólica. El primer día del estudio, se les canalizó una vena con solución salina (500 mL/10 h) con lo que se la mantuvo permeable. Se tomaron muestras de sangre para LH cada 10 minutos durante 6 h y luego se realizó un estímulo con GnRH (10 µg I.V.); se continuó con la misma frecuencia de obtención de muestras por dos horas y luego se repitió el estímulo con GnRH obteniéndose nuevas muestras por dos horas adicionales. Al día siguiente, se llevó a cabo la estimulación con hCG (40 UI/kg de peso actual I.M.), se tomaron muestras de sangre para medir la concentración de testosterona (T) cada hora por seis horas, luego a las 24, 48 y 72 h postestímulo.

Se realizó radioinmunoanálisis y bioanálisis *in vitro* de LH utilizando células HEK-293 transfectadas con el receptor de LH recombinante. La T en suero, se midió por quimioluminiscencia. Se empleó el método de conglomerados para determinar la presencia de picos de LH y luego, por deconvolución se calcularon las características secretorias de la hormona.

Nueve sujetos controles completaron los estímulos con GnRH y hCG. Ocho sujetos con DM-1 controlada fueron estimulados con GnRH y trece sujetos DM-1 descontrolada fueron admitidos al estudio (a 11 se les realizó estímulo con GnRH y a 9 con hCG. No hubo diferencias clínicas entre los grupos en cuanto a

TESIS CON
FALLA DE CUMPLIMIENTO

la edad, el estado de nutrición, concentraciones en suero de cortisol, prolactina, hormona folículo estimulante y estrógenos.

La concentración basal en suero de LH fue más baja en el grupo con DM-1 descontrolada (11 ± 1.6 UI/L, promedio \pm error estándar) comparado con la de DM-1 controlados (19.1 ± 1.8 UI/L) y los controles (18.5 ± 1.5 UI/L). La misma relación se observó para la concentración máxima de LH durante el primer estímulo con GnRH, expresado como área bajo la curva: Los sujetos con DM-1 descontrolada (3960 ± 570 UI·L⁻¹·min⁻¹) mostraron casi la mitad de respuesta que los DM-1 controlados (6920 ± 640 UI·L⁻¹·min⁻¹) o los normales (6660 ± 560 UI·L⁻¹·min⁻¹). La masa de LH fue menor en los DM-1 descontrolados (7.0 ± 1.1 UI/L) comparados con los DM-1 controlados (11.7 ± 2.1 UI/L) y los controles (12.9 ± 1.5 UI/L, $p=0.024$). El mismo hallazgo se observó para la tasa de producción pulsátil de la LH (47 ± 6.3 vs 78 ± 10.5 vs 87 ± 11 UI/6h, respectivamente, $p=0.008$).

A pesar de que los sujetos con DM-1 descontrolada mostraron tendencia a menor T basal, la respuesta máxima después de tres días del estímulo fue normal. No hubo diferencias en las concentraciones de SHBG ni en el índice de T / SHBG entre los grupos estudiados. El cociente de actividad biológica / inmunológica basal fue mayor en los sujetos con DM-1 descontrolada (0.81 ± 0.106) comparados con los DM-1 controlados (0.37 ± 0.080) y los controles (0.48 ± 0.057 , $p<0.02$).

Este estudio demuestra que la insulina juega un papel importante en la secreción de LH en sujetos con DM-1. La menor concentración basal de LH no se asoció a menor respuesta de T al estímulo con hCG, lo que es debido a la mayor potencia biológica de la LH en los sujetos con DM-1 descontrolados.

Este hallazgo es el primero que muestra un modelo humano que se asocia a la disminución relativa de insulina con la secreción alterada de LH.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

I. INTRODUCCION

En el humano las principales funciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada son la regulación y producción de hormonas sexuales y la gametogénesis.¹ El hipotálamo y la hipófisis anterior participan en conjunto para la regulación de estas funciones, por medio de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La GnRH estimula a las células gonadotróficas de la hipófisis para la síntesis y liberación de las hormonas luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH). La LH estimula la producción de andrógenos por las células de Leydig en el testículo y de la teca en el ovario. La FSH actúa sobre las células de Sertoli y de la granulosa, del testículo y ovario, respectivamente.²

A. Mecanismos de control del eje reproductor en el varón

La íntima relación anatómica y funcional entre el hipotálamo y la hipófisis, dada por el sistema microvascular portal hipofisario, delimita una vía para el paso de sustancias del hipotálamo (como GnRH) hacia la hipófisis para la regulación de su función hormonal.³ Existen diversas posibilidades de flujo sanguíneo de la hipófisis a sus estructuras vecinas: secreción directa al seno cavernoso, a la carótida, al líquido cefalorraquídeo e incluso un flujo retrógrado (hipófisis-hipotálamo), lo cual puede tener implicaciones en algunos estados patológicos (v.g. hiperprolactinemia con impotencia). Estos sistemas se interrelacionan y autocontrolan por medio de mecanismos de retroalimentación: positiva (estimulación) o negativa (inhibición).⁴

A.I. HIPOTALAMO

El hipotálamo se encuentra debajo y ventralmente del tálamo y forma el piso y las paredes inferiores del tercer ventrículo. Cada mitad del hipotálamo medial se puede dividir en tres regiones: la supraóptica que contiene los núcleos supraóptico, supraquiasmático y paraventricular; la región tuberal que contiene los núcleos ventromedial, dorsomedial y arcuato además de la eminencia media y la mamilar; la región posterior que contiene el núcleo posterior y varios núcleos mamilares. Aunque el hipotálamo corresponde

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

al 0.3% del peso total del cerebro, tiene funciones reguladoras importantes.⁵ La transmisión sináptica está regulada por aminoácidos, monoaminas y neuropéptidos.

Las norepinefrina estimula la liberación de GnRH en el hipotálamo. Otras aminas tienen efectos diferentes, como el caso de la dopamina, cuyo receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a las proteínas G. La dopamina estimula o inhibe la liberación de gonadotropinas dependiendo del tipo de receptores: los D₁ y D₅ interactúan con G_s, por lo que estimulan a la adenilato ciclasa; en cambio, los D₂, D₃ y D₄ interactúan con G_i, produciendo inhibición de la adenilato ciclasa. La serotonina (5-HT) es otra amina, derivada del triptofano, y ejerce una influencia importante en la secreción de LH, ACTH, prolactina y GH. La acción de estímulo o inhibición de la 5-HT también dependerá del tipo de receptor al que se acople. Se han descrito 16 subtipos diferentes, la mayoría son receptores acoplados a proteínas G. Los receptores 5-HT_{2c} están ampliamente distribuidos en el área preóptica, núcleo ventromedial, núcleo arcuato, núcleo dorsomedial y en los plexos coroideos. Aminoácidos excitatorios como el glutamato (GLU), estimulan la liberación hipotalámica de GnRH. El GLU es sintetizado a partir de la glutamina, gracias a la enzima mitocondrial glutaminasa activada por el fosfato. Debido a su potente actividad tóxica, su concentración es sumamente baja. Los receptores GLU son heterogéneos y corresponden a canales iónicos de diferentes configuraciones, así como a proteínas G que modulan segundos mensajeros de sistemas como los del inositol trifosfato y la adenilato ciclasa. El ácido gamma-amino-butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso. Disminuye la secreción de gonadotropinas tanto en el hipotálamo como en la hipófisis. El GABA se sintetiza a partir de GLU por la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Los receptores GABA_A son canales iónicos oligoméricos, típicamente muestran una configuración pentamérica. Los GABA_B son receptores acoplados a proteínas G. Se ha observado que se encuentran en el hipotálamo dorsomedial.⁶

Recientemente se han descrito neurotransmisores gaseosos como el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO). El NO es un mensajero sintetizado a partir de la L-arginina, su descubrimiento vino a modificar los conceptos actuales de neurotransmisión. Este gas activa guanilato ciclasas solubles que contienen una molécula heme que interactúa con dos subunidades. Cuando el NO se une al heme, produce cambios conformacionales en la enzima, estimulando su actividad catalítica.⁷ En el hipotálamo

TESIS CON
FALLA EN LA CALIFICACIÓN

estos dos neurotransmisores estimulan la liberación de GnRH.

Los péptidos liberados por el hipotálamo son la GnRH y péptidos opioides, ambos tienen efectos sobre la liberación de las gonadotropinas hipofisarias.

La GnRH es un decapeptido lineal ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC). El precursor, la pro-GnRH contiene 92 residuos de aminoácidos que incluye la secuencia de un polipéptido de 56 aminoácidos llamado péptido relacionado con GnRH (GAP).⁸ Las neuronas secretoras se localizan principalmente en el área preóptica del hipotálamo anterior; sin embargo, el papel de la GnRH contenida en las neuronas de las porciones extrahipotalámicas es desconocida, aunque existen teorías que le atribuyen una participación en el comportamiento sexual de los sujetos que es potenciado por la presencia de testosterona (T).⁹

El contenido hipotalámico de GnRH depende de distintos factores. Las regiones del núcleo arcuato y la eminencia media son influidos por la presencia de esteroides gonadales.^{4,10} En ratas, la gonadectomía disminuye el contenido de GnRH y aumenta la secreción de gonadotropinas. El tratamiento con estrógenos revierte esta situación; sin embargo no existe modificación del contenido de GnRH en la región rostral del hipotálamo⁴. Estas determinaciones de GnRH sólo pueden realizarse a nivel experimental en animales, dado que no existen métodos de determinación directa que sean seguros, y la determinación en sangre periférica no es representativa ni confiable para estudios de fisiología. En estudios en animales de experimentación se ha demostrado una correlación significativa entre GnRH endógena y la secreción episódica de LH por lo que se infiere que un estudio apropiado de las pulsaciones de LH en sangre periférica venosa puede ser un buen indicador de la actividad hipotalámica.^{11,12,13,14} En base a ésta premisa se han logrado determinar los principales reguladores de la generación de GnRH: péptidos opioides endógenos, andrógenos, estrógenos, vías alfa adrenérgicas, neuronas serotoninérgicas, dopamina, factores de envejecimiento, y la liberación disociada de LH y FSH. Analizaremos los más importantes a continuación.

Los péptidos opioides y sus agonistas sintéticos ejercen una amplia gama de efectos en la secreción de hormonas hipofisarias, estimulan la liberación de prolactina, GH y ACTH, e inhiben la liberación de LH, oxitocina y arginina vasopresina. La Met y Leu-encefalinas fueron los primeros péptidos opioides aislados

TESIS CON
FALLA DE OMBEN

del cerebro, y desde entonces se han identificado las secuencia de gran cantidad de péptidos con secuencias similares. La administración de naloxona o naltrexona (antagonistas) incrementa las concentraciones en suero de LH inmunorreactiva en forma aguda, como resultado del aumento en la frecuencia de los pulsos de secreción, asociado a un incremento en la amplitud del pico de LH.^{15,16} Por lo tanto el efecto de los péptidos opioides es inhibitorio en la secreción de LH. La T y los estrógenos potencializan este efecto inhibitorio.^{17,18,19}

A.II. HIPOFISIS.

Existen muchos ejemplos de la aparente disociación en la secreción de LH y FSH, los cuales sugieren distinto control hipotalámico en su secreción.^{20,21} Esto puede ser el resultado de diferentes efectos de los esteroides sexuales, péptidos gonadales como la inhibina o las isoformas A, B y AB de la activina²² en la secreción de LH y FSH.²³ Estudios en animales de experimentación sugieren la presencia de uno o más factores liberadores de FSH, producidos posiblemente por neuronas localizadas en el área dorsal anterior hipotalámica.^{23,24}

La LH es una glicoproteína secretada por gonadotropos de la hipófisis anterior. Tiene una estructura heterodimérica que consiste en dos cadenas polipeptídicas designadas como α y β unidas por enlaces no covalentes. La subunidad α es idéntica para todas las hormonas glicoproteicas (LH, FSH, TSH y hCG), en tanto que la subunidad β es específica y contiene la diferencia estructural y funcional de cada hormona.^{1,2} Las modificaciones postraduccionales en los componentes oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas, tienen profundos efectos en la carga molecular, *in vivo* alteran la vida media y la actividad biológica de las hormonas.

Los residuos de ácido siálico y de sulfato, presentes en los oligosacáridos de la LH determina su tasa de depuración metabólica, así como su potencia biológica. Los sulfatos terminales favorecen la remoción de las gonadotropinas de la circulación en su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas; en cambio, el ácido siálico disminuye su captación.²⁵ Estas isoformas tienen diversidad de efectos fisiológicos, como la regulación puberal, en la que las niñas muestran formas menos ácidas que los niños o modificaciones en el ciclo menstrual, donde en el período ovulatorio la vida media se hace más corta y

predominan formas más básicas que en las fases folicular y lútea.²⁶

La secreción de GnRH es episódica^{27,28,29} y por lo tanto la LH es liberada en forma de pulsos. Los picos circulantes tienen amplitudes que varían del 35 hasta el 270 % del valor basal y ocurren con una frecuencia de un pulso cada 1 a 2 horas. Las hormonas sexuales alteran la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH en el hombre.^{11,17,19,26,30} Dado que la LH estimula a las células de Leydig para la producción de andrógenos, la secreción de las hormonas sexuales también es paralelamente episódica y tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis y secreción de LH.

A.III. TESTICULO

Los componentes esenciales del testículo son las células de Leydig, cuyo principal producto es la T, y los túbulos seminíferos que comprenden la mayor parte del testículo. Ambos están interrelacionados y requieren de la unidad hipotálamo-hipofisiaria para el mantenimiento de su función.

Los andrógenos tienen un efecto de retroalimentación negativa, tanto en la frecuencia de generación de pulsos de GnRH, como de la cantidad y tipo de moléculas de LH a ser secretada. Estos mecanismos incluyen:

- 1) Cambios en la función biosintética de los gonadotropos en respuesta a una alteración en la frecuencia de los pulsos de GnRH.
- 2) Efecto directo en la síntesis, procesamiento post-traducciona l de carbohidratos y/o en la secreción de LH por las células gonadotrópicas. Esto se refleja en los resultados de estudios clínicos donde el cociente actividad biológica / inmunológica (B/I) de LH disminuye en hombres normales a quienes se administra dosis supresoras de dihidrotestosterona,^{31,32} del mismo modo ésta relación aumenta con el tratamiento antiandrogénico.³³

La región ubicada entre los túbulos seminíferos es conocida como zona intertubular o tejido intersticial, y aquí se encuentran las células de Leydig. En la etapa fetal tienen una morfología epitelioide, posteriormente se modifica con aumento del tamaño del aparato de Golgi, de las mitocondrias y de vesículas, que secretarán esteroides del tipo andrógenos. Se han identificado peroxisomas que contienen una proteína transportadora de esteroides, lo que sugiere una participación activa en el transporte de

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

colesterol.³⁴

El control de la producción de T es gracias a la LH, la que se une a receptores específicos en la superficie de las células de Leydig. La interacción de la LH con el receptor activa la vía del AMPc a través de proteínas que ligan al GTP.³⁵ Sin embargo, también podría modificar la concentración intracelular de calcio por activación de la vía de lipoxigenasa.³⁶ La acción de la LH permite una serie de eventos que resultan en la provisión de colesterol como sustrato y estimulación de la enzima que rompe la cadena lateral y que convierte el colesterol a pregnenolona con lo que deriva la cascada de esteroides que llegará a los andrógenos.

Estrógenos. El exceso de estrógenos endógenos en el hombre, suprime la amplitud, pero no la frecuencia de las pulsaciones espontáneas de LH inmunorreactiva.³⁷ Los estrógenos también controlan la actividad biológica de las moléculas de LH liberadas.³⁸

E. Diabetes Mellitus tipo 1.

La diabetes mellitus constituye un grupo de estados patológicos caracterizados por alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos. Se considera que la patogénesis puede ser por la ausencia de la insulina o por alteraciones funcionales de la misma, de la hormona *per se*, alteraciones del receptor o con mayor frecuencia de alteraciones a nivel post-receptor. Estas situaciones conducen a hiperglucemia y complicaciones secundarias entre las que destacan: vasculopatía, neuropatía, retinopatía y nefropatía, además de alteraciones agudas como cetoacidosis y estado hiperosmolar.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) es un ejemplo clásico de éste grupo de enfermedades, dada la incapacidad del páncreas para producir insulina, conduciendo al grado máximo de alteración para metabolizar carbohidratos, proteínas y lípidos, así como acompañarse de un desequilibrio de las hormonas contrarreguladoras, principalmente catecolaminas, glucagon, glucocorticoides y de la hormona de crecimiento.

En la DM-1 existen ciertas anomalías que potencialmente pueden alterar la función del eje reproductor. En modelos experimentales, la diabetes se encuentra invariablemente asociada a disfunción

de este eje reproductor y aparentemente la deficiencia de insulina juega un papel crucial en esta anomalía.^{39,40,41,42,43,44,45} Es bien conocido por estudios en animales de experimentación que la insulina potencia el efecto de la LH en la esteroidogénesis.⁴¹ Las ratas macho con diabetes experimental presentan una marcada disminución de la esteroidogénesis testicular, manifestada *in vivo* por disminución en la concentración circulante de T, e *in vitro* por la disminución en la secreción basal de la T y la respuesta atenuada de la misma a la gonadotropina coriónica (hCG), la que en condiciones normales incrementa la producción y secreción de T.^{32,37,39,46} En éste modelo experimental ha sido posible detectar una disminución significativa del número de células de Leydig en aquellos animales con mayor alteración metabólica.⁴⁷ De la misma manera, a nivel testicular, los glucocorticoides (hormona contrarreguladora de la insulina) inhiben directamente la esteroidogénesis *in vitro* e *in vivo*, posiblemente a través de la disminución en el contenido de receptores para la LH.⁴⁸ En la unidad hipotálamo-hipofisaria de las ratas con diabetes experimental se observa disminución acentuada en la función de los gonadotropos, así como de la respuesta a GnRH.^{33,38,49,50,51} *In vitro*, la insulina tiene un efecto directo sobre la hipófisis aumentando la secreción basal de la LH, así como la magnitud de la respuesta a GnRH.⁴⁴

La función del eje reproductor en pacientes con DM ha sido poco estudiada. Murray y colaboradores⁵² estudiaron un grupo de diabéticos, con 6 a 28 años de evolución clínica de la enfermedad y que cursaban con neuropatía visceral (manifestada principalmente por impotencia orgánica primaria) en presencia o ausencia de enfermedad vascular. Detectaron concentraciones de T libre en suero disminuidas con elevación concomitante de las concentraciones de LH urinaria, postulando la presencia de hipogonadismo hipergonadotrópico como causa de la impotencia orgánica. En este estudio no se informó del grado de afección renal de los sujetos estudiados, la cual *per se* puede alterar la función del eje,⁵³ ni tampoco incluyó controles de edades similares. Otros estudios han informado concentraciones en suero normales o disminuidas de gonadotropinas así como de T circulante,^{54,55,56,57,58} pero ninguno ha diferenciado los diferentes tipos de diabéticos.

No existen, en la actualidad, estudios sobre el análisis de las características de la secreción pulsátil de las gonadotropinas en personas con diabetes, lo cual es un aspecto crítico para investigar los mecanismos fisiopatogénicos involucrados en las alteraciones de la función del eje reproductor. En el paciente con DM-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 y descontrol metabólico podrían existir una pluralidad de factores que, de manera independiente, contribuyen a la disfunción del eje reproductor masculino. Por otro lado, la deficiencia de insulina podría inducir disminución en la producción de andrógenos, la cual a su vez alteraría la función del eje hipotálamo-gonadotropo (particularmente la relacionada con el control de la síntesis y secreción de la LH) tanto cualitativa como cuantitativamente. En pacientes descontrolados en forma crónica y con periodos repetidos de hipoglucemia, asociados a irregularidades en la terapia sustitutiva, la disfunción del eje podría estar relacionada con periodos de estrés y la consecuente elevación de los opioides endógenos y del cortisol en respuesta a los episodios agudos de hipoglucemia. Los primeros podrían ejercer efectos supresores del eje a nivel hipotalámico, y el segundo a niveles hipofisario como gonadal.^{44,59,60} La presencia de nefropatía agravaría o induciría dicha disfunción.^{49,61,62}

D. Estudios recientes en animales de experimentación

Bucholtz y cols,⁶³ estudiaron los efectos agudos de la hipoinsulinemia durante el período de crecimiento de corderos diabéticos. Se incluyeron 6 animales machos a los que se realizó gonadectomía a los 7 días de nacidos para evitar influencias de regulación negativa por la producción de esteroides. Estos recibieron dos dosis de estreptozotocina (100 mg/kg i.v.) y luego de dos semanas se demostró la presencia de diabetes e hipoinsulinemia, por lo que recibieron tratamiento con insulina lenta vacuna o porcina subcutánea cada 12 horas. Luego de la inyección con estreptozotocina, los animales perdieron peso y la ritmicidad de la secreción de LH, sin embargo, luego de implementar el esquema de dosis de insulina, se observó recuperación del ritmo de crecimiento y la frecuencia de pulsos de LH fue comparable a la condición de prediabetes.

En otra fase del estudio, se midió el efecto agudo de la suspensión de insulina en la secreción de LH al suspender bruscamente la insulina. A las 24 horas del retiro de la insulina, se observó un aumento de la glucosa circulante, ácidos grasos libres, cortisol, y cetonuria. La frecuencia de pulsos de LH disminuyó de 8.1 ± 0.26 pulsos/6 h hasta 6.0 ± 0.6 pulsos/6 h a las 96h, acompañado de aumento de los ácidos grasos libres y disminución del peso corporal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cambio observado en la frecuencia de pulsos de la LH revirtió luego del tratamiento agudo con insulina, además disminuyeron las concentraciones de glucosa, ácidos grasos libres y de cortisol. Se evaluó el efecto de esteroides gonadales utilizando un implante de estradiol, con lo que se observó una acentuación de la inhibición de los pulsos de LH debida al estradiol. Concluyeron que la presencia de insulina es necesaria para la aparición de pulsos de LH.

En otro estudio, Tanaka y cols,⁶⁴ utilizaron la aplicación directa de insulina en el ventrículo lateral de LH ovejas gonadectomizadas y con diabetes inducida con estreptozotocina. El aumento de los pulsos de LH aumentó en forma significativa al momento de infundir la insulina en el ventrículo, independiente de la glucemia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. JUSTIFICACION

Existen estudios en los que se ha analizado la acción de la insulina sobre el eje reproductivo de mamíferos, sin embargo, su importancia en la regulación de la síntesis y secreción LH en el hombre es aún incierta. Las alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada han sido poco estudiada en varones con DM-1. La producción pancreática de insulina se encuentra alterada en la DM-1, por lo que en esta condición representa un modelo de estudio para analizar la acción de la insulina sobre el eje reproductor en el humano.

En el presente estudio, se incluyeron varones con DM-1 sin manifestaciones tardías de la enfermedad, para explorar los efectos del descontrol metabólico secundarios a deficiencia relativa de insulina, en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El propósito fundamental fue analizar si la deficiencia relativa de insulina es capaz de alterar la secreción pulsátil de la LH, cambiar sus características químicas (medida en forma indirecta por la vida media plasmática y la actividad biológica *in vitro*) y modificar la respuesta del intersticio testicular al estímulo con hCG. Para lograr estos propósitos se estudiaron la función hipofisaria y testicular de varones adultos con DM1D durante periodos de descontrol y control metabólico y los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos de sujetos normales.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo General:

Estudiar la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en varones con DM-1 comparando dos diferentes condiciones de control metabólico determinados por la glucemia y la hemoglobina glucosilada (A1C): en control aceptable de la glucosa (DM-1 controlados) y en mal control de la glucosa (DM-1 descontrolados).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. Objetivos particulares

1. Analizar las características de la secreción episódica de la LH y su capacidad funcional en varones con DM-1.
2. Analizar, en forma indirecta, cambios en la estructura molecular de la LH secretada por varones con DM-1 a través del estudio de su depuración plasmática y su capacidad para inducir la producción de AMPc en sistemas *in vitro*.
3. Analizar la reserva testicular en varones con DM-1, en términos de secreción de T en condiciones basales y de estimulación exógena con gonadotropina coriónica humana (hCG).
4. Analizar los efectos del descontrol metabólico crónico en la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo en pacientes con DM-1.

IV. HIPOTESIS GENERAL

El descontrol metabólico por deficiencia relativa de insulina en pacientes con DM-1, se asocia a alteraciones en la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Estas alteraciones ocurren a 3 niveles:

- a. En el hipotálamo: la secreción episódica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se encuentra alterada;
- b. A nivel hipofisario: la producción, secreción y estructura molecular de la LH se encuentran alteradas como consecuencia de la disfunción hipotalámica y las deficiencias relativas de insulina y de T;
- c. En el testículo: la producción de T basal y estimulada con hCG se encuentra disminuida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio se diseñó como comparativo, transversal, experimental y prolectivo.⁶⁵ Se analizaron las características de la secreción pulsátil de la LH y la reserva testicular de varones con DM-1 controlados (A1C < 8%), DM-1 descontrolados (A1C > 10%) y un grupo de varones sin DM-1 (controles). Para estudiar las características de la secreción episódica de la LH, los pacientes se sometieron a un muestreo sanguíneo frecuente cada 10 minutos durante 10 horas, así como a dos pruebas de reto con GnRH exógeno.

La reserva testicular se estudió mediante la administración de una dosis única de hCG, y la obtención subsecuente de muestras sanguíneas a intervalos de una hora durante 6 horas y posteriormente cada 24 horas durante tres días para determinar las respuestas temprana y tardía con el estímulo. Estos procedimientos se llevaron a cabo tanto en pacientes en descontrol metabólico moderado así como en aquéllos que se encontraban en condiciones de control estricto. Se estudió además un grupo de sujetos sanos, de edades similares a los pacientes, que se sometieron voluntariamente a los procedimientos señalados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. SUJETOS Y METODOS

A. Sujetos

Para el análisis de la secreción pulsátil y la reserva hipofisiaria de LH se estudiaron 28 varones, con edad comprendida entre los 20 a 30 años de edad. Se incluyeron 11 DM-1 descontrolados, 9 sujetos DM-1 controlados durante los últimos 2 meses que precedían al estudio. El grupo control estuvo constituido por 9 varones adultos sanos de edades semejantes a las de los grupos con DM-1, con índice de masa corporal (IMC) entre 18.5 y 27 y sin tratamiento farmacológico alguno.

El análisis del estímulo de T por hCG se efectuó en 27 sujetos (9 en cada uno de los grupos ya descritos). Hubo dos sujetos (DM-1 controlado y descontrolado) a los que únicamente se les realizó estímulo con hCG sin prueba con GnRH. En cambio, cuatro pacientes (DM-1 descontrolados) no completaron los tres días posteriores a la prueba de hCG, por lo que solo entraron al análisis de GnRH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

1. Índice de masa corporal entre 18.5 y 27.
2. El grupo de DM-1 descontrolados fue establecido considerando la concentración en sangre de A1C mayor de 10 y menor de 14%.⁶⁶ Además de un promedio de la concentración en suero de glucosa en ayunas entre 200 y 300 mg/dl, en por lo menos en 3 ocasiones diferentes inmediatas al inicio del estudio.
3. Los pacientes del grupo DM-1 controlados estuvieron bajo tratamiento con esquemas de dosis múltiples de insulina. Los dos meses previos al estudio la A1C debía estar < 8% y glucemias en ayuno por debajo de 200 mg/dL, en por lo menos 3 ocasiones diferentes. Además, el propio día del estudio debían presentar concentración de A1C < 8% y glucemia en ayunas preprandial < 130 mg/dl y postprandial <180 mg/dl.
3. Ambos grupos de DM-1 debían mostrar ausencia o presencia mínima (+) de cuerpos cetónicos en orina.
4. Evolución clínica de DM-1 menor de 7 años.
5. El grupo de DM-1 descontrolados fue tratado con esquemas convencionales de insulina (1 ó 2 dosis de insulina intermedia humana con o sin insulina de acción rápida junto con la intermedia). En el caso del grupo de DM-1 controlados se utilizó esquemas intensivos (la mayoría de ellos con insulina humana de acción rápida o ultrarrápida antes de cada comida e insulina humana NPH a las 22:00 horas).
6. Presentar en los 3 días previos al estudio concentración de hemoglobina superior a 12 g/L y hematócrito mayor de 36%.
7. Sexualmente activo.
8. Firmar el consentimiento voluntario e informado de participar en el estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Criterios de exclusión

1. Presencia de nefropatía diabética manifestada como macroalbuminuria (albuminuria > de 300 mg/24 h) o insuficiencia renal.
2. Enfermedad coronaria establecida o insuficiencia vascular arterial en alguno de los miembros o con manifestación clínica en sistema nervioso central.
3. Presencia de infección aguda.
4. Presencia de hipercolesterolemia (colesterol de LDL mayor de 160 mg/dL).
5. Presión arterial sistólica mayor de 140 mmHg ó diastólica mayor de 90 mmHg, o diagnóstico establecido de hipertensión arterial.
6. Presencia de cualquier tipo de sangrado.

Criterios de eliminación

1. Alteración aguda en la presión arterial, frecuencia cardíaca o temperatura, que indiquen la posibilidad de alguna modificación fisiológica durante el estudio.
2. Decisión voluntaria de no continuar en el estudio.

C. Método y procedimiento

Los DM-1 fueron invitados a participar al momento de asistir a la consulta externa de diabetes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), solo dos pacientes fueron procedentes del Hospital General de México. Para el grupo control, se invitó a jóvenes estudiantes de medicina del INCMNSZ. Se les explicó, a todos los sujetos, el procedimiento detallado del estudio y se insistió que en caso de no aceptar, su tratamiento o actividades en el Instituto no se verían afectadas. Se registró información sobre la edad, peso, talla e historia clínica de actividad sexual. Firmaron un consentimiento informado que había sido aprobado por el Comité de Ética en Humanos del INCMNSZ.

TESIS CON
FALLA DE CUBRER

Si el sujeto mostraba $A1C > 10\%$, y cumplía los criterios de inclusión, se tomaba un nuevo examen a las cuatro semanas y en caso de mantener la $A1C > 10\%$ se incluía dentro del grupo de DM-1 descontrolados y se obtenían muestras de sangre para el estudio. En caso de tener la $A1C < 8\%$, se tomaron muestras de sangre cada cuatro semanas en dos ocasiones más. Una vez demostrado que mantenía la $A1C$ en los niveles descritos, se le incluyó en el grupo de DM-1 controlados y se sometieron la estudio. En el caso que un paciente con DM-1 mostrara una $A1C$ discretamente por arriba de 8% , pero menor de 8.5% , se le modificaba la estrategia de aplicación de la insulina para utilizarla entre tres a cinco veces al día durante al menos ocho semanas. Una vez que el paciente alcanzaba cifras de $A1C$ por debajo de 8% , se le mantenía por debajo del mismo nivel durante 8 semanas más.

A todos los pacientes se les prescribió un programa de alimentación para mantener el peso. La ingestión de energía diaria se calculó en base a la fórmula de Harris-Benedic para gasto energético basal, multiplicado por un factor de corrección para ejercicio de 1.2. La prescripción nutricional consideró una distribución de macronutrientes de 50% hidratos de carbono, 20% de proteínas, 30% de lípidos y se restringieron los hidratos de carbono simples a menos del 10% .

El primer día del estudio, los sujetos acudieron a la Unidad Metabólica del INCMNSZ a las 07:30 h., momento en el que fueron sometidos nuevamente a un examen clínico detallado para valorar su estado general. Posteriormente se realizó una punción de una de las venas antecubitales con un catéter Jelco del #18, dejando la vía de acceso venosa permeable con la infusión lenta de una solución salina fisiológica (50 mL/h). La obtención de las muestras sanguíneas ($3 \text{ mL/muestra/10 minutos}$) se inició a las 08:00 h y concluyó a las 18:00 h. Después de haberse completado 6 horas de muestreo, se les administró una dosis de $10 \mu\text{g}$ de GnRH (14:00 h) y a las dos horas se repitió el mismo estímulo (16:00 h), cada uno de estos estímulos se dio como bolo intravenoso rápido. Cada muestra permaneció a temperatura ambiente 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a 4° C durante 15 minutos. El suero resultante se almacenó en congelación a -20° C hasta que se determinó la medición de LH inmunorreactiva.

Los sujetos con DM-1 recibieron la dosis y tipo de insulina habitual, así como una dieta blanda (desayuno a las 08:00 h y comida a las 14:00 h) con distribución de macronutrientes CHO 50% , proteínas 20% y lípidos 30% . El día del estudio se determinó la concentración de glucosa en las muestras obtenidas antes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y dos horas después de los alimentos. Los pacientes permanecieron encamados, en posición de decúbito dorsal o con el respaldo elevado 45° y no se les permitió dormir.

Este estudio permitió analizar los siguientes aspectos:

1. La sensibilidad y reserva hipofisaria de LH al GnRH.
2. Las características de la secreción episódica de la LH.

En el segundo día de estudio los voluntarios acudieron nuevamente a la Unidad Metabólica y se siguió el mismo procedimiento del día anterior con las siguientes modificaciones: Después de obtenida la primera muestra basal (a las 08:00 h) se inyectó hCG por vía intramuscular a la dosis de 40 U/kg de peso; posteriormente se obtuvieron muestras cada hora durante 6 horas así como a las 24, 48 y 72 horas. Después de su obtención, cada muestra permaneció a temperatura ambiente 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm a 4° C durante 15 minutos. El suero resultante se almacenó en congelación a -20° C hasta la determinación de su contenido de T.

Este segundo estudio permitió analizar:

1. Las respuestas temprana y tardía del intersticio testicular al estímulo gonadotrópico.
2. La reserva testicular.

D. Determinaciones hormonales

La concentración circulante de LH inmunorreactiva se determinó mediante radioinmunoanálisis.⁶⁷ Se empleó NIH LH-13 marcada con ¹²⁵I (actividad específica de 70-90 µCi/mg de proteína), anticuerpo utilizado para LH-2 humana (dilución final de 1:800,000) y LER-907 como estándar (1 mg de LER-907 equivale a 277 UI).⁹¹ Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron 4.1%-6.2% y 6.1-11.3%, respectivamente, sobre rangos de desplazamiento de 15-23%, 45-59% y 75-84%.

La FSH se cuantificó en una poza común formada con las muestras de las 6 horas basales del primer día de pruebas, se consideró el estándar de gonadotropina de la Segunda Reunión Internacional para Preparación de Referencias.⁶⁸ La prolactina se determinó por ELISA (Immunometrics, London, UK)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

empleando la Preparación de Referencia Internacional de la OMS 84/500. La sensibilidad del análisis fue 20 mUI/L, con un rango absoluto de 40-310 mUI/L. El estradiol se midió por una radioinmunoanálisis de fase sólida (Diagnostic Products, Los Angeles, CA), SHBG se cuantificó con fluorinmunoanálisis (Delfia, Wallac, Inc. Turku, Finlandia) y el cortisol por radioinmunoanálisis (OMS Matched Reagent Program, Geneva, Switzerland).

Las concentración circulante de T se determinaron mediante análisis enzimático de quimioluminiscencia en un analizador automatizado (Immulite®). Este método supera al radioinmunoanálisis (RIA) de muestras extraídas con solventes orgánicos.⁶⁹

Bioensayo *in vitro* de la LH

El suero obtenido de las muestras de sangre tomadas durante 10 horas, fue combinado en tres pozas para cada uno de los sujetos: el período basal de 6 horas, y los dos períodos que correspondieron a las dos horas luego de los estímulos con GnRH. En estas pozas se analizó la respuesta de LH en células fetales de riñón humano transfectadas con ADNc del receptor de LH humano (HEK-293). Estas células expresan en forma estable el receptor de LH humano, fueron donadas por el Dr. Aaron Hsueh de la Universidad de Stanford de los Estados Unidos. El contenido de LH inmunorreactiva fue también cuantificado.

Las células HEK-293 fueron cultivadas en DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), bajo en glucosa, a pH de 7.3, y suplementadas con 5% suero fetal de ternera, 2 mmol/L L-glutamina, 100 mg/mL geneticina (Life Tehcnologies, Inc.), 50 U/mL penicillina y 100 mg/mL de estreptomocina (Sigma, St. Louis, MO) y crecieron en botellas de cultivo de 162-cm² (Costar, Cambridge, MA). Luego las células (5×10^4 células / pozo de cultivo) fueron lavadas y expuestas a dos dosis diferentes (25 y 50 μ L) del suero de cada poza o a LH recombinante humana (estándar) en la presencia de 0.2 mmol/L de 1-metil-3-isobutilxantina (Sigma), suplementados con DMEM durante 24 h a 37°C. Todas las muestras (de los sujetos y las que se emplearon para las curvas estándares) fueron diluidas con suero

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

de mujeres que utilizaban anticonceptivos orales (suero libre de gonadotropinas).

El medio de cultivo y las células fueron incubadas a 96°C durante 3 minutos y almacenados en congelador a -20°C. La sensibilidad del análisis fue de 0.05 ng por tubo de LH recombinante. Todas las pozas de cada individuo fueron incubadas por triplicado para el bioanálisis y se corrieron en un solo análisis. Los coeficientes de variación inter e intraanálisis fueron menores de 18% y de 14%, respectivamente.

Radioinmunoanálisis de AMPc

La concentración total de AMPc (intra y extracelular) se determinó por radioinmunoanálisis (RIA) luego de acetilar las muestras y los estándares de AMPc. El RIA de AMPc se determinó empleando 2-O-monosuccinil AMPc tirosilmetil-éster (Sigma) radiomarcado por el método de la cloramina-T y el antisuero anti-AMPc CV-27 cAMP (NIADDK) a una dilución de 1:50 000, albúmina sérica bovina (ASB) al 0.1%, pH 6.1. Como trazador se utilizó 2-O-monosuccinil tirosil-metiléster de AMPc (Sigma Chemical Co, St. Louis MO USA), radiomarcado con ¹²⁵I. Luego de incubar a 4°C durante 24 h, el AMPc libre y el unido fueron separados por precipitación con etanol, seguido de centrifugación a 1200 x g a 4°C. La sensibilidad del análisis fue de 4 fmol/tubo y los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron entre 8 -12 % y entre 4 - 6 %, respectivamente. La actividad biológica de la LH se calculó por interpolación. Los datos se expresaron como el promedio del cociente de actividad biológica / inmunológica (B/I).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar. Se realizaron estadísticas de resumen así como gráficas de cajas para determinar la distribución y presencia de valores extremos de los datos. Para las variables de tipo cuantitativo se realizó una prueba t de Student para muestras independientes. El análisis de varianza se utilizó para determinar diferencias entre los resultados generados en los 3 grupos (pacientes con DMID en descontrol y control metabólico y controles normales). Para los contrastes *post hoc* se realizó prueba de Newman-Keuls y se consideró como estadísticamente diferentes aquellos contrastes con error tipo I menor del 5%.

La respuesta de LH al estímulo con GnRH y la testicular a la administración de hCG se analizaron con el método de trapezoides para calcular las áreas bajo la curva. La identificación de pulsos de LH basal se analizó por conglomerados (*Cluster analysis*). La frecuencia, amplitud, masa de los pulsos hipofisarios y la vida media ($t \frac{1}{2}$) de la LH se calculó por deconvolución. Los picos y nadires fueron ponderados a 1/1 puntos; y se utilizó t de Student con un valor de 2.6/2.6 para detectar aumentos o disminuciones. Este valor de 2.6 a un valor de significancia de 0.05 para dos colas y con 5 grados de libertad.¹⁴

VII. Implicaciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado en el que se le explicó el motivo del estudio así como la posibilidad de participar en forma voluntaria.

Los DM-1 descontrolados se mantuvieron sin cetosis, éste periodo de descontrol relativo se mantuvo durante los 5 días del estudio. Ninguno de los pacientes mostró complicaciones agudas, cetoacidosis u otra que ameritara hospitalización.

Una vez finalizado el estudio, los pacientes permanecieron en la consulta externa y a todos los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

descontrolados se les modificó el esquema o el tipo de insulina con el objeto de mejorar su control.

VIII. Resultados

A. Desgaste (attrition) de la muestra de sujetos estudiados

La pérdida de pacientes en la muestra fue poca: Nueve sujetos controles completaron los estímulos con GnRH y hCG. Nueve sujetos con DM-1 controlados ingresaron al estudio, sólo en uno no se realizó el estímulo con GnRH pero sí con hCG. Trece sujetos DM-1 descontrolados, fueron admitidos al estudio, sin embargo, en cuatro de ellos la prueba con hCG no se realizó o fue incompleta. Además en un sujeto no se realizó prueba con GnRH y en otro el radioinmunoanálisis de LH.

En la tabla 1 puede apreciarse las características de cada uno de los pacientes, así como los promedios de las variables y el número de sujetos de acuerdo a los estímulos con GnRH o hCG que se realizaron.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Sujeto	Grupo	Edad (años)	IMC	A1C %	GnRH	HCG
1	RCG	Control	28	23.0	5.6	Si	Si
2	MRS	Control	25	25.0	5.7	Si	Si
3	MRO	Control	23	26.8	6.2	Si	Si
4	EDG	Control	26	24.9	4.9	Si	Si
5	JOR	Control	27	24.5	5.2	Si	Si
6	LTJC	Control	21	25.1	4.7	Si	Si
7	LMG	Control	23	23.0	5.5	Si	Si
8	LRO	Control	28	25.0	6.6	Si	Si
9	EJEB	Control	22	25.0	5.8	Si	Si
	N=9	PROMEDIO ±DE	24.8±2.6	24.7±1.2	5.6±0.6	N=9	N=9
10	JGU	DM controlado	23	22.7	6.0	Si	Si
11	AFL	DM controlado	25	25.4	7.6	Si	Si
12	CMR	DM controlado	23	22.4	7.9	Si	Si
13	CVA	DM controlado	23	24.0	5.4	Si	Si
14	ESP	DM controlado	23	22.8	7.2	Si	Si
15	GSP	DM controlado	27	22.6	7.6	Si	Si
16	NMN	DM controlado	26	20.4	6.8	Si	Si
17	RPG	DM controlado	24	23.0	6.9	No se realizó	Si
18	JJS	DM controlado	20	21.2	6.8	Si	Si
	N=9	PROMEDIO ±DE	23.8±2.0	22.7±1.4	6.9±0.8	N=8	N=9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Sujeto	Grupo	Edad (años)	IMC	A1C %	GnRH	HCG
19	AJChB	DM descontrolado	22	18.7	14.9	Si	No se realizó
20	MANJ	DM descontrolado	30	20.7	12.0	Si	No se realizó
21	MAM	DM descontrolado	26	20.0	10.3	Si	No se realizó
22	MAHD	DM descontrolado	22	23.7	12.5	No se realizó	Si
23	SPL	DM descontrolado	23	21.0	12.6	Si	Si
24	RBE	DM descontrolado	22	19.0	12.9	Si	Si
25	JAR	DM descontrolado	20	22.5	13.2	Si	Si
26	IRR	DM descontrolado	24	25.9	12.3	Si	Si
27	MIR	DM descontrolado	20	20.6	14.7	Si	Si
28	LAR	DM descontrolado	20	24.2	10.8	Si	Si
29	RRG	DM descontrolado	24	26.6	10.0	No se realizó	Si
30	AGP	DM descontrolado	24	26.8	10.6	Si	Fiebre
31	IGS	DM descontrolado	20	25.2	11.2	Si	Si
	N=13	PROMEDIO ±DE	22.8±2.9	22.7±2.9	12.2±1.6	N=11	N=9

Tabla 1. Características generales de los sujetos. Se resumen el número de sujetos de acuerdo al grado de control; promedios y desviaciones estándares de edad, IMC y A1C; número de sujetos que se sometieron a los estímulos con GnRH y hCG.

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

B. Secreción episódica de LH y estímulos con GnRH

En la tabla 2 y figura 1, se muestran las características generales de los grupos en los que se cuantificó la LH basal y con estímulos de GnRH de 10 μg E.V.

No hubo diferencias en edad entre los grupos, sin embargo, el IMC fue ligeramente mayor en los sujetos control (24.7 ± 1.2) comparados con los diabéticos controlados (22.7 ± 1.5) y descontrolados (22.2 ± 2.9). El IMC es un índice indirecto de adiposidad, lo que concuerda con la deficiencia de insulina que presentan estos pacientes. La diferencia entre A1C es debida a que fue el principal criterio para dividir a los grupos de DM-1 en investigación. Los sujetos con DM-1 descontrolada mostraron 12.3 ± 1.6 % de A1C, lo que corrobora descontrol importante de estos pacientes.

La LH promedio basal fue más baja en el grupo con DM-1 descontrolada (11 ± 1.6 UI/L⁻¹) comparados con los DM-1 controlados (19.1 ± 1.8 UI·L⁻¹) y los controles (18.5 ± 1.5 UI·L⁻¹). El mismo fenómeno se observó para el estímulo máximo de LH durante el primer estímulo, el área bajo la curva y el cambio que ocurrió entre el promedio basal y el pico máximo del primer estímulo. Sin embargo, no se obtuvo significancia estadística. Las figuras 2 y 3 muestran los perfiles ilustrativos de los cambios en seis sujetos de los diferentes grupos estudiados.

La tasa de secreción basal de LH se encontró disminuida en los sujetos con DM-1 descontrolada, sin embargo la frecuencia de los pulsos estuvo conservada. (Tabla 3, figura 4 y 5).

El segundo estímulo con GnRH mostró diferencias estadísticamente significativas, los sujetos con DM-1 descontrolada mostraron casi el 50% de la respuesta que los diabéticos bien controlados o los normales.

No hubo diferencias en las concentraciones en suero de la prolactina, FSH, cortisol ni estrógenos entre los grupos estudiados (ver tabla 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Controles	DM-1 controlados	DM-1 descontrolados	ANOVA
N	9	8	11	---
Edad (años)	24.8±2.6	23.8±2.2	22.8±3.0	Ns
IMC	24.7±1.2♦	22.7±1.5	22.2±2.9	0.038
Años de evolución de diabetes (rango)	---	5.0 (2-6.5)	3.7 (2-6.7)	Ns
Dosis de insulina (U·kg ⁻¹)	---	0.63±0.15	0.56±0.14	Ns
A1C (%)	5.6z±0.6	6.9±0.9	12.3±1.6♣	<0.001
Prolactina (mIU/L)	76±28	82±13	91±22	Ns
Cortisol (nmol·L ⁻¹)	260±20	246±25	298±17	Ns
Estrógenos (pmol·L ⁻¹)	125±20	110±10	80±10	Ns
FSH (UI·L ⁻¹) basal	9.4±1.6	9.4±2.0	11.6±0.4	Ns
LH (UI·L ⁻¹) basal	18.5±1.5	19.1±1.8	11.0±1.6♣	0.003
Máximo de LH (UI·L ⁻¹) Primer estímulo	97.8±43.4	106.1±48.9	67.3±32.2	0.108
ABC Primer estímulo* (UI·L ⁻¹ ·min ⁻¹)	6995.4±2845	7704.2±3485	4894.0±2477	0.105
Δ LH (UI·L ⁻¹) Primer estímulo (Max-Basal)	79.3±40.6	87.0±45.2	55.3±29.4	0.178
Máximo de LH (UI·L ⁻¹) Segundo estímulo	111.4±59.5	111.0±41.3	59.6±26.5♣	0.019
ABC Segundo estímulo* (UI·L ⁻¹ ·min ⁻¹)	7671±3824	8342±2709	4776±2308♣	0.031
Δ LH (UI·L ⁻¹) Segundo estímulo (Max-Basal)	92.9±56	91.8±38.1	47.6±23.8♣	0.029

Tabla 2. Comparación de características generales, análisis de pulsos de LH y estímulo con GnRH, de acuerdo a los grupos estudiados. Los datos se expresan como promedio ± error estándar.

*ABC: ÁREA BAJO LA CURVA DE ESTÍMULOS DE LH (UI·L⁻¹·min⁻¹) MEDIDA POR ÁREAS TRAPEZOIDES. LOS ESTÍMULOS SE REALIZARON CON GnRH 10 µg EV EN BOLOS. EL PRIMER ESTÍMULO SE REALIZÓ LUEGO DE 6 HORAS DE MUESTRA BASAL Y DOS HORAS DESPUÉS EL SEGUNDO ESTÍMULO.

POST HOC: SE EMPLEÓ EL MÉTODO DE NEWMAN-KEULS Y LOS RANGOS CRÍTICOS. LA SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA SE CONSIDERÓ CON P<0.05. ♣DM TIPO 1 DESCONTROLADO DIFERENTE DE LOS DM TIPO 1 CONTROLADOS Y LOS NORMALES. ♦ LOS NORMALES SON DIFERENTES DE LOS DIABÉTICOS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	Controles N=9	DM-1 controlados N=8	DM-1 descontrolados N=10	ANOVA
Area integrada (IU·L ⁻¹ /6 h)	6660±560 ^c	6920±640 ^c	3960±570 ^{a,b}	0.001
Vida media plasmática (t ½) (min)	61.5±5.3	58±2.6	54±3.2	Ns
Frecuencia de pulsos (pulsos/6h)	6.8±0.64	7.3±0.59	6.6±0.6	Ns
Intervalo entre impulsos (min)	54±4.1	48±3.5	56±5.7	Ns
Masa secretada por pulso (IU·L ⁻¹)	12.9±1.5 ^c	11.7±2.1 ^c	7.5±1.1 ^{a,b}	0.024
Sumatoria de la masa (IU·L ⁻¹)	45±8.8	69±18	31±3.9	Ns
Concentración promedio de LH (IU·L ⁻¹)	18.6±1.5 ^c	19.2±1.8 ^c	11±1.6 ^{a,b}	0.001
Duración media del pulso secretor (min)	13±2.9	12±2.9	7.8±1.5	Ns
Tasa de secreción pulsátil (UI·L ⁻¹ /6h)	87±11 ^c	78±10 ^c	47±6.3 ^{a,b}	0.015
Ap En (1, 35%)	0.881±0.022	0.854±0.024	0.875±0.020	Ns

Tabla 3. Comparación de las características de la pulsatilidad de LH hipofisaria de acuerdo a los grupos estudiados. El contraste *post hoc* se realizó con prueba de Newman-Keuls. Ap En: Entropía aproximada (parámetros m, r). Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se representan con los superíndices a, b o c, que corresponden a las columnas de controles, DM-1 controlados o DM-1 descontrolados, respectivamente. Los datos se expresan como promedio ± error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

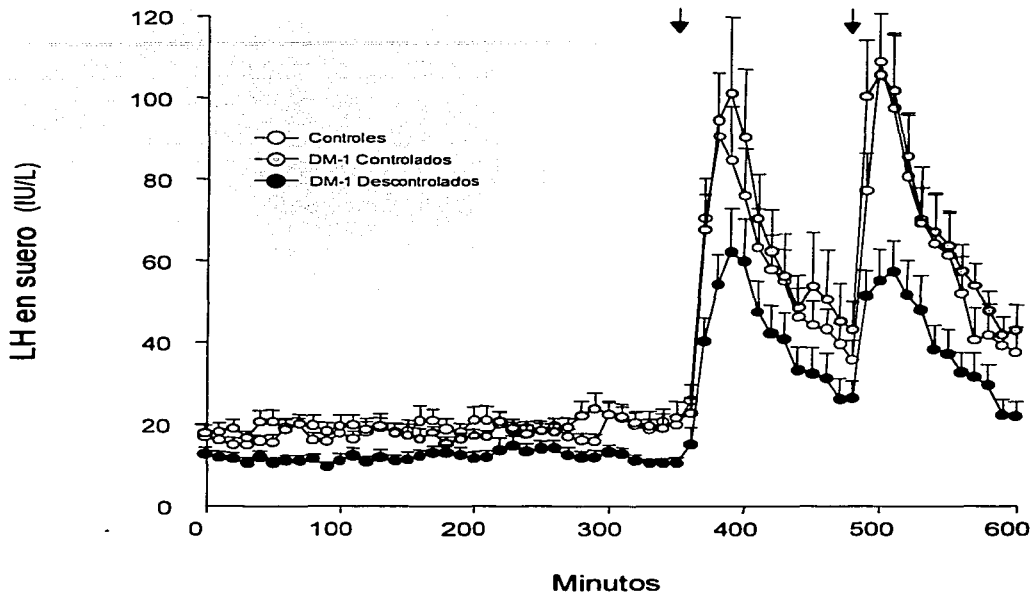


Figura 1. LH en suero en función del tiempo. Comparación entre controles normales, DM-1 controlados y DM-1 descontrolados. Las muestras se tomaron cada 10 minutos durante 6 horas, luego se administró 10 μ g de GnRH (flecha) y a las dos horas se repitió el mismo estímulo (flecha). Los datos se expresan como promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

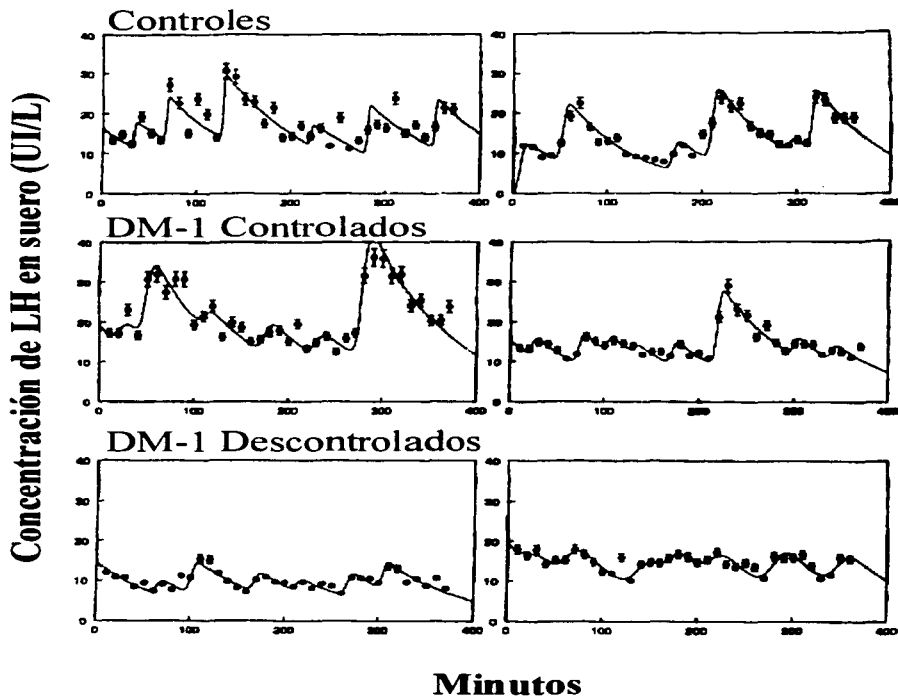


Figura 2. Concentración de LH en suero en función de las 6 primeras horas (tiempo basal). Se ejemplifican 2 pacientes de cada uno de los grupos estudiados. Los sujetos con DM-1 descontrolados muestran menor concentración de LH en suero. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

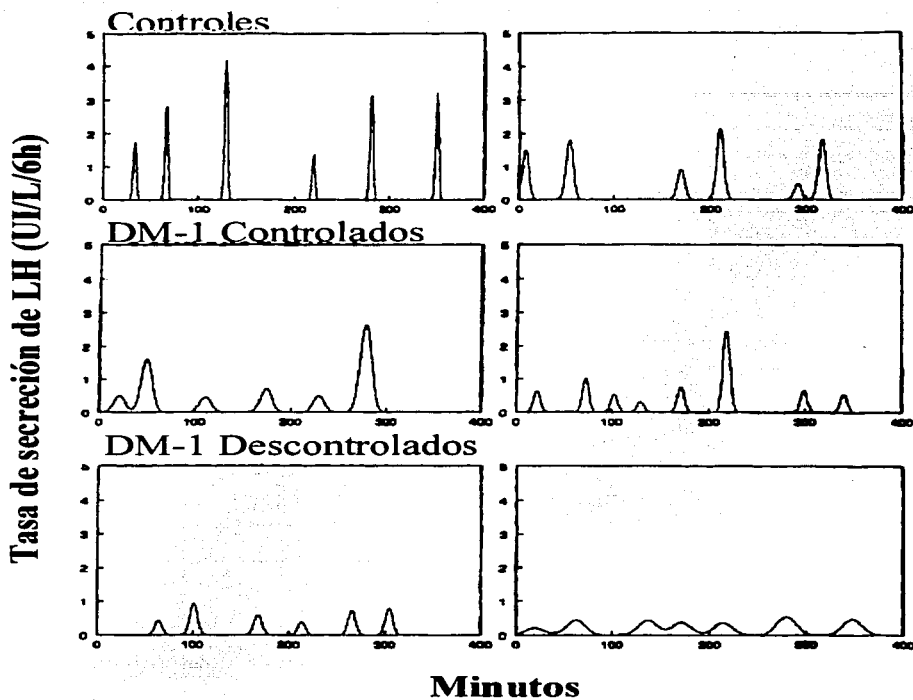


Figura 3. Tasa de secreción de LH en función del tiempo, calculada por deconvolución. Se ejemplifican 2 pacientes para cada uno de los grupos estudiados. Los pulsos de los pacientes con DM-1 descontrolada son significativamente menores que los otros grupos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

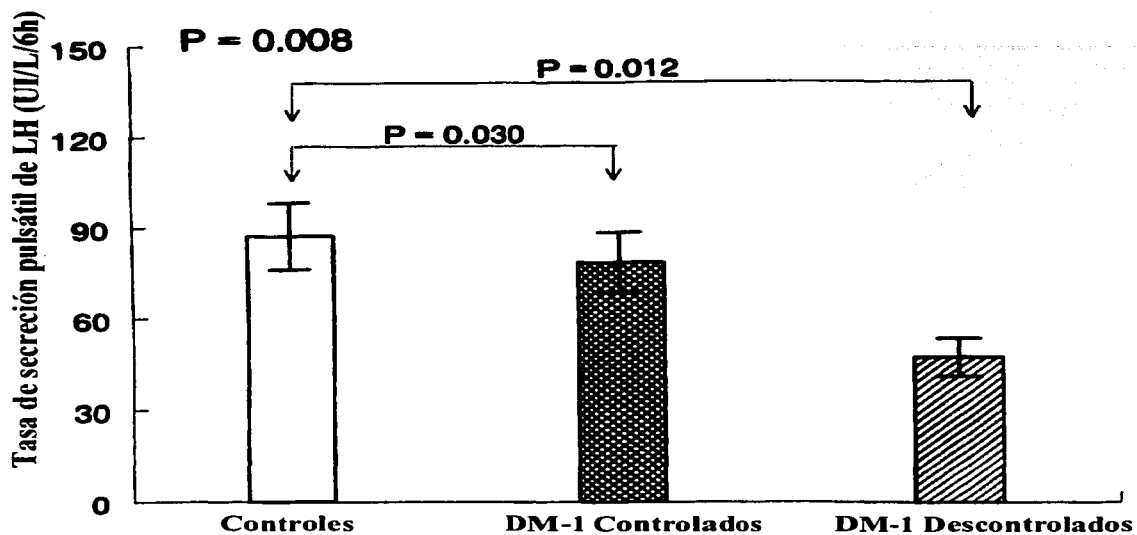


Figura 4. Comparación de la tasa de secreción de LH entre los grupos estudiados. Los tres grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

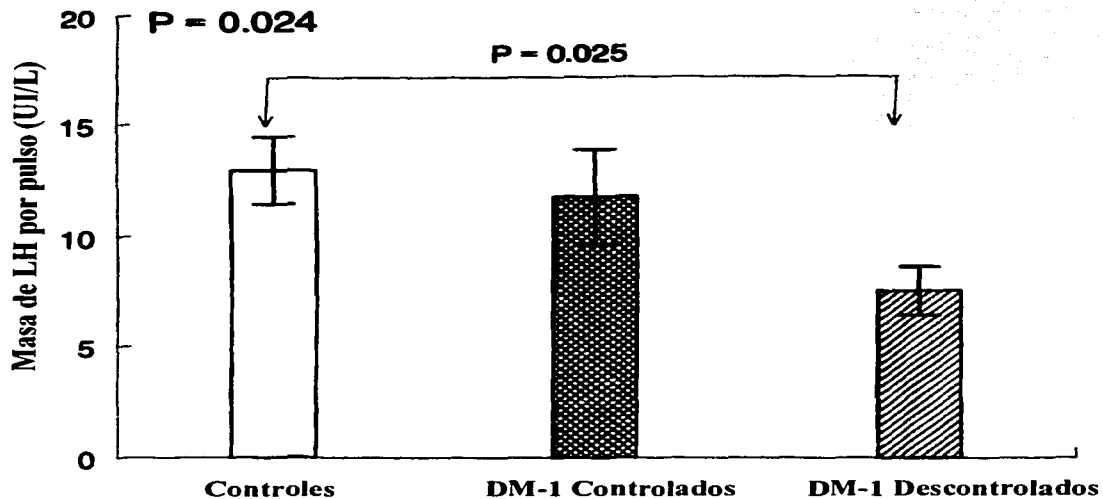


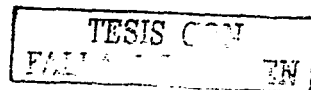
Figura 5. Comparación de la masa de LH secretada por los pulsos de los tres grupos estudiados. Se observa diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de controles y los DM-1 descontrolados. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C. Estimulo de testosterona con hCG

La T basal no mostró diferencias entre los grupos, aunque se observa que los DM-1 descontrolados tienden a menor T basal ($21.2 \pm 8.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) comparados con los otros dos grupos (normales $25.7 \pm 7.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ y DM-1 controlados $28.7 \pm 6.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Luego del estímulo con hCG tampoco hubo diferencias entre los tres grupos pero los DM-1 descontrolada mostraron un incremento de casi el doble de T con respecto al basal, para alcanzar los valores máximos de los otros grupos (Figura 6).

La albúmina fue normal en los tres grupos, así como la concentración de SHBG. Sin embargo, al obtener el índice de T libre (ITL= T/SHBG), que es la relación entre T y la SHBG, los sujetos con menor ITL fueron los DM-1 descontrolados (0.59 ± 0.28) comparados con los normales (0.64 ± 0.70) y los DM-1 controlados (0.69 ± 0.24), sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.388$).



	Controles	DM-1 controlados	DM-1 descontrolados	ANOVA
N	9	9	9	---
Edad (años)	24.78±0.88	23.78±0.68	21.67±0.58	0.017
IMC	24.7±0.39	22.72±0.48	23.19±0.87	0.078
A1C (%)	5.58±0.20♦	6.91±0.27	12.24±0.47▲	<0.001
T basal (nmol·L ⁻¹)	25.7±2.37	28.68±2.17	21.2±2.73	0.11
Máxima T temprana (nmol·L ⁻¹)	29.9±2.9	31.4±4.1	26.3±2.7	0.53
Δ T (nmol·L ⁻¹) temprana (Max-Basal)	4.2±1.7	2.8±2.4	5.1±1.3	0.68
Máxima T en 3 días	39.27±3.7	42.20±3.7	38.0±3.7	0.86
Δ T (nmol·L ⁻¹) 3 días (Max-Basal)	13.6±2.3	13.5±3.3	18.5±3.2	0.42
T 3ª día/T basal	1.53±0.07	1.51±0.14	1.97±0.18▲	0.04

Tabla 4. Comparación de testosterona (T) basal y luego de estímulo con hCG. *Post hoc*: se empleó el método de Newman-Keuls y los rangos críticos: ▲Diferencia de DM-1 descontrolados con controles y con DM-1 controlados. ♦ Los normales son diferentes de los DM-1. Los datos se expresan como promedio ± error estándar.

	Normales	DM-1 controlado	DM-1 descontrolado	P
Albúmina g·dL ⁻¹	4.7±0.08	4.9±0.23	4.5±0.20	0.322
SHBG nmol·L ⁻¹	39.9±6.4	44.5±5.8	39.6±4.5	0.807
Cociente T/SHBG	0.64±0.10	0.69±0.06	0.59±0.10	0.388

Tabla 5. Comparación de la albúmina, SHBG y testosterona en suero. Los datos se expresan como promedio ± error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Testosterona en suero: respuesta al estímulo con hCG (40 U/kg)

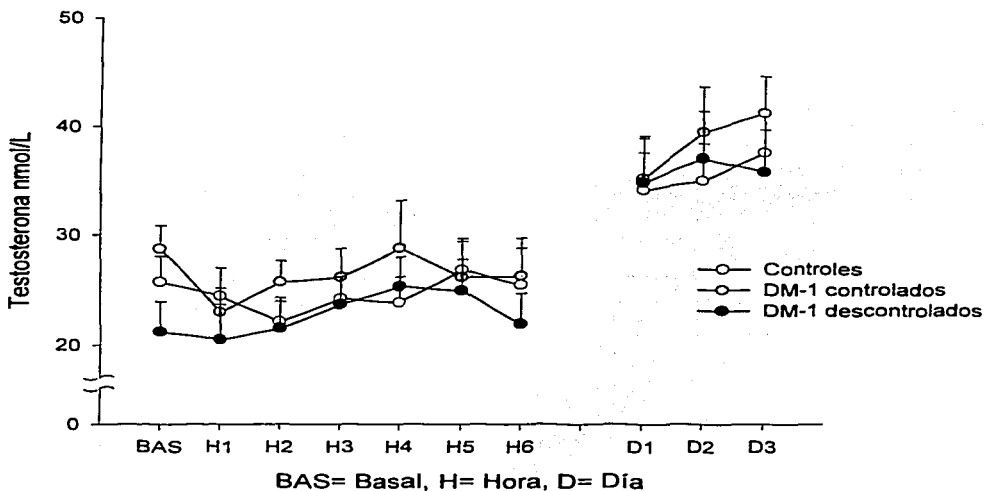


Figura 6. Comparación de testosterona en suero luego del estímulo con hCG entre los tres grupos estudiados. BAS: Testosterona basal, H1-H6: Muestra horaria luego de la inyección de hCG, D1-D3: Muestras de testosterona tomadas a las 24, 48 y 72 horas postestímulo con hCG. Los datos promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E. Bioanálisis in vitro de LH y el cociente B/I.

El suero colectado se analizó en tres pozas para cada sujeto: 1) Basal, considerada como las muestras tomadas en las primeras seis horas; 2) La del primer estímulo con GnRH, que duró 2 horas; 3) y la del segundo estímulo con GnRH, que duró las 2 horas finales (Figura 1).

El suero de estas pozas se utilizó para estimular las células HEK-293 e indujo un aumento de la concentración de AMPc en el medio de cultivo. Las mismas pozas de suero se utilizaron para estimar la inmunreactividad de la LH, con lo que se obtuvo el cociente de actividad B/I. En la figura 7 se observa la respuesta de AMPc de las HEK-293 estimuladas con el suero de tres sujetos pertenecientes a cada uno de los grupos.

En la tabla 6 se observa que el cociente de actividad B/I para LH está aumentado en los diabéticos mal controlados en condiciones basales. En el resto de las mediciones no hubo diferencias estadísticamente significativas.

	Basal (6h)	Primer estímulo con GnRH	Segundo estímulo con GnRH
Controles (n=8)	0.48±0.057	0.73±0.168	0.57±0.164
DM-1 controlados (n=7)	0.37±0.080	0.60±0.147	0.51±0.071
DM-1 descontrolados (n=10)	0.81±0.106*	0.67±0.105	0.92±0.228*

Tabla 6. Cociente de actividad biológica / inmunológica (B/I) de LH. Hubo diferencia estadísticamente significativa en el índice basal entre los grupos. *Post hoc*: se empleó el método de Newman-Keuls y los rangos críticos: *Los DM-1 descontrolados son diferentes de los otros dos grupos (vs controles $p=0.019$, vs DM-1 controlados $p=0.007$): No hubo diferencias significativas dentro de cada uno de los grupos. Los datos se expresan como promedio \pm error estándar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

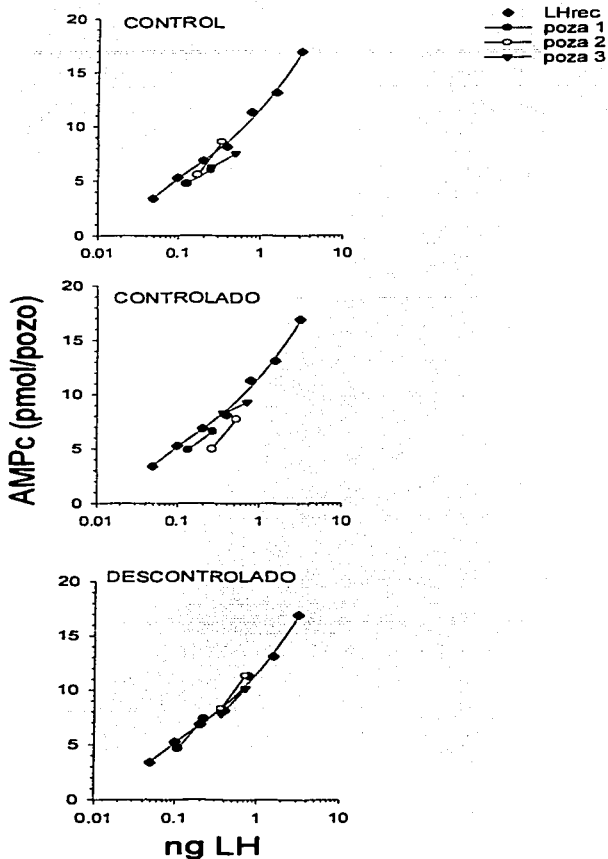


Figura 7. Muestra el impacto de la concentración de LH sobre la producción de AMPc por las células HEK-293 transfectadas con el receptor de LH recombinante humano. Las pozas de suero del paciente son: basal (poza 1), primer (poza 2) y segundo (poza 3) estímulos con GnRH. Los páneles ejemplifican un sujeto control normal, un DM-1 controlado y un DM-1 descontrolado. Las líneas muestran dos puntos para cada paciente, la más baja corresponde a 25 μ L del suero y la segunda a 50 μ L. La dosis es expresada en términos de LH recombinante estándar como medición por radioinmunoensayo de cada poza de suero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. Discusión

Este estudio demuestra que los DM-1 descontrolados y sin complicaciones crónicas presentan disminución de la amplitud de LH durante la secreción espontánea, y después de ser estimulados con GnRH exógena. Estudios previos han indicado que tanto en animales de experimentación como en humanos la hipoinsulinemia e hiperglucemia pueden conducir a alteraciones en la función del eje reproductor.^{63,64,70,71,99}

Sin embargo, no existen a la fecha estudios detallados que precisen la naturaleza de las alteraciones en la dinámica de secreción de LH y de T en hombres con DM-1. En el presente estudio, empleamos un muestreo frecuente de sangre, de cada 10 minutos, para explorar las alteraciones en la función del eje reproductor en hombres jóvenes con DM-1, con menos de 7 años de evolución, peso normal, sin cetosis y libres de complicaciones crónicas de la enfermedad. Consideramos que este modelo nos permite analizar de una forma más refinada los efectos del hipoinsulinismo *per se* en la función de la unidad hipotálamo-gonadotropo-célula de Leydig. El presente estudio reveló la preservación de un patrón pulsátil de LH, con frecuencia de pulsos secretores normales, en DM-1 controlados y descontrolados. La frecuencia de los pulsos presentados por los DM-1 y los controles es similar a lo informado previamente en hombres normales estudiados bajo condiciones parecidas de muestreo prolongado.^{37,62}

Sin embargo, la masa y amplitud secretora de la gonadotropina en los pacientes con DM-1 descontrolada se encuentra significativamente disminuida comparada con los DM-1 controlados y los controles. La secreción de testosterona luego del estímulo con hCG no mostró diferencias entre los grupos. Finalmente, el cociente B/I sugiere una mayor actividad biológica de la LH en el grupo de DM-1 descontrolado.

A. Método empleado

En este estudio se empleó una muestra secuencial de personas con DM-1 y controles normales. Debido a que se trata de una enfermedad con prevalencia muy baja en México y que quienes la padecen, necesariamente deben estar en tratamiento médico, la posibilidad de sesgo de selección y de Bergson es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

poca. La validez interna está cimentada en los criterios de restricción estrictos para el ingreso al estudio. Entre estos criterios restrictivos se encuentran: edad entre 20 y 29 años, IMC entre 18.5 y 27, además de potencia sexual por historia clínica. La ausencia de cetosis, fue un criterio de exclusión en la muestra, ya que puede inducir supresión de T.

La muestra mostró poca pérdida de pacientes (*attrition*), a pesar de que se requirió que los sujetos estuvieran 10 horas el primer día de muestras, al día siguiente 6 horas de muestras y que regresaran al hospital en los siguientes 3 días para las tomas de T. El tamaño de muestra final es parecido entre los grupos y se encuentran bien caracterizados.

Tomar muestras cada 10 minutos de LH permite alcanzar potencia estadística para el análisis de muestras repetidas en conglomerados. Recientemente se ha aplicado una prueba de t de Student utilizando desviaciones estándares ajustadas a los valores en suero de LH. El poder estará determinado por el tamaño de los conglomerados, lo que tendrá una relación inversa con el porcentaje de picos falsos positivos: El método con máxima eficiencia asume que los retardos en el tiempo serán de 10 minutos. Cuando se ha medido el error con los retardos considerando diferencias temporales de 12 minutos ó menos, se ha observado que no hay mejoría significativa en la eficiencia debido a que la vida media de la LH es considerablemente más larga. En el caso de muestras de más tiempo de retardos, el número de falsos positivos es mayor.

El método de deconvolución permite computar la función de aclaramiento de LH considerando las 37 muestras basales. Se calculó una línea suavizada de la concentración de la hormona en el plasma y se observó que los picos de los pulsos tienen una duración de aproximadamente 120 minutos y se colapsan a pulsos discretos hipofisarios con duración media aproximada de 10 minutos.

El estímulo con hCG se caracteriza por una respuesta bifásica. La primera elevación ocurre en las primeras horas y luego a los tres días del estímulo,⁶⁴ esto se debe a desensibilización de la célula de Leydig que, subsecuentemente, reestablece el proceso de esteroidogénesis.

Finalmente, el cociente de actividad B/I analiza la potencia de la hormona *in vitro*. El radioinmunoanálisis clásico no proporciona información sobre las isoformas LH que pueden ser secretadas. El cociente B/I es un resumen de la potencia de la gonadotropina y los cambios en esta relación deben ser considerados

como cambios en la actividad biológica por unidad de actividad inmunológica.⁷² El índice es sensible y permite obtener mayor información sobre la calidad en la secreción de gonadotropinas.

B. Pulsos de LH, estímulos con GnRH y el papel de la insulina

En la era preinsulínica, alteraciones endocrinas como la amenorrea, era común en mujeres diabéticas tipo 1. En la era postinsulínica se ha observado que la menarca ocurre hasta un año más tarde que las jóvenes no diabéticas. Se ha sugerido que la hiperglucemia, insuficiente peso corporal, deficiencia de insulina, deficiencia de IGF-1 o alguna combinación de éstos factores puede producir falla ovárica. En el ovario humano se encuentran receptores para insulina e IGF-1, son pocos los estudios que han investigado el mecanismo de esteroidogénesis en células de la teca o de la granulosa.⁷³ La GH también estimula la secreción de estradiol en forma dosis dependiente, y el efecto lo hace a través del aumento de proteína fijadora de IGF, así como producción directa de IGF-1 e IGF-2 en las células de la granulosa.⁷⁴

La observación de que la DM-1 descontrolada se acompaña de una reducción en la cantidad de LH secretada por la glándula hipofisaria, concuerda con hallazgos en ratas machos tratadas con estreptozotocina.⁷⁰ Sin embargo, en estos animales la diabetes inducida experimentalmente se acompañó también de disminución en la frecuencia de los pulsos de LH, anomalía que fue identificada subsecuentemente en ovejas macho diabéticas.⁶³ Varios factores pueden explicar las discrepancias encontradas en actividad secretora de LH entre la diabetes inducida experimentalmente y la espontánea, incluyendo las diferencias entre especies en los mecanismos que gobiernan la síntesis y secreción de las gonadotropinas, la severidad y duración del hipoinsulinismo o hiperglucemia y la presencia de alteraciones metabólicas secundarias (como la generación de cetonas). Los cuerpos cetónicos que acompañan a la privación de insulina disminuyen el efecto de la insulina sobre la actividad hipotalámica o hipofisaria de gonadotropinas. En el contexto de la historia natural de la falla reproductiva en hombres diabéticos, las alteraciones en la amplitud de los eventos secretores de LH podrían, por lo tanto, representar la primera anomalía detectable en la dinámica secretora de esta gonadotropina. Las alteraciones en la frecuencia de los pulsos de LH (con o sin anomalías concomitantes en la amplitud del pulso), podrían ser el resultado del descontrol metabólico crónico de la enfermedad, como lo sugerirían los estudios que han

documentado alteraciones morfológicas, dependientes del tiempo, en el hipotálamo y los gonadotropos de ratas macho tratadas con estreptozotocina.⁷⁵

Para estudiar con mayor detalle las alteraciones funcionales del eje hipotálamo-gonadotropo que podrían resultar de la presencia de un ambiente deficiente en insulina o enriquecido de glucosa, analizamos adicionalmente los cambios en las concentraciones de LH en respuesta a 2 dosis submáximas y consecutivas de GnRH, lo que permite identificar alteraciones en la capacidad funcional del gonadotropo en términos de sensibilidad a la GnRH y de reserva secretora hipofisarias.^{62,76} Los datos obtenidos demostraron la presencia de una capacidad de respuesta disminuida de LH a ambas dosis de GnRH exógeno en la DM-1 descontrolada, hallazgo que es consistente con algunos estudios,^{77,43,78,79} pero en otros se detectaron respuestas hipofisarias normales^{55,80,81,95,96} a dosis farmacológicas únicas de GnRH exógena. Es importante enfatizar que en nuestro estudio, la falla de la GnRH exógena para provocar un respuesta normal del gonadotropo en la DM-1 descontrolada, no fue claramente evidente sino hasta después de administrada la segunda dosis del péptido liberador, sugiriendo que el estado hipoinsulinémico prevalente en el grupo de diabéticos descontrolados afectó predominantemente la reserva hipofisaria de LH, o sea, la capacidad del gonadotropo para secretar moléculas de gonadotropinas almacenadas en la poza intracelular de nueva síntesis. Nuestras observaciones también contrastan con aquella informada en mujeres jóvenes con DM-1 descontrolados, en quienes se detectaron tanto una frecuencia reducida de los pulsos de LH como una respuesta aumentada del gonadotropo a una dosis única de 10 µg de GnRH exógeno.⁸² Diferencias en género, ambiente hormonal en esteroides sexuales, duración de la enfermedad o presencia de alteraciones en la función gonadal, podrían eventualmente explicar tales discrepancias. Los resultados del presente estudio no permiten postular un mecanismo definitivo y único al través del cual el descontrol diabético altere la secreción de LH en el varón. La respuesta disminuida a los impulsos endógeno y exógeno de GnRH, aunado al hallazgo de un frecuencia normal de los eventos secretores de LH, sugiere la existencia de anomalías en la función hipofisaria en la DM-1 descontrolada. En este sentido, la presencia de un ambiente privado de insulina podría jugar un papel esencial ya que se ha demostrado que la insulina aumenta directamente la sensibilidad del gonadotropo a la GnRH de manera dosis-dependiente, independientemente de las concentraciones de glucosa.⁴⁴ Más aún, estudios en ratas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

macho tratadas con estreptozotocina y en ratones homocigotos a la mutación db (con diabetes tipo 2), han documentado la reducción en el contenido hipofisario de LH y la presencia de lesiones morfológicas en el gonadotropo en ambos modelos de diabetes experimental,^{79,80,83} dando un apoyo adicional a la posibilidad de que el hipoinsulinismo pueda llevar a cambios en la función hipofisaria en individuos diabéticos. Estas evidencias, sin embargo, no permiten descartar completamente la posibilidad de que la reducción en la masa de LH secretada en hombres diabéticos descontrolados, pueda ser secundaria a alteraciones cuantitativas en la magnitud del impulso hipotálamico de GnRH. Varias anomalías que podrían encontrarse presentes en la DM-1 descontrolada podrían afectar la síntesis o secreción hipotalámica de GnRH.^{64,84,85} Por ejemplo, estudios en la oveja macho diabética han documentado que la hipoinsulinemia central altera la secreción del GnRH.⁶⁴ De hecho, se han identificado sitios de unión específicos para la insulina en el endotelio de la microvasculatura del sistema nervioso central, incluyendo al núcleo arcuato y a la eminencia media en el hipotálamo basomedial (en donde se localizan la mayoría de las neuronas secretoras de GnRH)⁸⁶; más aún, se ha documentado que neuronas secretoras de GnRH inmortalizadas (células GT-1) expresan receptores de insulina, al través de los cuales el péptido podría modular directamente la secreción de GnRH por mecanismos que incluirían la regulación del metabolismo energético y el crecimiento y diferenciación celulares.⁸⁷ Los efectos de la hipoinsulinemia en la secreción de GnRH podrían, por otro lado, potenciarse o agravarse por la presencia de un tono dopaminérgico hipotalámico incrementado.^{83,84,88} En relación a esto, la virtual ausencia de alteraciones en las concentraciones basales de cortisol y de prolactina (esta última un indicador indirecto del tono dopaminérgico central prevalente en un momento fisiológico determinado), podrían explicar la normalidad en la frecuencia de los pulsos de LH en el grupo de diabéticos descontrolados. En este estudio utilizamos un bioanálisis homólogo *in vitro* para analizar los posibles efectos del estado diabético en la potencia biológica de la LH secretada por la hipófisis anterior. Después de la administración de la primera dosis de GnRH exógeno, los 2 grupos de diabéticos presentaron una tendencia hacia la secreción incrementada de moléculas de LH enriquecidas con actividad biológica (reflejado por cociente B/I mayor al basal); esta observación es consistente con estudios previos en hombres normales que demostraron la secreción preferencial de LH bioactiva (a juzgar por un bioanálisis *in vitro* heterólogo en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

células de Leydig de rata), con el incremento consecuente en el cociente B/I, en respuesta a los pulsos endógenos y exógenos de GnRH.⁸⁹ En nuestro estudio fue interesante detectar que el cociente B/I in vitro de la LH secretada en condiciones basales se encontró significativamente elevado en el grupo de diabéticos descontrolados. El hallazgo fue inesperado considerando que la $t_{1/2}$ de la LH secretada en condiciones de descontrol diabético fue prácticamente normal y que la vida media circulatoria plasmática y cociente B/I de LH son parámetros que están muy relacionados, ya que ambos dependen del tipo de variantes de glicosilación que conforman la mezcla de isoformas de LH secretadas por la hipófisis en respuesta a GnRH endógeno (estado basal) y exógeno.^{90,91,92} Aunque la razón para este incremento paradójico en la potencia biológica in vitro de la LH circulante en la DM-1 descontrolada es incierta, es tentador especular que la presencia de altas concentraciones de glucosa podrían generar glicosilación no enzimática de LH, dando como resultado moléculas con propiedades funcionales alteradas, situación que podría ser parcialmente contrarrestada por dosis submáximas de GnRH exógeno. Alternativamente, se podría también postular que la captación hepática y la depuración de las formas menos sializadas de LH, de vida media plasmática corta, pero de alta potencia biológica, pudiera estar alterada en la DM-1 descontrolada por efectos directos del aumento en glicosilación no enzimática sobre el sistema de reconocimiento de las células endoteliales.⁹³ En ambas circunstancias, el suero podría contener moléculas de LH con potencia biológica in vitro aumentada y vida media circulatoria normal, tal y como se observó en el presente estudio.

C. Estimulo de testosterona con hCG.

Se ha demostrado previamente que la administración de una dosis única de hCG exógena a varones adultos normales, provoca una respuesta bifásica de T caracterizada por la aparición de un pico temprano entre las 2 y las 4 horas y uno tardío entre las 48 y 120 h que siguen a la inyección de la gonadotropina.^{69,94,95} Varios investigadores han asimismo demostrado que los niños prepúberes y los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico presentan ausencia de esta respuesta bifásica,^{69,96,97} lo que ha sido atribuido a la falta de inducción de enzimas esteroidogénicas testiculares por la privación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

o ausencia de exposición a LH biológicamente activa.⁹⁶ En el presente estudio, aplicamos un método experimental de muestreo frecuente para analizar la capacidad de la célula de Leydig de producir T en presencia de un ambiente metabólicamente alterado, como el que prevalece en la DM-1 descontrolada. En contraste con estudios previos en los que se ha detectado disminución de las concentraciones circulantes de T total en la DM-1 descontrolada,^{52,98,99} nosotros no encontramos anomalías en las concentraciones basales de esta hormona ni en su respuesta a la hCG exógena en los grupos de diabéticos estudiados. Más aún, el perfil de las respuestas temprana y tardía a la hCG exógena encontrada en los diabéticos descontrolados, fue muy similar a la mostrada por los pacientes bien controlados y por los voluntarios normales. El hallazgo de que la célula de Leydig del humano mantiene preservada su función en presencia de un ambiente empobrecido en insulina es indudablemente interesante, particularmente si se considera que la diabetes experimental en la rata macho es frecuentemente acompañada de una disminución en la esteroidogénesis testicular y en la unión de la hCG a su receptor, alteraciones que podrían ser la consecuencia directa de la deficiencia de insulina a nivel testicular.^{100,101,102,103,104,105} Nuestro hallazgo, sin embargo, es consistente con estudios previos en varones cuya hiperglucemia secundaria a diabetes no suprimió las concentraciones en suero de T, a menos que el descontrol estuviera agravado por cetosis o complicaciones tardías.^{52,99,106} De cualquier forma, existen otras alternativas que pudieran explicar la normalidad en las concentraciones basales de T y en las respuestas provocadas por la hCG exógena en la DM-1 descontrolada, incluyendo la presencia de moléculas de LH enriquecidas biológicamente o la producción aumentada de factores paracrinos, como la IGF-1, lo que podría eventualmente contrarrestar los efectos nocivos de la hipoinsulinemia en la función testicular.¹⁰⁷ El hecho que los DM-1 descontrolados presenten menor concentración sérica de LH, menor masa de secreción, pero respuesta normal de T, podría ser explicado con base al mayor cociente de actividad B/I de la gonadotropina. Esto sugiere mayor actividad biológica de la molécula de LH, como resultado de alguna alteración estructural de origen por determinar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D. Conclusión

En este estudio demostramos que la función del eje hipotálamo-hipófisis-testículo está alterado en estados de hipoinsulinemia relativa como en hombres jóvenes DM-1 descontrolados, sin complicaciones agudas (cetosis) o crónicas, cuya hipófisis secreta una cantidad reducida de LH inmunoreactiva, en condiciones de estimulación endógena y exógena de GnRH. Este estado hiposecretor de LH se asocia paradójicamente con la presencia de moléculas circulantes de la gonadotropina enriquecidas en potencia biológica, lo cual explicaría la normalidad temporal de las concentraciones basales de testosterona en suero. La alteración en la secreción de LH en estos pacientes con pobre control de la glucemia, se debe posiblemente a un mecanismo dual, que involucra tanto a la reserva hipofisaria como al sistema hipotalámico que controla la síntesis de GnRH o la intensidad de su impulso. Sugerimos que estas alteraciones podrían originarse por la deficiencia relativa de insulina y que la presencia de otras anomalías metabólicas o complicaciones tardías de la enfermedad pueden potencialmente agravar la disfunción del eje reproductor que tarde o temprano es posible detectar en la mayoría de los varones con DM-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. Referencias

- ¹ Veldhuis JD. The hypothalamic-pituitary-testicular system. En: Reproductive Endocrinology, SSC Yen y RB Jaffe, (eds.), 3a. Edición 1991, WP Saunders Co., Filadelfia EUA, p. 409.
- ² Leung PCK, Steele GL. Intracellular Signaling in the Gonads. *Endocrine Reviews* 1992; 13:476.
- ³ Bergland R, Page R. Can the pituitary secrete to the brain? (affirmative anatomical evidence in 9 especies). *Endocrinology* 1978; 102:1325-1338.
- ⁴ Meites J, Sonntag WE. Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation: Current views. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981; 21:295-322.
- ⁵ Waxman SG, deGroot J. Neuroanatomía correlativa. 10ma edición México, Editorial Manual Moderno. 1997: 147-158.
- ⁶ Patel YC. Neurotransmitters and hypothalamic control of anterior pituitary function. En: DeGroot L, Jameson JL, ed. *Endocrinology* 4ta edición Philadelphia: WB Saunders Company, 2001: vol 1: 183-200.
- ⁷ Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology*. 4ta edición Nueva York, W.H. Freeman & Co. 1999: 848-909.
- ⁸ Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Hipotálamo e hipófisis. En: Greenspan F, Strewler GJ. *Endocrinología básica y clínica*. 5ta edición. México. Editorial el Manual Moderno. 1998; 107-179.
- ⁹ Silverman AJ, Krey LC, Zimmerman EA. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biol Reprod* 1979; 20:98-110.
- ¹⁰ Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 1989; 338:161-164.
- ¹¹ Levine JE, Ramírez VD. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 1982; 111:1439-148.
- ¹² Clarke IJ, Cummins JT, The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111:1737-1739.
- ¹³ Clarke IJ, Thomas SB, Yao B, Cummins JI. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology* 1987; 46:8-88.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ¹⁴ Urban RJ, Evans WS, Rogol AD, Kaiser DL, Johnson ML, Veldhuis JD. Contemporary aspects of discrete peak detection algorithms: 1. The paradigm of the LH pulse signal in men. *Endocr Rev* 1988; 9:3-37.
- ¹⁵ Delitala G, Devilla L, Arata L. Opiate receptors and anterior pituitary hormone secretion in man. Effect of naloxone infusion. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981; 97:150-156.
- ¹⁶ Ellinghoe J, Veldhuis JD, Mendelson JH, Kuehnie JC, Mello NK. Effects of endogenous opioid blockade on the amplitude and frequency of pulsatile LH secretion in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54:854-857.
- ¹⁷ Cicero TJ, Wilcox CE, Bell RD, Meyer ER. Naloxone-induced increases in serum LH in the male: Mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212:573-578.
- ¹⁸ Veldhuis JD, Rogol AD, Samojlik E, Ertel N. Role of endogenous opiates in the expression of negative feedback actions of estrogen and androgen on pulsatile properties of LH secretion in man. *J Clin Invest* 1984; 74:47-55.
- ¹⁹ Veldhuis JD, Rogol AD, Perez-Palacios G, Stumpf P, Kitchin JD, Dufau ML. Endogenous opiates participate in the regulation of pulsatile LH release in an unopposed estrogen milieu: Studies in estrogen-replaced, gonadotropin-releasing hormone-treated patients with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:790-793.
- ²⁰ Pavlou SN, Wakefield GB, Island DP, Hoffman PG, Le Page ME, Chan RL, Nerenberg CA, Kovacs W. Suppression of pituitary gonadal function by a potent new LHRH antagonist in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:931-936.
- ²¹ Dahl KD, Pavlou SN, Kovacs WJ, Hsueh AJW. The changing ratio of serum bioactive to immunoreactive FSH with a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:792-794.
- ²² Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendley BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH, Vale W. Evidence of autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 1991; 128: 1682-1684.
- ²³ Matsumoto AM, Bremner WJ. Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:609-614.
- ²⁴ Davis MR, Veldhuis JD, Rogol AD, Dufau ML, Catt KS. Sustained inhibitory actions of a potent antagonist

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

of gonadotropin-releasing hormone in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:1268-1274.

²⁵ Morrel AG, Gregoriadis G, Scheiberg IH, et al. The role of sialic acid in determining the survival of glucoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem* 1971; 246: 1461.

²⁶ Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitinis IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16: 765-787.

²⁷ Winters SJ, Troen P. Evidence for a role of endogenous estrogen in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:842-845.

²⁸ Veldhuis JD, Carlson ML, Johnson ML. The pituitary gland secretes in bursts: Appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7686-7690.

²⁹ Veldhuis JD, O'Dea LStL, Johnson ML. The nature of the gonadotropin releasing hormone stimulus-luteinizing hormone secretory response of human gonadotropes in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:661-670.

³⁰ Santen RJ, Bardin CW. Episodic LH secretion in man: Pulse analysis, clinical interpretation, physiological mechanisms. *J Clin Invest* 1973; 52:2617-2628.

³¹ Veldhuis JD, Urban RJ, Beitins I. Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active LH in man. *J Steroid Biochem* 1989; 33:739-750.

³² Mukhopadhyay AK, Leidenberger FA, Lichtenberg V. A comparison of bioactivity and immunoreactivity of LH stored in and released in vitro from pituitary glands of rats under various gonadal states. *Endocrinology* 1979; 104:925-931.

³³ Urban RJ, Davis MR, Rogol AD, Johnson ML, Veldhuis JD. Acute androgen receptor blockade increases LH secretory activity in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:1149-1155.

³⁴ Mendis-Handagama SMLC, Zirkin BR, Scallen TJ, Ewing LL. Studies on peroxisomes of the adult rat Leydig cell. *J Androl* 1990; 11: 270-278.

³⁵ Dufau ML. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Ann Rev Physiol* 1988; 50: 483-508.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ³⁶ Cooke BA. Is cyclic AMP an obligatory second messenger for luteinizing hormone? *Mol Cell Endocrinol* 1990; 69: C11-C15.
- ³⁷ Veldhuis JK, Sowers JR, Rogol AD, Dufau ML. Pathophysiology of male hypogonadism associated with endogenous hyperestrogenism: Evidence for dual defects in the gonadal axis. *N Engl J Med* 1985; 312: 1371-1375.
- ³⁸ Veldhuis JD, Dufau ML. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 1987; 80:631-638.
- ³⁹ Foglia VG, Rosner JM, de Peralta Ramos MC, Lema BE. Sexual disturbances in the male diabetic rat. *Horm Metab Res* 1969; 1:72-77.
- ⁴⁰ Howland BE, Zebrowsky EJ. Hyposecretion of gonadotrophins in alloxan-treated male rats. *J Reprod Fertil* 1972; 31:115-118.
- ⁴¹ Calvo JC, de Souza Valle, Baranao JL, Tesone M, Charrau EH. NADPH generating enzymes in Leydig cells from diabetic rats. *Horm Metab Res* 1979; 11:161-164.
- ⁴² Paz G, Homonnai ZT, Drasnin N. Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. *Andrologia* 1978; 10:127-131.
- ⁴³ Cusan L, Belanger A, Seguin C, Labrie F. Impairment of pituitary and gonadal functions in alloxan-induced diabetic male rats. *Mol Cell. Endocrinol* 1980; 18:165-176.
- ⁴⁴ Adashi EY, Hsueh AJW, Yen SSC. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 1981; 108:1441-1449.
- ⁴⁵ Adashi EY, Fabcs H, Hsueh AJ.: Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 1983; 26:270-280.
- ⁴⁶ Paz G, Homonnai ZT.: Involvement of insuline and testosterone in the reproduction of streptozotocin diabetic rats. *Int J Androl* 1979; 2:353-357.
- ⁴⁷ Schöffling K, Federlin K, Schmitt, Pfeiffer EF. Histometric investigations on the testicular tissue of rats with alloxan diabetes and chinese hamsters with spontaneous diabetes. *Acta Endocrinol* 1967; 54:335-346.
- ⁴⁸ Bambino TH, Hsueh AJW.: Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1981; 108:2142-2148.

- ⁴⁹ Shipley LG, Danley KS. Pituitary and ovarian dysfunction in experimental diabetes. *Am J Physiol* 1947; 150:84.
- ⁵⁰ Kirchick HJ, Reyes PL, Frye BL. Biology of anovulation in the immature alloxan-diabetic rat treated with pregnant mare's serum gonadotropin; Absence of the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1978; 102:1867.
- ⁵¹ Kirchick HJ, Reyes PL, Frye BL. An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare's serum gonadotropin: Reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1979; 105:1343.
- ⁵² Murray FT, Wiss HU, Thomas RG, Spevack M, Glaros AG. Gonadal dysfunction in diabetic men with organic impotence. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:127-135.
- ⁵³ Mitchell R, Bauerfeld C, Schaefer F, Schärer, Robertson WR. Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on hameodialysis treatment. *Clin Endocrinol* 1994; 41:65-73.
- ⁵⁴ Ellenberg M. Impotence in diabetes: The neurologic factor. *Ann Intern Med* 1971; 75:213-219.
- ⁵⁵ Daubresser JC, Meuenier JC, Wilmotte J, Luychx AS. Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without impotence. *Diabetes Metab* 1978; 4:233.
- ⁵⁶ Shahwan NM, Spathis GS, Fry DE, Wood PJ, Marks V. Differences in pituitary and testicular function between diabetic patients on insulin and oral anti-diabetic agents. *Diabetologia* 1978; 15:13.
- ⁵⁷ Jensen SB, Hagen C, Froland H, Pederson PB. Sexual function and pituitary axis in insulin treated diabetic men. *Acta Med. Scan.* 1979; 624 (Supl): 65-68.
- ⁵⁸ Murray FT, Cameron DF, Vogel RB, Thomas RG, Wyss HU, Zauner CW. The pituitary-testicular axis at rest and during moderate exercise in males with diabetes mellitus and normal sexual function. *J Androl* 1988; 9:197-206.
- ⁵⁹ Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Gonzalez-Castillo A, Carranza-Lira S, Garza-Flores J, Perez-Palacios G. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion to infusion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 1988; 29:17-28.
- ⁶⁰ Sakakura M, Takebe K, Nakagawa S. Inhibition of luteinising hormone secretion induced by synthetic

- LRH by long-term treatment with glucocorticoids in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40:774-779.
- ⁶¹ Wheatley T, Clark P, Raggatt P, Evans D, Holder R. Pulsatility of luteinising hormone in men with chronic renal failure: abnormal rather than absent *Brit Med J*. 1987; 294:482.
- ⁶² Veldhuis JD, Urban RJ, Beitins IZ, Blizzard RM, Johnson ML, Dufau ML. Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Steroid Biochem* 1989; 33:739-749.
- ⁶³ Bucholtz DC, Chiesa A, Pappano WN, Nagatani S, Tsukamura H, Maeda K-I, Foster DL. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol Reprod* 2000; 62: 1248-1255.
- ⁶⁴ Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K-I, Foster D. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod* 2000; 62: 1256-1261.
- ⁶⁵ Feinstein A. *Clinical Epidemiology: The architecture of clinical research*. Philadelphia WB Saunders 1985.
- ⁶⁶ Daneman D.: Glycated hemoglobin in the assessment of diabetes control. *The Endocrinologist* 1994; 4:33-34.
- ⁶⁷ Lövgren T, Hemmilä I, Pettersson K, Eskola JU, Bertoft E.: Determination of hormone by time-resolved fluoroimmunoassay. *Talanta* 1984; 31:909.
- ⁶⁸ Zariñán T, Olivares A, Söderlund D, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Changes in the biological:immunological ratio of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2001; 16: 1644-1618.
- ⁶⁹ Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Diaz-Sánchez V, Altamirano A, Perez-Palacios G.: Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:926.
- ⁷⁰ Dong Q, Lazarus RM, Wong LS, Vellios M, Handelsman DJ. Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 1991; 131:49-55.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⁷¹ Sudah S, Valli G, Lulie PM, Arunakaran J, Govindarajulu P, Balasubramanian K. Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108:14-20.
- ⁷² Chappel S. Editorial: Biological to immunological ratios: Reevaluation of a concept. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 1494-95.
- ⁷³ Poretsky L, Kalin M. The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev* 1987; 8:132-141.
- ⁷⁴ Barreca A, Artini PG, Del Monte P, Ponzani P, Pasquini P, Cariola G, Volpe A, Genazzani AR, Giordano G, Minuto F. In vivo and in vitro effect of growth hormone on estradiol secretion by human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 61-67.
- ⁷⁵ Pitton I, Bestetti GE, Rossi GL. The changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in streptozotocin-treated male rats depend from age at diabetes onset. *Andrologia* 1987; 19:464-473.
- ⁷⁶ Wang CF, Lasley BL, Yen SSC. Gonadotroph secretion in response to low, and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (functional disparity of the gonadotrophs). *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42:718-725.
- ⁷⁷ Distiller LA, Sagel J, Morley JE, Seftel HC. Pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1975 ; 24:278-380.
- ⁷⁸ Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 1987; 138:190-194.
- ⁷⁹ Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL, Muller EE. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology* 1985; 117: 208-216.
- ⁸⁰ Johnson ML, Sidman RL. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. *Biol Reprod* 1979; 20: 552-559.
- ⁸¹ Zeidler A, Gelfand R, Tamagna E, Marrs R, Chopp R, Kletzky O. Pituitary gonadal function in diabetic male patients with and without impotence. *Andrologia* 1982; 14:62-68.
- ⁸² South SA, Asplin CM, Carlsen EC, Booth RA, Weltman JY, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS. Alterations in luteinizing hormone secretory activity in women with insulin-dependent diabetes mellitus and

secondary amenorrhoea. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1048-1053.

⁸³ Rossi GL, Bestetti G. Morphological changes in the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis of male rats after twelve months of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1981; 21: 476-481.

⁸⁴ Marca A, Morgante G, De Leo V. Evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in amenorrhoeic women with insulin-dependent diabetes. *Hum Reprod* 1999; 14: 298-302.

⁸⁵ Iranmanesh A, Veldhuis JD, Carlsen EC, Vaccaro VA, Booth RA, Lizarralde G, Asplin CM, Evans WS. Attenuated pulsatile release of prolactin in men with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 73-78.

⁸⁶ Van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology* 1979; 105: 666-673.

⁸⁷ Olson BR, Scott DC, Westel WC, Elliot SJ, Tomic M, Stokilkovic S, Nieman LK, Wray S. Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology* 1995; 62: 155-165.

⁸⁸ Suter DE, Schwartz NB. Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1985; 117: 855-859.

⁸⁹ Veldhuis JD, Johnson ML, Dufau ML. Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low dose exogenous gonadotropin-releasing hormone pulses in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 1275-1282.

⁹⁰ Castro-Fernández C, Olivares A, Söderlund D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4603-4610.

⁹¹ Ropelato MG, García-Rudaz MC, Castro-Fernández C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M, Veldhuis JD. A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin*

Endocrinol Metab 1999; 84: 4629-4636.

⁹² Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosilation. Arch Med Res 2001; 32: 520-532.

⁹³ Summerfield JA, Vergall J, Jones EA. Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabetes mellitus. J Clin Invest 1982; 69: 1337-1347.

⁹⁴ Smals AGH, Pieters GFF, Lozekoot DC, Benraad TJ, Kloppenborg PW. Dissociated response of plasma testosterone and 17 α -hydroxiprogesterone to a single or repeated human chorionic gonadotropin administration in normal man. J Clin Endocrinol Metab 1980; 50:190-193.

⁹⁵ Padron RS, Wischusen J, Hudson B, Burger HG, De Kretser DM. Prolonged biphasic response of plasma testosterone to a single intramuscular injection of human chorionic gonadotropin. J Clin Endocrinol Metab 1980; 50:1100-1104.

⁹⁶ Smals AGH, Pieters GFFM, Kloppenborg PWC, Lozekoot DC, Benraad TJ. Lack of biphasic steroid response to single human chorionic gonadotropin administration in patients with isolated gonadotropin deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1980; 50:879-881.

⁹⁷ Toscano V, Balducci R, Adamo MV, Manca Bitti ML, Sciarra F, Boscherini B. Response to a single dose of human chorionic gonadotropin in prepubertal boys. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57:421-424.

⁹⁸ Daubresse JC, Meunier JC, Wilmotte J, Luycx A, Lefebvre PJ. Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence. Diabetes Metab 1978; 4:233-237.

⁹⁹ Valimaki M, Liewendahl K, Nikkanen P, Pelkonen R. Hormonal changes in severely uncontrolled type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Scand J Clin Invest 1991; 51:385-393.

¹⁰⁰ Howland BE, Zebrowski EJ. Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. Horm Metab Res 1976; 8: 465-469.

¹⁰¹ Kuhn-Velten N, Codjambopoulo P, Herberg L, Kley HK, Staib W. In-vitro studies of the development of pituitary and testicular function in diabetes (C57Bl/KsJ-db/db) mutant mice. Horm Metab Res 1985; 17: 576-579.

¹⁰² Murray FT, Cameron DF, Orth JM, Katovich MJ. Gonadal disfunction in the spontaneously diabetic BB rat: alterations of the testes morphology, serum testosterone and LH. Horm Metab Res 1985; 17: 495-501.

-
- ¹⁰³ Tanaka M, Nakaya S, Kumay T, Watanabe M, Matsumoto N, Kobayashi S. Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Endocr Res* 2001; 27: 109-117.
- ¹⁰⁴ Adashi EY, Fabics C, Hsueh AJW. Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 1982; 26:270-280.
- ¹⁰⁵ Cameron DF, Rountree J, Schultz RE, Repretta D, Murray FT. Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBWOR diabetic rats. *Am J Physiol* 1990; 259: E881-889.
- ¹⁰⁶ Zeidler A, Gelfand R, Draus J, Tauscher JK, Chopp RT. Circadian variation in plasma prolactin, gonadotropins, and testosterone in diabetic male patients with and without impotence. *Fertil Steril* 1981; 35: 653-656.
- ¹⁰⁷ Kasson BG, Hsueh AJ. Insulin-like growth factor-I augments gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 52: 27-34.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Poorly Controlled Type I Diabetes Mellitus in Young Men Selectively Suppresses Luteinizing Hormone Secretory Burst Mass

JUAN CARLOS LÓPEZ-ALVARENGA, TERESA ZARIÑÁN, ALEIDA OLIVARES, JORGE GONZÁLEZ-BARRANCO, JOHANNES D. VELDHUIS, and ALFREDO ULLOA-AGUIRRE

Department of Endocrinology and Metabolism, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ (J.C.L.-A., J.G.-B.); Research Units in Reproductive Medicine (T.Z., A.U.-A.) and Developmental Biology (A.O.), Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico D.F., Mexico; and Department of Internal Medicine, University of Virginia Health Sciences Center (J.D.V.), Charlottesville, Virginia 22908

Alterations in the reproductive axis function are present to a variable extent in patients with type I diabetes mellitus (IDDM). Results from studies in IDDM men have yielded discrepant findings, which may reflect nonuniform patient selection criteria, age, diabetic status, duration of the disease and differences in sampling protocols. To more clearly define the impact of early diabetic alterations in the male reproductive axis, we applied a combined strategy of patient selection restricted to young men with relatively short duration of IDDM, dual control groups, multiparameter deconvolution analysis to assess LH secretory activity, and assessment of time-dependent changes in human chorionic gonadotropin (hCG)-stimulated serum testosterone concentrations. Three groups of subjects were studied: 11 young men with poorly controlled IDDM, 9 well controlled diabetics, and 9 healthy men. All volunteers underwent blood sampling at 10-min intervals before and after 2 consecutive iv pulses of 10 μ g GnRH. On a separate day, 40 IU/kg hCG were given im, and blood samples were collected before hCG administration, every 60 min thereafter for 6 h, and then 24, 48, and 72 h after the injection. Mean serum LH concentrations across the basal 6-h sampling period were significantly ($P < 0.05$) decreased in men with poorly controlled IDDM (11 ± 1.6 IU/liter) compared with those in well controlled diabetics (19 ± 1.8 IU/liter) and healthy controls (19 ± 1.5 IU/liter). Multiple parameter deconvolution analysis revealed a 50% reduction in the mass of LH secreted per burst and the pulsatile LH secretion rate in poorly controlled IDDM (mass of LH secretion/burst, 7 ± 1.1 vs. 12 ± 2.1 and 13 ± 1.5 IU/liter; LH secretion rate, 47 ± 6.3 vs. $78 \pm$

10 and 87 ± 11 IU/liter \cdot 6 h; poorly controlled vs. well controlled IDDM and healthy controls, respectively; $P < 0.05$ for both parameters). Uncontrolled IDDM patients had significantly ($P < 0.05$) lower integrated serum LH concentrations after the first and second GnRH pulses (first GnRH pulse, 4460 ± 770 vs. 7250 ± 1200 and 5120 ± 910 IU/liter; second pulse, 4700 ± 615 vs. 7640 ± 881 and 7100 ± 1230 IU/liter; poorly controlled vs. well controlled IDDM and healthy men, respectively) and markedly attenuated LH secretory burst mass after the second GnRH stimulus (49 ± 6.8 vs. 90 ± 13 and 83 ± 19 IU/liter; poorly controlled vs. well controlled IDDM and healthy controls, respectively). The biological to immunological ratio of LH released in baseline conditions was higher in uncontrolled IDDM patients (0.8 ± 0.10) than in controlled IDDM (0.37 ± 0.08) and healthy controls (0.48 ± 0.06 ; $P < 0.01$), whereas LH released in response to exogenous GnRH exhibited comparable ratios among the three study cohorts. Baseline serum testosterone levels as well as absolute and incremental responses to exogenous hCG did not differ by degree of metabolic control. Collectively, these results indicate that the function of the hypothalamic-gonadotrope axis is compromised in young men with poorly controlled IDDM, such that the amplitude of spontaneous pulsatile and exogenous GnRH-stimulated LH secretion is attenuated. This central hypogonadotropism is paradoxically associated with the presence in the circulation of gonadotropin molecules with enriched biological activity, which is evidently sufficient to temporarily maintain normal total testosterone concentrations in the earlier stages of IDDM. (*J Clin Endocrinol Metab* 87: 5507-5515, 2002)

INSULINOPENIC DIABETES MELLITUS disrupts reproductive hormone outflow consistently in the experimental animal (1-14) and affects the gonadal axis to a variable extent in the human (15-19). For example, in the rodent, acute insulin withdrawal damps LH pulsatility and impairs acute gonadotrope secretory responsiveness to GnRH (10, 13, 14). Insulin-driven reductions in brain stem glucose availability likewise repress pulsatile GnRH secretion (13, 14). In the human, poorly controlled type I diabetes mellitus (IDDM) may delay the onset of sexual maturation in children (20) and impair menstrual cyclicity in young women (21-24). Amenorrhea in the latter cir-

cumstance appears to reflect hypothalamic hypogonadotropism, as infusion of GnRH stimulates normal or increased LH release (21-24).

IDDM men maintain normal or low serum testosterone (T) and LH concentrations and exhibit variable gonadotrope responses to exogenous GnRH (16-19, 25, 26). Discrepant findings in men with IDDM may reflect nonuniform patient selection criteria, age, degree of metabolic control, duration of diabetes, and extent of comorbid complications.

To examine the nature of early diabetic alterations in the male gonadal axis, the present clinical investigation applies a combined strategy of 1) patient selection restricted to young men with a shorter duration of poorly controlled IDDM without macrovascular, renal, or neurological complications or erectile dysfunction; 2) dual control groups comprising patients with well controlled IDDM and healthy volunteers

Abbreviations: ApEn, Approximate entropy; B/I, ratio of LH bioactivity to immunoreactivity; E2, estradiol; hCG, human chorionic gonadotropin; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; T, testosterone.

of comparable age and body mass index; 3) multiparameter deconvolution analysis to quantitate pulsatile LH secretion and LH half-life before (baseline) and after two consecutive iv pulses of a submaximally effective dose of GnRH; and 4) time-dependent increases in the serum T concentration after a single maximal human chorionic gonadotropin (hCG) stimulus.

Subjects and Methods

A total of 20 patients with IDDM selected from our out-patient clinic agreed to participate. The study was approved by the local human ethics committee. Written informed consent was provided before participation. The initial criteria for eligibility included age between 20–30 yr, IDDM for less than 7.0 yr, poor (but nonketotic) or optimal/suboptimal metabolic control (defined as glycated hemoglobin levels >10% or <8%, respectively) over at least the preceding 2 months, and body mass index of 19–27 kg/m². The primary cohort comprised 11 men with IDDM, with a median duration of disease of 3.7 yr (range, 2–6.7 yr) and age of 22 yr (range, 20–29 yr); these subjects exhibited poor metabolic control and presented mean \pm SEM glycated hemoglobin concentrations of 12.2 \pm 1.6% (normal range, 4.0–6.0%; IDDM-U group). Daily insulin doses [administered in a 2-injection/d mixed (intermediate/very fast-acting insulin) regimen] ranged from 0.38–0.72 U/kg (0.56 \pm 0.14 U/kg). A disease-specific control group included 9 well-controlled type I diabetic patients (IDDM-C), with a median disease duration of 5.0 yr (range, 2–6.5 yr) and a median age of 23 yr (20–27 yr; $P = NS$ vs. IDDM-U). Glycated hemoglobin values were 5.4–7.9% (6.9 \pm 0.8%), and daily insulin (administered in a multiple, 3- or 4-injection/d regimen, including an intermediate-acting insulin dose at bedtime) requirements were 0.44–0.76 U/kg (0.63 \pm 0.15 U/kg). Patients in this group exhibited fasting plasma glucose concentrations below 7.1 mmol/liter and 2-h postprandial levels less than 10 mmol/liter on 3 different occasions over a 2-month observation period. None of the patients in the IDDM-C group had ever presented glycated hemoglobin concentrations above 10%. A healthy control cohort (NDC) included 9 men with a median age of 25 yr (21–28 yr) and normal glycated hemoglobin concentrations (5.6 \pm 0.6%). The mean body mass index was comparable in diabetic patients (IDDM-U, 22.7 \pm 2.9; IDDM-C, 22.7 \pm 1.4 kg/m²) and healthy subjects (NDC, 24.7 \pm 1.2 kg/m²). Physical activity history was similar in the 3 study groups.

Exclusion criteria included the use of drugs and/or alcohol, hypertension, renal failure or microalbuminuria, proliferative retinopathy, macrovascular disease, fixed neurological deficits, autonomic dysfunction, or impotence. One IDDM-U patient had mild acral sensory loss. Physical examination (including penis and testis size) and screening laboratory tests of hepatic, renal, and hematological function were normal. All subjects were biochemically euthyroid. None had ever received (noninsulin) hormonal treatment or neuropsychotropic medications.

Volunteers were admitted to the metabolic research ward at 0730 h, and an indwelling heparinized catheter was placed in an antecubital vein. Subjects remained recumbent and were provided light meals at 0900 and 1400 h. Beginning at 0800 h, blood samples were obtained every 10 min for 10 h. The first 6-h segment was used to monitor endogenous GnRH-driven (spontaneous) LH secretion. After 6 and 8 h of blood sampling, a pulse of 10 μ g GnRH (Serono de Mexico, Mexico D.F., Mexico) was injected by iv bolus. Subjects were readmitted on a separate day at 0730 h, and at 0830 h they were given hCG 40 IU/kg im (Organón Mexicana S.A. de C.V., Mexico City, Mexico). This hCG dose provokes a maximal early (*i.e.*, within 1–6 h) and late (*i.e.*, within 24–72 h) rise in serum T concentrations in normal individuals (27). Blood samples were collected before hCG administration, every 60 min thereafter for 6 h, and then 24, 48, and 72 h after the injection. Sera were frozen at –20 C until later assay.

Immunoassays

The LH RIA employed [¹²⁵I]-radiolabeled NIH LH-B (specific activity, 70–90 μ Ci/ μ g protein), antiserum to human LH-2 (final dilution, 1:800,000), and LER-907 as standard (1 mg LER-907 = 277 IU Second International Reference Preparation of human menopausal gonadotro-

pin) (28). All samples from a given subject were analyzed together in duplicate. The detection threshold was 0.7 IU/liter. Intra- and interassay coefficients of variation were 4.1–6.2% and 6.1–11.3%, respectively, over displacement ranges of 15–23%, 45–59%, and 75–84%. FSH was assayed by RIA of pooled sera (6-h baseline) using the Second International Reference Preparation of human menopausal gonadotropin standard, as previously described (29). PRL was determined by ELISA (Immuno-metrics, London, UK) using WHO International Reference Preparation 84/500. Assay sensitivity was 20 mIU/liter, with an absolute range of 40–310 mIU/liter. Estradiol (E2) was measured by solid phase RIA (Diagnostic Products, Los Angeles, CA), SHBG by immunofluorometry (Delfia, Wallac, Inc., Turku, Finland), and cortisol by RIA (WHO Matched Reagent Program, Geneva, Switzerland). T concentrations were quantitated by immunochemiluminometry (Immulite Total Testosterone, Diagnostic Products). T bioavailability was estimated as the molar ratio of T to SHBG. Intraassay coefficients of variation averaged less than 8% (FSH and cortisol), less than 5% (PRL, E2, and T), and less than 3.5% (SHBG).

In vitro bioassay of LH

In vitro LH bioassay and RIA were applied separately to the single baseline (6-h) and the two GnRH-stimulated (2-h) serum pools (denoted segments 1, 2, and 3 in Fig. 1). Both assays employed highly purified human recombinant LH produced by Chinese hamster ovary cells (provided by Organon International BV, Oss, The Netherlands) as standard for the corresponding reference curves. The LH bioassay monitors cAMP production by a human embryonic kidney cell line stably transfected with the full-length human LH receptor cDNA (provided by Dr. Aaron J. W. Hsueh, Stanford University, Palo Alto, CA). Total (intra- plus extracellular) cAMP concentrations were determined by RIA after acetylation, as described previously (30). To equalize volume, samples were diluted with sera collected from women treated with oral contraceptives, wherein LH immunoreactivity and bioactivity were undetectable. Each sample was assayed at three dilutions (12.5, 25, and 50 μ l) in triplicate. The final concentration (vol/vol) of serum was less than 10%. Assay sensitivity was 0.075 nM (LER-907)/tube. Inter- and intraassay coefficients of variation were less than 18% and less than 10%, respectively, at the 50% effective dose.

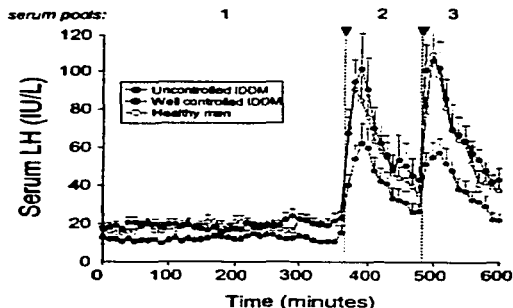


FIG. 1. Immunoreactive LH concentrations determined in serum samples collected every 10 min for 6 h before and for 4 h after two consecutive iv pulses of GnRH administered 2 h apart (arrowheads) in men with poorly controlled ($n = 11$) and well controlled ($n = 9$) IDDM and in healthy controls ($n = 9$). Sera were pooled over successive 6-, 2-, and 2-h intervals (delineated by the vertical broken lines) for later analysis by *in vitro* bioassay. Data represent the mean \pm SEM.

Deconvolution analysis of spontaneous and GnRH-induced LH release

Deconvolution analysis was applied to quantitate the frequency, amplitude, and mass of LH secretory bursts and the apparent LH half-life from the 6-h (basal) and 2-h (post-GnRH) serum LH concentration-time series (31, 32). The mass of an LH secretory burst is the analytical time integral of the deconvolution-resolved secretory impulse.

Assessment of monohormonal (LH) pattern regularity

Univariate approximate entropy (ApEn) was employed to quantitate the pattern regularity of serial LH measurements (33). This statistical approach allows measurement of relative orderliness in time series data, with minimal dependence on mean pulse amplitude, interpulse baseline, or subthreshold sample uncertainty, and thus complements conventional pulse detection (34, 35). In the present analysis, m (i.e. the pattern comparison window size) was assigned a value of 1, which serves to evaluate the statistical consistency of contiguous (sample by sample) data patterns. The parameter r (i.e. the *de facto* statistical tolerance for testing pattern recurrence) was set at 35% as appropriate for a shorter time series (36). The foregoing ApEn parameters, designated by ApEn (1,35%), provide a replicable ApEn statistic with an approximate SD of 0.06–0.08 (36–38). A normalized ratio of observed to random ApEn was calculated for each time series as the mean ratio of observed to random ApEn values calculated by shuffling the original data series times 1000 times (35). ApEn ratios below unit denote more orderly patterns of hormone release and *vice versa*.

Statistical analysis

ANOVA was applied to compare serum hemoglobin A_{1c}, LH, FSH, E₂, and T concentrations, incremental bioactive LH response to exogenous GnRH (Δ LH: difference between exogenous GnRH-stimulated bioactive LH concentrations and baseline concentrations), maximal early (1–6 h post-hCG) and late (2–4 post-hCG) T peaks, and the incremental T response to hCG (Δ T was defined as the difference between the T peak and preceding T nadir (early) or basal T (late)) (27). *Post hoc* contrasts used the Newman-Keuls critical ranks test and the Tukey highest significant difference criterion. Dynamic LH measures (frequency, mass, amplitude, half-duration and half-life) were transformed logarithmically to equalize residual variance before ANOVA. Values are reported as the mean \pm SEM or range. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Baseline hormone measurements

Table 1 summarizes mean serum concentrations of LH, FSH, PRL, cortisol, and E₂ and the molar T/SHBG ratio in the three cohorts studied. LH concentrations were comparable in IDDM-C and NDC, but were significantly lower in men with poorly controlled diabetes mellitus (IDDM-U).

Spontaneous LH secretion

Figure 1 depicts group mean (\pm SEM) serum LH concentrations profiles sampled every 10 min over 6 h (spontaneous LH release). Deconvolution analysis was applied to evaluate the mechanisms underlying reduced integrated serum LH concentrations in IDDM-U (Table 2). The number of LH secretory bursts was comparable in all three cohorts. However, men with poorly controlled diabetes mellitus showed a 50% reduction in the mass of LH secreted per burst and, hence, in the pulsatile LH secretion rate. This was due to selective attenuation of LH secretory burst amplitude (i.e. a reduced maximal rate of LH secretion attained per burst). The foregoing contrasts were specific, as LH secretory burst half-duration (duration of the secretory event at half-maximal amplitude), basal/nonpulsatile LH release, and LH half-life were similar in the three groups. The synchrony outflow of LH in IDDM-U was statistically indistinguishable from those in IDDM-C and NDC (Table 2). Figures 2 and 3 illustrate individual LH concentration and secretory profiles from each cohort.

GnRH-stimulated LH release

LH concentrations peaked 25 min (median) after each GnRH injection. NDC and IDDM-C subjects responded to GnRH stimulation equivalently (Table 3). IDDM-U patients had significantly lower integrated serum LH concentrations after the first

TABLE 1. Serum concentrations of FSH, PRL, E₂, and cortisol and the molar T/SHBG ratio in men with IDDM and normal controls

Study group	LH (IU/liter)	FSH (IU/liter)	PRL (mIU/liter)	Cortisol (nmol/liter)	E ₂ (pmol/liter)	T/SHBG (molar ratio)
Poorly controlled IDDM (n = 11)	11 \pm 1.6 ^a	12 \pm 0.4	91 \pm 22	298 \pm 17	80 \pm 10	0.59 \pm 0.10
Well controlled IDDM (n = 9)	19 \pm 1.8 ^b	9.4 \pm 2.0	82 \pm 13	246 \pm 25	110 \pm 10	0.69 \pm 0.06
Healthy men (n = 9)	19 \pm 1.6 ^b	9.4 \pm 1.6	76 \pm 28	260 \pm 20	125 \pm 20	0.64 \pm 0.10

Data are the mean \pm SEM.

^{a,b} ANOVA revealed no significant group contrasts, except for LH, wherein different alphabetic superscripts denote significant mean differences by ANOVA.

TABLE 2. Deconvolution-based comparisons and ApEn (1,35%) ratios of pulsatile LH secretion and half-life in patients with IDDM and healthy men

LH attribute	Poorly controlled IDDM (n = 11)	Well controlled IDDM (n = 9)	Normal controls (n = 9)
Integrated LH concentration (IU/liter \cdot 6 h)	3960 \pm 570 ^b	6920 \pm 640 ^a	6660 \pm 560 ^a
Half-life (min)	54 \pm 3.2	58 \pm 2.6	61.5 \pm 5.3
Burst frequency (no./6 h)	6.6 \pm 0.6	7.3 \pm 0.59	6.8 \pm 0.64
Interburst interval (min)	56 \pm 5.7 ^b	48 \pm 3.5 ^a	54 \pm 4.1 ^{a,b}
Mass secreted per burst (IU/liter)	7.0 \pm 1.1 ^b	12 \pm 2.1 ^a	13 \pm 1.5 ^a
Secretory-burst half duration (min)	13 \pm 2.9	12 \pm 2.9	7.8 \pm 1.5
Pulsatile secretion rate (IU/liter \cdot 6 h)	47 \pm 6.3 ^b	78 \pm 10 ^a	87 \pm 11 ^a
ApEn (1,35%) ratio	0.875 \pm 0.020	0.854 \pm 0.024	0.881 \pm 0.022

^{a,b,c} Means with different alphabetic superscript differ significantly within the corresponding row.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

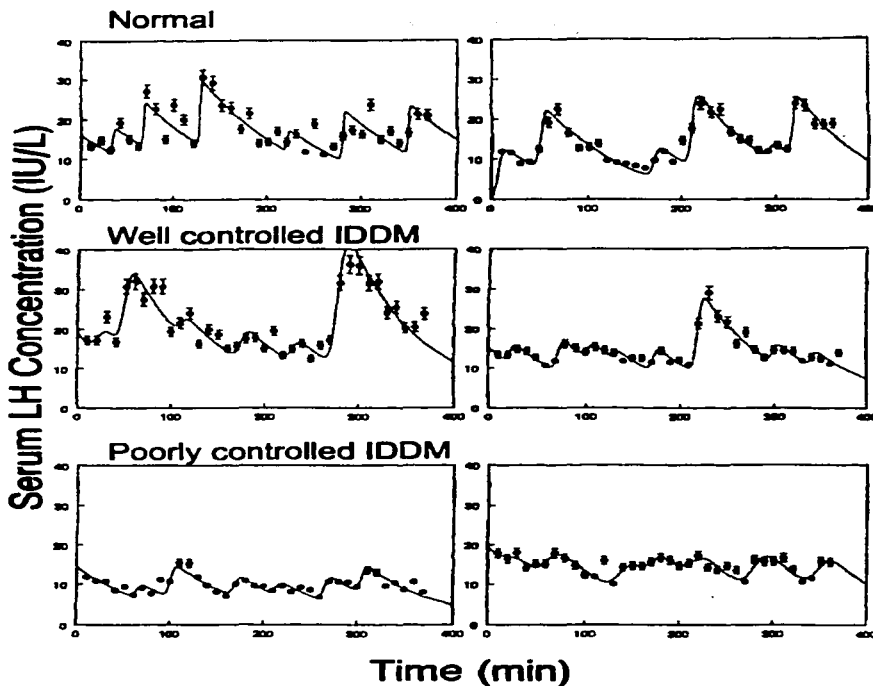


FIG. 2. Illustrative serum immunoreactive LH concentration profiles in two healthy men and two patients with poorly vs. well controlled IDDM. Each panel shows the observed data and corresponding deconvolution-predicted fits (continuous lines). Vertical bars associated with each value denote the LH concentration-dependent within-assay SD.

and second GnRH pulses and markedly attenuated LH secretory burst mass after the second GnRH stimulus.

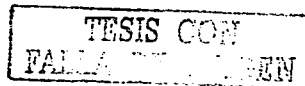
In vitro LH bioactivity

Serum bioactive LH concentrations (international units per liter; pooled over the 6-h baseline interval) averaged 18 ± 2 (IDDM-U), 12 ± 2 (IDDM-C), and 14 ± 1 (NDC; $P < 0.05$, IDDM-U vs. IDDM-C and NDC). Given the reduction in immunoreactive LH concentrations (above), baseline ratios of LH bioactivity to immunoreactivity (B/I) were significantly higher in IDDM-U (0.81 ± 0.10) than in IDDM-C (0.37 ± 0.08) and NDC (0.48 ± 0.06 ; $P < 0.01$). Bioactive LH concentrations were higher after GnRH than at baseline in all three study cohorts (Table 3). Although the mean bioactive

LH responses to the first and second exogenous GnRH pulses were reduced in IDDM-U (mean bioactive LH responses to the first and second GnRH pulses, 15 ± 4 and 19 ± 5 , respectively) compared with IDDM-C (22 ± 7 and 21 ± 4) and NDC (23 ± 7 and 24 ± 6), the differences did not reach statistical significance. The B/I remained similar to baseline (not shown).

Serum T response to hCG

IDDM-C and IDDM-U volunteers had normal serum T concentrations at baseline (Table 4). hCG stimulated a biphasic rise in T concentrations (Fig. 4). Absolute and incremental responses did not differ by disease state or degree of metabolic control (Table 4).



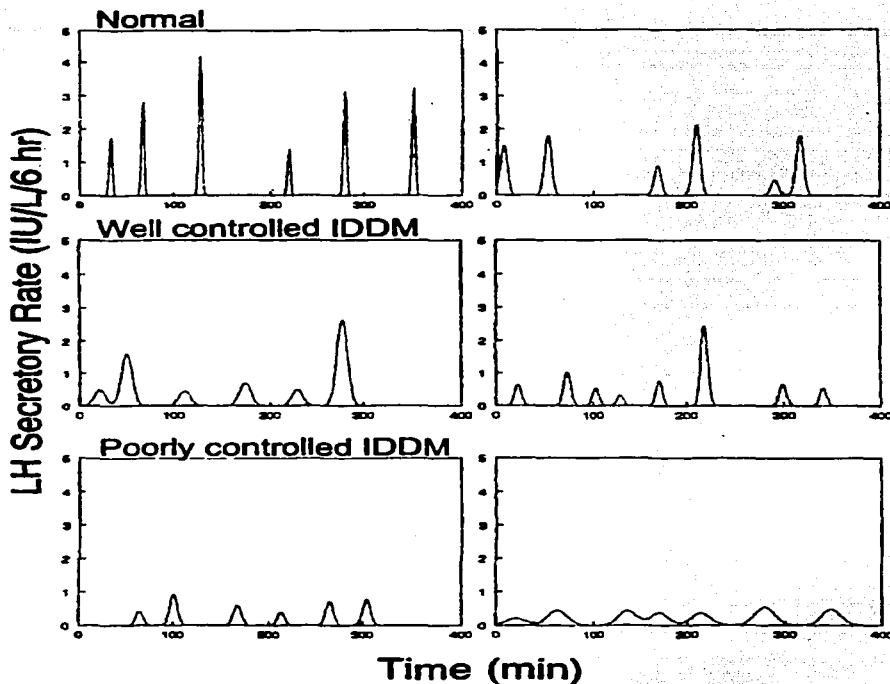


FIG. 3. Illustrative deconvolution-resolved LH secretory rates in the two normal men and two patients with well vs. poorly controlled IDDM, whose concentration data are shown in Fig. 2.

TABLE 3. Secretory response to two consecutive GnRH stimuli in men with IDDM and normal controls

LH	First GnRH stimulus			Second GnRH stimulus		
	Poorly controlled IDDM	Well controlled IDDM	Normal controls	Poorly uncontrolled IDDM	Well controlled IDDM	Normal controls
Integrated (IU/liter)	4460 ± 770 ^a	7250 ± 1200 ^{a,b}	5120 ± 910 ^{a,c}	4700 ± 615 ^b	7640 ± 881 ^a	7100 ± 1230 ^a
Mass per burst (IU/liter)	66 ± 14	89 ± 21	70 ± 3	49 ± 8.8 ^b	90 ± 13 ^a	83 ± 19 ^a
Peak (IU/liter)	68 ± 12	106 ± 17	97 ± 15	59 ± 8.9 ^b	110 ± 15 ^a	111 ± 20 ^a
Bioactive LH (IU/liter)	32 ± 3	34 ± 7	37 ± 7	36 ± 6	30 ± 5	37 ± 12

^{a,c,d} Means identified by different alphabetic superscript differ significantly ($P < 0.05$) within intervention.

Discussion

Several studies in experimentally induced and spontaneously occurring diabetes indicate that uncontrolled diabetes may potentially alter the function of the reproductive axis

(10, 11, 13, 14, 39). However, studies applying extended sampling protocols to assess more precisely the nature of the alterations in LH and/or T secretion in men with DM-1 are rather scarce. The present study appraises spontaneous (en-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLE 4. Impact of hCG administration on serum T concentrations in men with IDDM

Study group	Basal	T concentration (nmol/liter)			Increment late
		Early maximum	Early increment	Late maximum	
Poorly controlled IDDM	21 ± 3	26 ± 3	7 ± 1	38 ± 4	18 ± 3
Well controlled IDDM	29 ± 2	31 ± 4	10 ± 2	42 ± 4	13 ± 3
Normal controls	26 ± 2	30 ± 3	7 ± 1	39 ± 4	14 ± 2

T concentrations were monitored over the intervals 1–6 h (early) and 24, 48, and 72 h (late) after a single injection of hCG (40 IU/kg im) 30 min after the basal measurement. (See Subjects and Methods). Values within columns did not differ by ANOVA ($P > 0.05$).

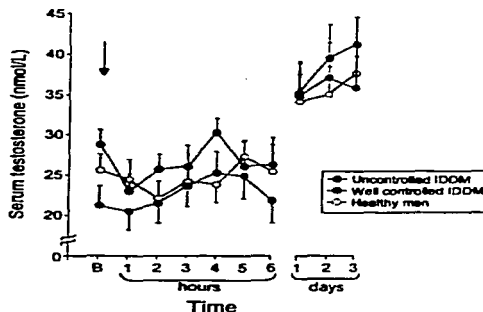


FIG. 4. Early (1–6 h) and late (24, 48, and 72 h) serum total T concentrations after a single im injection of hCG (40 IU/kg; arrow). Data are from well and poorly controlled patients with IDDM and normal subjects. Each point represents the mean \pm SEM.

ogenous) and exogenous GnRH-stimulated LH secretion in healthy men and patients with well and poorly controlled IDDM. Deconvolution analysis of baseline time series revealed that LH secretory burst frequency was normal in both diabetic cohorts and comparable to independent estimates in healthy young men (40, 41). On the other hand, patients with poorly controlled IDDM exhibited a 50% reduction in the mass and amplitude of LH secretory bursts, and consequently lower mean serum LH concentrations. Reduced LH pulse amplitude is consistent with observation in the streptozotocin-treated diabetic male rat (10). However, experimentally induced diabetes also suppresses LH pulse frequency (10, 12). The precise basis for the latter contrast with the human is not known. Plausible explanations include 1) interspecies differences in mechanisms governing gonadotropin synthesis and secretion; 2) underlying pathophysiology, including severity and duration of hypoinsulinism and/or hyperglycemia as well as presence of secondary metabolic disturbances (such as ketone body formation) that may accompany and potentially aggravate the effects of insulin deprivation on the hypothalamus and/or the pituitary (19, 39, 42); and 3) use of different sampling protocols and pulse analysis methodological approaches (43, 44). In addition, isolated suppression of LH pulse amplitude in men with uncomplicated IDDM may denote less severe disruption of GnRH/LH output, akin to the low amplitude pattern evident

in aging, uremia, and short-term fasting (45–49). Thus, alterations in the amplitude of LH secretory events may represent the first detectable alteration of LH secretory dynamics within the context of the natural history of reproductive failure in diabetic men. In this setting, abnormalities in both LH pulse amplitude and frequency may result from longstanding uncontrolled disease, as suggested by studies documenting time-dependent morphological alterations in the hypothalamus and gonadotropes of streptozotocin-treated male rats (42). Longitudinal studies would be required to establish the nature of progressive hypothalamo-pituitary pathophysiology in IDDM (50).

To evaluate the mechanism(s) underlying the reduction in LH secretory burst mass in poorly controlled IDDM, we infused two consecutive submaximally stimulatory doses of GnRH (51, 52). Deconvolution analysis documented a marked (50%) reduction in LH secretory burst mass after the second GnRH pulse. This inference is compatible with some, but not all, findings in insulinopenic animals, in which the heights of single GnRH-stimulated LH peaks are reportedly normal (2, 5, 7, 16, 26) or decreased (3, 8, 15, 53). Comparison of LH secretory burst mass after GnRH stimulation revealed marked attenuation of LH release after the second stimulus in men with poorly controlled IDDM. This distinction could denote that poorly controlled IDDM initially impairs the *de novo* bioynthesis of LH, which is required to replenish gonadotrope cell stores after the first GnRH stimulus. Impaired gonadotrope priming by endogenous GnRH and/or enhanced gonadotrope susceptibility to down-regulation might account for the present findings. Hypothalamic hypogonadotropism is inferable in young women with poorly controlled IDDM. In one study such patients evinced paradoxically heightened LH secretion after a single submaximally effective GnRH stimulus and reduced LH pulse frequency (23). If findings in the female are corroborated in further studies, one could postulate that gender, the sex steroid milieu, and/or the severity and duration of diabetes mellitus contribute to gonadotrope sensitivity.

The design of the present study does not allow us to ascertain whether the changes observed in LH secretion may be reversible with metabolic control. Although studies in experimentally induced diabetes have shown that the effects of short-term insulin withdrawal on LH secretion may be reversed by acute insulin resupplementation (13, 39), longitudinal studies are required to establish the potential reversibility of central hypogonadotropism in temporarily uncontrolled IDDM.

Based on the results obtained in the present study, a single definitive mechanism through which LH secretion is impaired in poorly controlled diabetic men cannot be postu-

lated. The presence of an insulin-deprived milieu may play a pivotal role in the development of gonadotrope dysfunction in uncontrolled IDDM; in fact, insulin can enhance gonadotrope cell sensitivity to GnRH *in vitro* (54). Further, studies in both streptozotocin-treated male rats and male diabetic *db* mutant mice have demonstrated a reduced pituitary LH content as well as the presence of morphological changes at the gonadotrope level (2, 42, 55), lending additional support to the possibility that relative hypoinsulinism may lead to changes in pituitary function in diabetic individuals. On the other hand, insulin has systemic access to and binding sites within certain regions of the basal hypothalamus (including the median eminence and the arcuate nucleus), facilitates GnRH secretion in the sheep, and promotes the proliferation of murine GTI-7 neurons directly (13, 24, 56, 57). Thus, relative insulin deficiency, like that present in uncontrolled IDDM, may potentially reduce the strength of the GnRH impulse and consequently attenuate GnRH-dependent pituitary feedforward signaling. Finally, metabolic stress in experimental animals also drives hypothalamic CRH and dopamine outflow, both of which can restrain pulsatile GnRH release (24, 58, 59). As indirect markers of such putative stress responses, we measured serum cortisol and PRL concentrations in baseline (6-h) pools, which were normal in men with poorly controlled IDDM.

In vitro bioassay of LH revealed elevated values in men with poorly controlled diabetes mellitus. Infusion of GnRH failed to completely stimulate bioactive LH secretion equivalently in such patients, in agreement with the RIA result. However, the baseline B/I was significantly elevated in poorly regulated IDDM. This unexpected finding could reflect altered posttranslational processing of LH. Indeed, glycosylation, sialylation, and sulfation of terminal oligosaccharide residues control the *in vivo* metabolic clearance and *in vitro* bioactivity of human LH (28, 60, 61). A glycation-dependent mechanism(s) also influences the cellular recognition, uptake, and degradation of glycoproteins by hepatic reticuloendothelial receptors for asialo-glycoprotein molecules (62). Accordingly, the present findings of normal bioactive, but reduced immunoreactive, LH concentrations in men with poorly controlled IDDM could signify either relatively increased secretion or decreased removal of biologically active compared with immunoreactive LH. Alternatively, as may occur with other proteins (62, 63), a sustained exposure to a glucose-enriched endogenous milieu may promote nonenzymatic glycation of LH molecules, rendering glycosylation variants with altered functional and/or biochemical properties. Further studies are needed to identify the mechanism(s) by which metabolically unstable IDDM may potentially disturb the biosynthetic pathway involved in gonadotropin glycosylation.

A single dose of hCG stimulates T secretion initially after 2–4 h (early) and further after 48–120 h (late) (27, 64, 65). The biphasic response is attenuated in GnRH deficiency states, e.g. hypogonadotropic hypogonadism of either physiological (prepubertal) or pathological (Kallmann's syndrome) origin (27, 66, 67). In the diabetic subjects studied here, baseline serum T concentrations and T/SHBG ratios were normal. Moreover, both the early and delayed actions of hCG were preserved. In other studies, ketosis-prone, systemically com-

plicated, and older diabetic patients exhibit variable degrees of hypoandrogenemia before and after hCG administration (16–19). In the experimental animal, severe insulinopenia and hyperglycemia impair hCG binding in the testis and reduce Leydig cell responsiveness to a lutotropic stimulus (1, 5, 14, 23, 68, 69). The basis for this difference from the present clinical data is not known. We speculate that retention of LH bioactivity and/or intragonadal (paracrine) regulation of Leydig cell function may be relevant to maintaining T secretion in the earlier stages of IDDM (70).

In summary, poorly controlled, but systemically uncomplicated, IDDM in young men suppresses the amplitude of spontaneous (endogenous) pulsatile and exogenous GnRH-stimulated LH secretion, leading to central hypogonadotropism. This hyposecretory state more greatly affects LH immunoreactivity than LH bioactivity. The presence in the circulation of LH molecules with enriched bioactivity is evidently sufficient to maintain normal total T concentrations, the molar T/SHBG ratio, and Leydig cell responsiveness to hCG. Together the present data suggest that the attenuated GnRH-dependent drive of LH secretion in poorly controlled, but otherwise uncomplicated, IDDM may be subserved by a dual mechanism involving both pituitary responsiveness to GnRH and hypothalamic system control of the strength of the GnRH impulse. It is suggested that both alterations result from relative insulin deficiency and that other metabolic disturbances and/or complications that accompany longstanding diabetes aggravate the reproductive axis dysfunction eventually found in the majority of men with IDDM.

Acknowledgments

Reagents were generously provided by the NIDDK (Bethesda, MD) through Dr. A. F. Parlow from the National Hormone and Pituitary Program (Torrance, CA).

Received May 24, 2002. Accepted August 16, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alfredo Ulloa-Aguirre, M.D., D.Sc., Research Unit in Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social, Apartado Postal 99-065, Unidad Independencia, C.P. 10101, Mexico City D.F., Mexico. E-mail: ulloaa@servidor.unam.mx.

This work was supported by Grants 117643 from the Consejo Nacional de Tecnología, Mexico (to J.C.L.-A.), FP0038-1261 from the FOFI-Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico (to A.U.-A.), and support of the General Clinical Research Center of the University of Virginia and the Mayo Clinic from the National Center for Research Resources, Bethesda, MD (to J.D.V.).

J.C.L.-A. and T.Z. contributed equally.

J.C.L.-A. is a postgraduate student from the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (Mexico City, Mexico).

References

- Howland BE, Zebrowski EJ 1976 Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm Metab Res* 8: 465–469
- Johnson LM, Sidman RL 1979 A reproductive endocrine profile in the diabetes (*db*) mutant mouse. *Biol Reprod* 20:552–559
- Cusan L, Belanger A, Seguin C, Labrie F 1980 Impairment of pituitary and gonadal functions in alloxan-induced diabetic male rats. *Mol Cell Endocrinol* 18:165–176
- Peese DJ, Benitez A, Fernandez GC 1982 Effect of streptozotocin diabetes on the pituitary-testicular axis in the rat. *Horm Metab Res* 14:479–482
- Kuhn-Velten N, Codjambopoulo P, Herberg L, Kley HK, Staib W 1985 *In vitro* studies of the development of pituitary and testicular functions in diabetes (CS7BL/KsJ-*db/db*) mutant mice. *Horm Metab Res* 17:576–579

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

6. Benitez A, Perez DJ 1985 Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on regulation of Leydig cell function in the rat. *Horm Metab Res* 17:5-7
7. Murray FT, Cameron DE, Orth JM, Katowich MJ 1985 Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic rat: alterations of testes morphology, serum testosterone and LH. *Horm Metab Res* 17:495-501
8. Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D 1987 The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine male reproductive tract axis of the adult rat. *J Endocrinol* 91:13-21
9. Steger RW, Amador A, Lam E, Rathert J, Weisz J, Smith MS 1989 Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology* 124:1737-1743
10. Dong Q, Lazarus RM, Wong LS, Vilios M, Handelsman DJ 1991 Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol* 131:49-55
11. Sudha S, Valli G, Julie PM, Arunakaran J, Govindarajulu P, Balasubramanian K 2000 Influence of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the pituitary-testicular axis during sexual maturation in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:14-20
12. Dong QH, Handelsman DJ 1991 Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in experimental uremia. *Endocrinology* 128:1218-1222
13. Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL 2000 Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod* 62:1256-1261
14. Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Matsumoto N, Kobayashi S 2001 Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Endocr Res* 27:109-117
15. Diatiller LA, Segel J, Morley JE, Seftel HC 1975 Pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 24:123-127
16. Daubresse JC, Meunier JC, Wilmotte J, Luyckx AS, Lefebvre PJ 1978 Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence. *Diabetes Metab* 4:233-237
17. Murray FT, Thomas RG, Spevack M, Glaros AG 1987 Gonadal dysfunction in diabetic men with organic impotence. *J Clin Endocrinol Metab* 65:127-135
18. Fushimi H, Horie H, Inoue T, Kameyama M, Kanoo K, Ishihara S, Tsujimura T, Munoz K, Nakano M, and V 1989 Low testosterone levels in diabetic men and animals: a possible role in testicular impotence. *Diabetes Res Clin Pract* 6(Suppl 2):297-301
19. Valimaki M, Liewendahl G, Nikkanen P, Pelkonen R 1991 Hormonal changes in streptozotocin type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 51:385-393
20. Salerno M, Argenziano A, Di Maio S, Gasparini N, Formicola S, De Filippo G, Tenore A 1997 Pubertal growth, sexual maturation and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control. *Diabetes Care* 20:721-724
21. Djursing H, Hagen C, Nyholm HC, Carstensen L, Andersen AN 1993 Gonadotropin responses to gonadotropin-releasing hormone and prolactin responses to gonadotropin-releasing hormone and metoprololamide in women with amenorrhea and insulin-treated diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 56:1016-1021
22. Kjaer K, Hagen C, Sande SH, Eshoj O 1992 Epidemiology of menarche and menstrual disturbances in an unselected group of women with insulin-dependent diabetes mellitus compared to controls. *J Clin Endocrinol Metab* 75:524-529
23. South SA, Asplin CM, Carlsen EC, Booth Jr RA, Weltman JY, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS 1993 Alterations in luteinizing hormone secretory activity in women with insulin-dependent diabetes mellitus and secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1048-1053
24. La Marca A, Morgante C, De Leo V 1999 Evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in amenorrheic women with insulin-dependent diabetes. *Hum Reprod* 14:298-302
25. Zeidler A, Gelfand R, Draus J, Tauscher JK, Chopp RT 1981 Circadian variation in plasma prolactin, gonadotropins, and testosterone in diabetic male patients with and without impotence. *Fertil Steril* 35:655-656
26. Zeidler A, Gelfand R, Tamagna E, Marrs R, Chopp R, Kletzky O 1982 Pituitary gonadal function in diabetic male patients with and without impotence. *Andrology* 14:62-68
27. Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Diaz-Sanchez V, Altamirano A, Perez-Palacios G 1985 Self-priming effect of luteinizing hormone-hormone chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. In serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 61:926-932
28. Castro-Fernandez C, Olivares A, Söderlund G, Lopez-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP 2002 A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological-to-immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4603-4610
29. Zariwán T, Olivares A, Söderlund D, Mendez JP, Ulloa-Aguirre A 2001 Changes in the biological:immunological ratio of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Reprod* 16:1611-1617
30. Zambrano E, Zariwán T, Olivares A, Barrios-De-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A 1999 Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems. Implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrinology* 134:11-17
31. Veldhuis JD, Johnson ML, Dufau ML 1989 Physiological attributes of endogenous bioactive luteinizing hormone secretory bursts in man. *Am J Physiol* 256:E199-E207
32. Veldhuis JD, Johnson ML 1992 Deconvolution analysis of hormone data. *Methods Enzymol* 210:539-575
33. Pincus SM 1991 Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2297-2301
34. Veldhuis JD, Johnson ML, Veldhuis OL, Straume M, Pincus SM 2001 Impact of pulsatility of the ensemble orderliness (approximate entropy) of neurohormone secretion. *Am J Physiol* 281:R1975-R1985
35. Veldhuis JD, Straume M, Iranmanesh A, Mulligan T, Jaffe C, Barkan A, Johnson ML, Pincus SM 2001 Secretory process regulatory monitors neuroendocrine feedback and feedforward signaling strength in humans. *Am J Physiol* 280:R721-R729
36. Pincus SM, Hartman ML, Roelfsema F, Thoner MO, Veldhuis JD 1999 Hormone pulsatility discrimination via coarse and short time sampling. *Am J Physiol* 277:E948-E957
37. Pincus SM, Gevers EF, Robinson IC, van den Berg G, Roelfsema F, Hartman ML, Veldhuis JD 1996 Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *Am J Physiol* 270:E107-E115
38. Gevers E, Pincus SM, Robinson ICA, Veldhuis JD 1998 Differential orderliness of the GH release process in castrate male and female rats. *Am J Physiol* 274:R437-R444
39. Bucholtz DC, China S, Pappano VN, Nagatani S, Tsukamura H, Maeda K-I, Foster DL 2000 Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol Reprod* 62:1248-1255
40. Veldhuis JD, Urban RJ, Dufau ML 1992 Evidence that androgen negative-feedback regulates hypothalamic GnRH impulse strength and the bioactive doctrine feedback of biologically active luteinizing hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1227-1235
41. Veldhuis JD, Urban RJ, Beitins I, Blizzard RM, Johnson ML, Dufau ML 1989 Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Steroid Biochem* 33:749-750
42. Pitton I, Bestetti G, Rossi GL 1987 The changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis of streptozotocin-treated male rats depend from age at diabetes onset. *Andrologia* 19:464-473
43. Veldhuis JD, Johnson ML 1991 Specific methodological approaches to selected contemporary issues in deconvolution analysis of pulsatile neuroendocrine data. *Methods Neurosci* 28:25-92
44. Urban RJ, Evans WS, Rogol AD, Kaiser DL, Johnson ML, Veldhuis JD 1988 Contemporary aspects of secretory pulse detection algorithms. I. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in men. *Endocr Rev* 9:3-37
45. Aloi JA, Bergendahl M, Iranmanesh A, Veldhuis JD 1997 Pulsatile intravenous gonadotropin-releasing hormone administration averts fasting-induced hypoandrogenism and healthy aging in healthy, normal-weight men. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1543-1548
46. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Evans WS, Lizaralde G, Thoner MO, Vance ML 1993 Amplitude suppression of the pulsatile mode of immunoradiometric testosterone in female and hypoandrogenemia in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 76:587-593
47. Veldhuis JD, Wilkowski MJ, Urban RJ, Lizaralde G, Iranmanesh A, Bolton WK 1993 Evidence for attenuation of hypothalamic GnRH impulse strength with preservation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency in men with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 76:648-654
48. Veldhuis JD, Urban RJ, Lizaralde G, Johnson ML, Iranmanesh A 1992 Attenuation of luteinizing hormone secretory burst amplitude is a proximate basis for the hypoandrogenism or healthy aging in men. *J Clin Endocrinol Metab* 75:52-58
49. Bergendahl M, Veldhuis JD 1995 Altered pulsatile gonadotropin signaling in nutritional deficiency in the male. *Trends Endocrinol Metab* 6:145-159
50. Evans WS, Veldhuis JD 1986 Methods for studying reproductive complications. In: *Methods in diabetes research*. New York: Wiley & Sons; vol 2:649-676
51. Wang CF, Lasley BL, Yen SS 1976 Gonadotropin secretion in response to low and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (functional diagnosis of the gonadotroph). *J Clin Endocrinol Metab* 42:427-431
52. Veldhuis JD, Johnson ML, Dufau ML 1987 Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low-dose exogenous gonadotropin releasing hormone (GnRH) pulses in man. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1275-1278
53. Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL, Mueller EE 1985 One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. *Endocrinology* 117:429-436
54. Adashi EY, Haueh AJ, Yen SS 1981 Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 108:1441-1449
55. Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL 1985 Morphological changes in the hypothalamo-hypophysal-gonadal axis of male rats after twelve months of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 21:476-481

56. Iranmanesh A, Veldhuis JD, Carlson EC, Vaccaro VA, Lizarralde G, Asplin CP, Evans WS 1990 Attenuated pulsatile release of prolactin in men with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 71:73-78
57. van Houten M, Posner BL, Kopriva BM, Brawer JR 1979 Insulin-binding sites in the rat brain: *in vivo* localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology* 105:666-673
58. Olson BR, Scott DC, Wetsel WC, Elliot SJ, Tomic M, Stojilkovic S, Nieman LK, Wray S 1995 Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hyperbaldic GT1-7 cell line. *Neuroendocrinology* 62:153-165
59. Suter DE, Schwartz NB 1985 Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male rat pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 117:855-859
60. Ropelato MG, Garcia-Rudas C, Castro-Fernandez C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M, Veldhuis JD 1999 A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4629-4636
61. Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, Timossi C 2001 Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res* 32:520-532
62. Summerfield JA, Vergalla J, Jones EA 1982 Modulation of a glycoprotein recognition system on rat hepatic endothelial cells by glucose and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 69:1337-1347
63. Villanueva GB, Allen N 1988 Demonstration of altered antithrombin III activity due to nonenzymatic glycosylation at glucose concentration expected to be encountered in severely diabetic patients. *Diabetes* 37:1103-1107
64. Smals AG, Pieters GF, Lozekoot DC, Benraad TJ, Kloppenborg PW 1980 Dissociated responses of plasma testosterone and 17-hydroxyprogesterone to single or repeated human chorionic gonadotropin administration in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 50:190-193
65. Padron RS, Wischusen J, Hudson B, Berger HG, de Kretser DM 1980 Prolonged biphasic response of plasma testosterone to single intramuscular injections of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 50:1100-1104
66. Smals AG, Pieters GF, Kloppenborg PW, Lozekoot DC, Benraad TJ 1980 Lack of a biphasic steroid response to single human chorionic gonadotropin administration in patients with isolated gonadotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 50:879-881
67. Toscano V, Balducci R, Adamo MV, Manca Bitù ML, Sciarra F, Boscherini B 1983 Response to a single dose of human chorionic gonadotropin in prepubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 57:421-424
68. Adashi EY, Fabris C, Hsueh AJ 1982 Insulin augmentation of testosterone production in a primary culture of rat testicular cells. *Biol Reprod* 26:270-280
69. Cameron DF, Rountree J, Schultz RE, Repetta D, Murray FT 1990 Sustained hyperglycemia results in testicular dysfunction and reduced fertility potential in BBW/R diabetic rats. *Am J Physiol* 259:E881-E889
70. Kasson BG, Hsueh AJ 1987 Insulin-like growth factor-I augments gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Mol Cell Biol* 52:27-34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN