



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO EN CIENCIAS**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE Y DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE EN LOS DIFERENTES ESTADIOS
PUBERALES DE VARONES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Tesis

que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Médicas
presenta:

ELISA NISHIMURA MEGURO

Tutora

Dra. Daniela Nora Soderlund Seoane

México D.F.

Mayo del 2006



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.

INDICE

Resumen		3
Antecedentes		5
Justificación	Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptorial.	15
Objetivo e hipótesis	NOMBRE: <u>Elisa Nishimura</u> <u>Mejora</u>	16
Sujetos de estudio	FECHA: <u>29/05/2006</u> FIRMA: <u>[Firma]</u>	17
Métodos		19
●	Determinación de la HbA1c	
●	Inmunofluorometría de testosterona	
●	Radioinmunoensayo de LH, FSH y AMPc	
●	Bioensayo <i>in vitro</i> de LH y FSH	
●	Actividad Biológica de LH y FSH	
Resultados		26
Discusión		39
Conclusiones		48
Bibliografía		49

PALABRAS CLAVE

- DM1:** Diabetes mellitus tipo 1
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
LH: Hormona luteinizante
FSH: Hormona estimulante del folículo
B/I: Cociente bioactividad/inmunorreactividad: actividad biológica
RIA: Radioinmunoensayo
IFMA: Ensayo inmunofluorométrico

RESUMEN

En sujetos con Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1), se presentan alteraciones metabólico-hormonales que podrían afectar al eje hipotálamo-hipófisis-gónada y la funcionalidad de las gonadotropinas. No se cuenta con estudios sobre la actividad biológica de la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) en los adolescentes con DM1, que puedan explicar las diferencias reportadas en el crecimiento y desarrollo de algunos sujetos con esta enfermedad.

OBJETIVO. Comparar la actividad biológica (B/I) *in vitro* de la LH y la FSH en los diferentes estadios puberales de varones con DM1 y en varones sanos.

MATERIAL Y METODOS. Se estudiaron 3 grupos: DM1 controlada (DM1C, HbA1C < 8%), DM1 descontrolada (DM1D, HbA1C > 10%) y controles sanos (CS). Cada uno incluyó siete sujetos en los diferentes estadios puberales de Tanner (T1 a T5). Se obtuvo la B/I de LH y FSH, a partir del AMPc generado por células HEK-293 transfectadas con ADNc del receptor de LH o FSH de rata y la concentración circulante de las gonadotropinas por RIA. El análisis estadístico se realizó con las pruebas de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney.

RESULTADOS. La concentración de LH incrementó del estadio 1 al estadio 2 de Tanner en las tres condiciones clínicas, con mínimos cambios en estadios subsecuentes. Para la FSH, el incremento sólo se observó entre el Tanner 1 y el Tanner 2 del grupo con DM1C. En cada estadio puberal, la concentración de LH fue similar entre sujetos con DM1 y CS; para la FSH, la concentración circulante sólo difirió entre los controles sanos y el grupo con DM1C en el T2. La B/I de ambas gonadotropinas, incrementó entre el T1 y el T2 y T3, retornando posteriormente a niveles similares al T1. Al comparar las tres condiciones clínicas en cada estadio puberal, se observó que en el T2, los sujetos con DM1D presentaron una B/I de LH menor que los CS, lo que se acompañó de mayores niveles de testosterona; la diferencia en la B/I se acentuó en el estadio T3. A diferencia de la LH, la actividad biológica de la

FSH no se vio afectada por la condición clínica. El volumen testicular fue similar en un mismo estadio puberal excepto para los varones prepúberes con DM1, que tuvieron un volumen significativamente menor que los CS.

CONCLUSIONES. 1.- En las tres condiciones clínicas, la B/I de la LH y FSH aumenta entre el T1 y el T2 y T3, posteriormente tiende a regresar a niveles similares al estado prepuberal. 2.- La actividad biológica de la LH en los estadios puberales 2 y 3, fue menor en los sujetos con DM1 descontrolada comparada con los sujetos sanos. La actividad biológica de la FSH no se vio afectada por la condición clínica.

ANTECEDENTES

La pubertad se define como la etapa de transición de la niñez a la vida adulta. Esta etapa es una fase más del desarrollo gonadal, durante la cual la producción de hormonas sexuales aumenta progresivamente, se desarrollan las características sexuales secundarias y se alcanza la capacidad de fertilidad. Durante la pubertad, se acelera la velocidad de crecimiento y se adquiere más del 50% de la masa ósea del adulto. La edad de inicio y la progresión dependen de factores genéticos, constitucionales y medio-ambientales ^{1,2}. En condiciones normales, la pubertad en el varón inicia después de los 9 años de edad (media 11.5 años, con límites entre los 9 y 14 años) ^{3,4}. La maduración sexual en los varones comprende el desarrollo testicular, el peneano y la aparición del vello púbico ⁵. Las diferentes etapas puberales descritas y agrupadas por Marshall y Tanner ^{6,7} constituyen en la actualidad la clasificación de pubertad más aceptada internacionalmente. Con base en estas características, la pubertad del varón se divide en cinco estadios de desarrollo que transcurren en un periodo promedio de 4 años y que van desde el estadio 1 (prepuberal) hasta el estadio 5 que corresponde al adulto normal. La pubertad es un proceso dinámico, en el cual los cambios físicos que caracterizan a las diferentes etapas transcurren en un periodo de 6 a 9 meses entre cada una de ellas.

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) se reactiva durante esta etapa de la vida, después haber permanecido en una pausa fisiológica relativa durante la infancia ^{8,9}. El proceso que durante la pubertad caracteriza el

reinicio de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo preóptico, no ha sido dilucidado con precisión y se han propuesto cambios en las concentraciones de neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico¹⁰, así como en factores gliales y/o en las señales metabólicas de algunas sustancias como la leptina^{11,12}.

Existen dos mecanismos que podrían explicar de manera satisfactoria la inhibición funcional de la unidad hipotálamo-hipofisiaria durante la niñez o prepubertad. El primero de ellos depende de la alta sensibilidad a los esteroides gonadales del sistema hipotalámico generador de pulsos de la GnRH, por lo que las bajas concentraciones características del periodo posnatal, la infancia temprana y la prepubertad son suficientes para inhibir o disminuir el nivel de actividad. El segundo mecanismo es denominado mecanismo inhibitorio intrínseco del sistema nervioso central. Aún cuando el o los componentes responsables del mecanismo de inhibición central se desconocen, es posible que estén involucrados factores de naturaleza peptídica (opioides, hormona liberadora de corticotropina), así como algunos neurotransmisores y neuromoduladores (catecolaminas, γ -aminobutirato, serotonina, glutamato, aspartato, etc.). Con base en lo anterior, el inicio de la pubertad se presenta cuando el mecanismo central disminuye su actividad inhibitoria y se reduce la elevada sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales¹³.

La reactivación del eje H-H-G se caracteriza en un inicio por un marcado incremento de predominio nocturno en la amplitud de los pulsos de

la hormona luteinizante (LH) con pocos cambios en la frecuencia de los mismos ^{14,15}, lo que estimula la secreción de esteroides sexuales y de inhibina por parte de las gónadas. Conforme el proceso puberal progresa, la secreción de gonadotropinas se presenta a lo largo de todo el día, pero el patrón de pulsatilidad difiere en ambos sexos ^{16,17}.

Los trabajos tanto de Schally *et al* ¹⁸ como de Matsuo *et al* ¹⁹, confirmaron que un decapeptido (GnRH), es el responsable de la estimulación del gonadotropo. La acción ejercida por la GnRH se inicia con la unión a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática. La GnRH secretada en forma pulsátil activa a su receptor al estimular a las proteínas G heterotriméricas, lo que induce tanto la síntesis como la liberación de la LH y la hormona estimulante del folículo (FSH) por la hipófisis anterior ²⁰. La síntesis y liberación de las gonadotropinas, depende del ambiente endocrino y metabólico generado por las condiciones clínicas o fisiológicas; se ha demostrado que los pulsos rápidos característicos de las frecuencias altas de GnRH favorecen la síntesis y secreción de LH, mientras que los pulsos lentos que caracterizan a las frecuencias bajas favorecen la secreción de FSH ^{21,22}.

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la tirotropina, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades denominadas subunidad alfa y subunidad beta, unidas por fuerzas no covalentes. La subunidad alfa es idéntica entre estas glicoproteínas y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos ²³, mientras que la beta les confiere su especificidad biológica ²⁴. La actividad biológica de las gonadotropinas depende de las características

de los oligosacáridos de las subunidades alfa y beta, por la acción de enzimas en el aparato de Golgi reguladas por la pulsatilidad de la GnRH²⁵. La distribución de los oligosacáridos determina el punto isoeléctrico, la vida media, la afinidad con su receptor así como su capacidad de transducción de señal; la bioactividad de las gonadotropinas sólo se presenta si ambas subunidades se encuentran unidas^{26,27}.

Las gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas al estimular la síntesis de esteroides sexuales y la maduración de los gametos²⁸. En el varón, la LH induce la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona^{29,30}; en la mujer, la LH estimula la esteroidogénesis ovárica en las células de la teca³¹. En los testículos, el sitio primario de acción de la FSH es la célula de Sertoli en el epitelio de los túbulos seminíferos en donde estimula la síntesis de la inhibina, la activina y la proteína fijadora de andrógenos³², así como la espermatogénesis. En el ovario, la acción de la FSH en las células de la granulosa estimula el desarrollo folicular y al complejo enzimático de las aromatasas que convierten a los andrógenos en estrógenos.

El receptor de cada una de las gonadotropinas (Figura 1) es una glicoproteína que se localiza en la membrana celular y consiste en una cadena única de aminoácidos distribuida en un dominio extracelular, siete regiones transmembrana unidas entre sí por asas intra y extracelulares y un dominio intracelular^{33,34,35}. Este último se asocia con la activación de proteínas transductoras de señal que unen nucleótidos de guanina (proteínas G)³⁶. El complejo de proteínas G contiene una subunidad estimuladora cuya

activación conduce al incremento en la acción de la enzima adenil ciclasa, lo que induce la producción de adenosina 3',5' monofosfato cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc es el principal segundo mensajero a través del cual la LH o la FSH activan a la kinasa A, lo que desencadena la fosforilación y activación de proteínas intracelulares, que finalizan con uno o más efectos biológicos específicos para cada una de las gonadotropinas. Los esteroides secretados por las gónadas^{37,38,39}, así como otras hormonas gonadales como la inhibina⁴⁰, la activina⁴¹ y la folistatina⁴², se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de las gonadotropinas, por lo que la disfunción gonadal primaria altera directamente la cantidad y calidad de las gonadotropinas secretadas y por tanto su bioactividad. Otros factores que intervienen en la síntesis y secreción de las gonadotropinas a nivel central incluyen a la prolactina, la cual inhibe la secreción de GnRH^{43,44}, a las gonadotropinas, que modulan la secreción de GnRH por el hipotálamo (asa corta de retroalimentación) y a la misma GnRH que puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación)⁴⁵.

En sujetos sanos, tanto las concentraciones de la LH inmunorreactiva, determinada por radioinmunoensayo (RIA), como la actividad biológica de la misma se incrementan gradualmente durante los diferentes estadios puberales, en forma más evidente en los estadios iniciales^{46,47,48}. En la pubertad, la medición única de las gonadotropinas en el suero no permite precisar el estadio puberal, debido a que la pulsatilidad puede hacer variar las concentraciones circulantes de la LH y la FSH⁴⁹, además de que en mujeres, a la pulsatilidad cotidiana se imponen cambios en los niveles de

gonadotropinas de acuerdo a la fase del ciclo menstrual⁵⁰. Dada la naturaleza dinámica del proceso de desarrollo puberal, el haber alcanzado un determinado grado de desarrollo, producto de la actividad hormonal previa, no provee certeza de la bioactividad de LH y FSH en ese momento. Debido a esto, la determinación de la actividad biológica de las gonadotropinas, que depende de la mezcla de isoformas circulantes, parece proporcionar mayor información sobre el estado funcional presente que la valoración clínica o la medición de la inmunorreactividad⁵¹. Asimismo, la bioactividad no presenta un comportamiento pulsátil y en los varones, no sufre variaciones como en el caso de las mujeres durante las fases del ciclo menstrual. La determinación de los niveles circulantes de gonadotropinas por métodos más sensibles y costosos como la inmunofluorimetría (IFMA), parecen relacionarse bien con la actividad biológica determinada por bioensayos^{52,53}, pero en condiciones de enfermedad, la bioactividad hormonal podría verse afectada en forma diferente de acuerdo al estadio puberal y la sola determinación de su concentración por IFMA puede ser insuficiente. Existen varios ensayos para estudiar la actividad biológica de las gonadotropinas, de los cuales los homólogos para la especie humana, basados en receptores clonados, no requieren cultivos celulares primarios, son más fáciles de implementar y menos sensibles a interferencia por otras sustancias en el suero⁵⁴.

La condición aguda o crónica de una enfermedad, se acompaña de respuestas neuroendocrinas diversas⁵⁵. El crecimiento y desarrollo puede verse afectado⁵⁶ y, específicamente en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, se presentan modificaciones de la pulsatilidad en el patrón secretorio de GnRH y

gonadotropinas, que pueden o no reflejarse en las concentraciones circulantes de estas hormonas y acompañarse de cambios en la actividad biológica.

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia como consecuencia de una deficiencia absoluta de insulina, en la mayoría de los casos por la destrucción autoinmune de las células β de los islotes pancreáticos^{57,58}. Debido a que la DM1 predomina en niños y adultos jóvenes, además de las complicaciones crónicas condicionadas por el descontrol glucémico^{59, 60, 61} se pueden presentar alteraciones en el crecimiento y desarrollo como el retraso puberal^{62,63}, deterioro en la talla final adulta^{64, 65}, mayor frecuencia de alteraciones menstruales^{66, 67} y osteopenia⁶⁸. Lo anterior podría explicarse debido a que en el descontrol crónico, además de las variaciones en los niveles de glucosa circulante, se presentan en forma intermitente múltiples procesos fisiopatológicos como la hipoinsulinemia, la desnutrición⁶⁹, la acidosis metabólica y el incremento en la producción de glucocorticoides debido al estrés hipoglucémico⁷⁰. Por otro lado, a pesar de que el control glucémico no es el óptimo en la mayoría de los adolescentes y de que se han observado diferencias significativas en diversos parámetros del desarrollo puberal, no necesariamente se observan alteraciones en el inicio de la pubertad y la talla final adulta y muchos niños con DM1 crecen y se desarrollan normalmente.

Diversos estudios apoyan la presencia de mecanismos que regulan la secreción de la LH a nivel central y que responden a la insulina o a cambios metabólicos dependientes de ella. En el humano, el núcleo arcuato del

hipotálamo contiene receptores tanto para insulina como para glucosa ⁷¹. En corderos diabéticos se demostró que la pulsatilidad de la LH permanece indemne si se ajusta el control glucémico con un esquema adecuado de insulina exógena, en tanto que la suspensión de la administración de la misma disminuye la pulsatilidad de esta hormona ⁷². De igual manera, en ovejas diabéticas se ha observado que la suplementación con insulina incrementa la secreción pulsátil de LH probablemente por medio de la regulación de la pulsatilidad de la GnRH ⁷³. En ratas con diabetes inducida por estreptozotocina se ha comprobado una disminución en las concentraciones en suero de ambas gonadotropinas hipofisarias, las cuales se pueden normalizar mediante el tratamiento con insulina ⁷⁴. Por otro lado, la instilación de insulina en el sistema nervioso central de ratas hembras con diabetes restituye la producción de la LH a niveles control sin cambios aparentes en el número y en la activación de las neuronas de GnRH ⁷⁵. Por lo tanto, en condiciones de DM1 descontrolada, los cambios podrían estar tanto a nivel de las características de la secreción de la GnRH como en la respuesta a la misma.

Aunque la heterogeneidad de la LH y FSH circulantes está plenamente documentada, existen pocos estudios sobre la actividad biológica resultante en diferentes condiciones clínicas, datos que ampliarían el conocimiento sobre el papel de las isoformas de las gonadotropinas. En padecimientos crónicos sistémicos que se pueden acompañar de retraso puberal, como en la beta talasemia, se ha reportado que con la administración pulsátil de GnRH los niveles de gonadotropinas circulantes no difieren de lo evidenciado en condiciones basales, pero la bioactividad se modifica ⁷⁶. Un predominio de

isoformas básicas con decremento en la relación bio/inmunorreactividad de las gonadotropinas también se ha reportado en la obesidad severa ⁷⁷. Por lo anterior, los diferentes hallazgos en la pubertad de los sujetos con DM1 podrían explicarse por cambios en la actividad biológica de las gonadotropinas, debido a diferencias en las formas moleculares de las gonadotropinas circulantes, en respuesta a las señales metabólicas alteradas que pueden presentarse en estos sujetos en forma intermitente.

Hasta el momento, sólo se ha reportado un estudio sobre la actividad biológica de las gonadotropinas en sujetos diabéticos en respuesta a variaciones en el control glucémico. En dicho estudio se reporta que para la LH, la secreción integrada fue menor y la actividad biológica fue mayor en 11 adultos varones con DM1 de corto tiempo de evolución y HbA1c >10 %, comparado con sujetos con diabetes bien controlada y sujetos sanos ⁷⁸. El incremento en la bioactividad de la LH por unidad circulante de esta hormona podría interpretarse como un mecanismo de compensación ante situaciones adversas.

En adolescentes con DM1, no se conoce el comportamiento de la actividad biológica de LH y FSH en relación al grado de control glucémico ni durante las diferentes fases del desarrollo puberal, como probable factor que explique las diferencias funcionales del eje hipotálamo-hipófisis-gónada que se han evidenciado tanto en modelos de experimentación ⁷⁹ como en los estudios clínicos de sujetos con DM1 ⁸⁰.

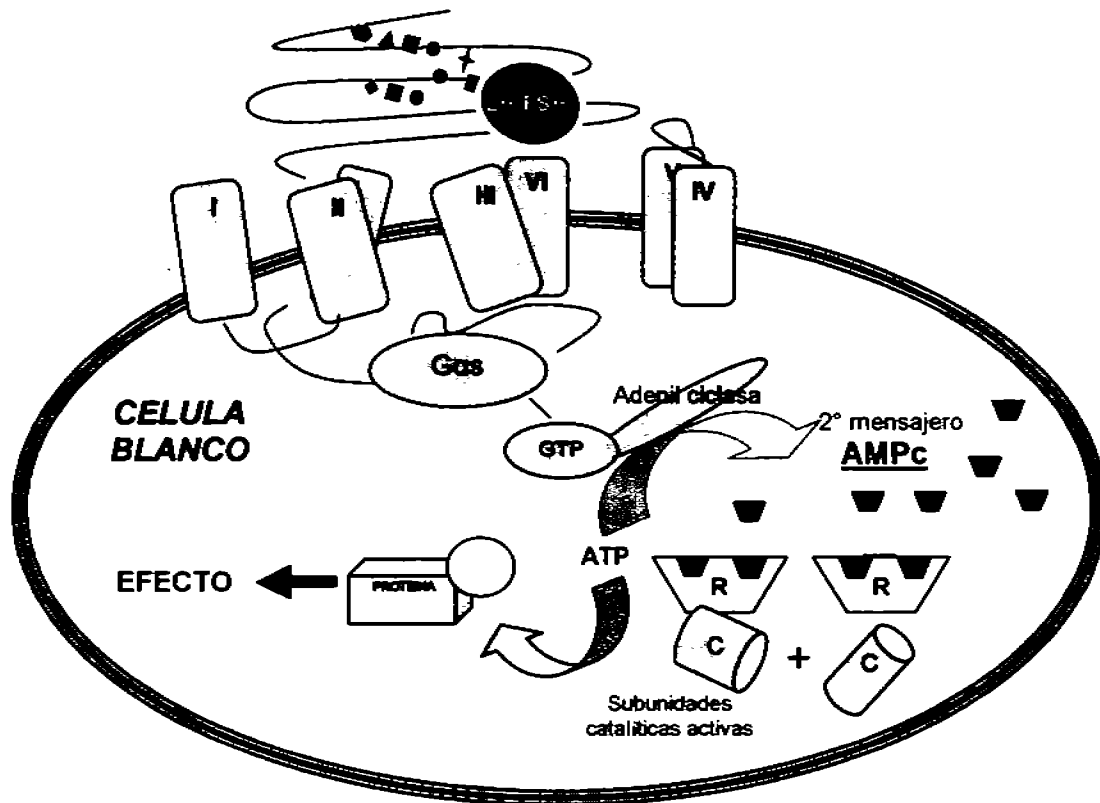


FIGURA 1. INTERACCION DE LA MOLECULA DE LH O FSH CON SU RECEPTOR ESPECIFICO. El receptor de gonadotropinas consta de siete dominios transmembrana y actúa a través de la activación de la subunidad alfa estimuladora del complejo heterotrimerico, lo que activa a la enzima adenil ciclasa y genera el AMPc como el segundo mensajero. En presencia del receptor específico, la generación de AMPc es reflejo de la actividad biológica de las gonadotropinas circulantes.

JUSTIFICACION

La pubertad es el periodo durante el cual se desarrollan las características sexuales secundarias y se alcanza la capacidad de fertilidad. El eje hipotálamo-hipófisis-gónada que regula su desarrollo, responde a una multitud de factores internos y externos, incluyendo señales metabólicas tanto en estado de salud como de enfermedad.

Aunque en nuestro país la incidencia de esta enfermedad es relativamente baja ⁸¹, se calcula que existen más de 20,000 sujetos con DM1 y esta enfermedad es uno de los principales motivos de consulta en los servicios de referencia de endocrinología pediátrica. En los sujetos con descontrol de esta enfermedad se presentan de manera intermitente diferentes condiciones que podrían afectar potencialmente la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Solamente se ha reportado un estudio en adultos sobre la actividad biológica de las gonadotropinas hipofisarias en la DM1 pero no se cuenta con información sobre la misma en los diferentes estadios puberales, que pudiese explicar las diferencias reportadas en el desarrollo puberal.

Este estudio permite ampliar el conocimiento sobre la influencia de una enfermedad crónica y sistémica como la DM1 sobre la actividad biológica de las gonadotropinas, así como sobre la contribución del grado de control metabólico en la activación y adecuado funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante el proceso puberal, al comparar dicha actividad biológica en grupos con diferentes niveles de control glucémico.

OBJETIVO

Comparar la actividad biológica *in vitro* de la hormona luteinizante y de la hormona estimulante del folículo en varones con diabetes mellitus tipo 1 con adecuado e inadecuado control glucémico y en varones sanos, en los diferentes estadios puberales.

HIPOTESIS

La actividad biológica *in vitro* de la hormona luteinizante y de la hormona estimulante del folículo en varones con diabetes mellitus tipo 1 con inadecuado control glucémico es diferente que en los sujetos con diabetes mellitus tipo 1 con adecuado control glucémico y en sujetos sanos, en todos los estadios puberales.

SUJETOS

Los participantes se seleccionaron de acuerdo a tres condiciones clínicas: DM1 con adecuado control glucémico (HbA1c < 8%), DM1 con inadecuado control glucémico (HbA1c ≥10%) y varones aparentemente sanos. En cada condición clínica, se incluyeron 7 sujetos en cada uno de los estadios puberales (estadios 1 a 5) clasificados de acuerdo con lo propuesto por Marshall y Tanner, tomando como parámetro de referencia primordial el volumen gonadal, calculado mediante la fórmula: volumen = $\pi/6$ (diámetro mayor x diámetro menor²). Las mediciones se llevaron a cabo el mismo día por dos observadores independientes, utilizando el mismo elemento de medición. Solamente se incluyeron aquellos pacientes en los cuales hubo concordancia entre ambas gónadas y en la asignación del estadio puberal por los dos observadores. Asimismo, se aplicó la prueba de Rosen⁸² en los sujetos en Tanner 1 en quienes el interrogatorio intencionado sugirió disfunción olfatoria, para descartar la posibilidad de hipogonadismo hipogonadotrópico por síndrome de Kallmann.

Para realizar el estudio, se obtuvo aprobación del Comité de Ética e Investigación Institucional del Hospital de Pediatría, CM SXXI (No. de registro 2001/718/015), así como el consentimiento informado de los padres y de los niños participantes. Posterior a la asignación del estadio puberal, se extrajo una muestra única de 7 mL de sangre de una vena periférica, en la misma ocasión en la cual se realizó la toma de muestra para hemoglobina

glucosilada que se solicita para seguimiento del paciente con DM1. La muestra se tomó a las 8:00 h en ayunas, utilizándose 3 mL para cuantificar LH, FSH y testosterona y 4 mL para determinar la actividad biológica de la LH y de la FSH. El suero obtenido de cada una de las muestras se distribuyó en 4 alícuotas que se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

Los criterios para su participación incluyeron la edad de 8 a 20 años, excepto el grupo de controles sanos que fue hasta de 25 años de edad y el IMC <27, así como la ausencia de otra enfermedad que condicione alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, de anosmia o hiposmia y de ingesta de medicamentos en la semana previa al estudio. En los sujetos con DM1, los participantes no debían tener complicaciones crónicas relacionadas con su enfermedad documentadas en el expediente clínico.

METODOS

Hemoglobina glucosilada A1c

Para la determinación de la HbA_{1c} las muestras se colectaron en tubos con EDTA y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento, dentro de los 5 días siguientes. Los resultados se analizaron en un sistema automatizado de intercambio iónico por cromatografía líquida de alta resolución⁸³ (HPLC) (Bio-Rad).

Inmunofluoroanálisis de testosterona

La concentración circulante de testosterona se determinó con análisis inmunofluorométrico (IFMA) (Wallac 1420 Victor²™ D) de acuerdo con la metodología descrita por Lövgren *et al*⁸⁴ y Hemmiä *et al*⁸⁵. Este ensayo ha probado ser altamente sensible y específico, por lo que es de los mejores métodos para la valoración de las concentraciones hormonales circulantes. El ensayo se basa en la competencia por anticuerpos policlonales anti-testosterona unidos a su vez a un anticuerpo en fase sólida, testosterona marcada con europio y la testosterona de la muestra, por lo que la concentración de esta hormona es inversamente proporcional a la fluorescencia emitida.

Para disminuir las variaciones interanálisis, todas las muestras de un mismo estadio puberal, tanto de los sujetos con adecuado control glucémico como de aquellos con inadecuado control glucémico y de los sujetos control,

se analizaron en el mismo ensayo. Las variaciones interanálisis se determinaron utilizando las mismas muestras control en todos los ensayos.

Radioinmunoanálisis de LH y FSH

El radioinmunoensayo de LH se realizó utilizando LH-I-3 marcado con I^{125} como trazador (SA, 70-90 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ proteína), la preparación LER-907 como estándar y el anticuerpo LH 2. La sensibilidad del ensayo fue de 0.7 IU/L (1 mg LER-907 = 277 UI de la Segunda Preparación Internacional de Referencia de Gonadotropinas Humanas Menopáusicas (2nd IRP-HMG). Cada muestra se procesó por duplicado dentro de una misma corrida. Los coeficientes de variación intra e interensayo se determinaron por múltiples replicados ($n = 3/\text{dosis}$) de un pool obtenido de mujeres postmenopáusicas, probado a niveles que desplazaron I^{125} -LH del anticuerpo a 15-23%, 45-59% y 75-84%; estos coeficientes fueron de 4.1-6.2% y 6.1-11.3% respectivamente. El procedimiento del RIA consistió en agregar 100 μL de amortiguador PBS-Gel, 100 μL de la muestra problema o de la dosis de la curva estándar, 100 μL de hLH- I^{125} (15,000 cpm), 100 μL de anti-hLH a una dilución de trabajo final 1:800,000 preparado con PBS 0.05M, EDTA 0.05M (PBS EDTA) y suero normal de conejo al 1%. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas. Posteriormente se añadió a cada tubo 200 μL del segundo anticuerpo y se incubaron por 24 horas más a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 2 mL de agua bidestilada fría y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y se determinó la

radioactividad unida al anticuerpo presente en los precipitados empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, EUA).

Para la cuantificación de FSH, se realizó una curva de calibración utilizando como estándar de FSH la preparación LER-907 del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK) a concentraciones de 2.6 a 666.6 ng de FSH inmunorreactiva diluida en PBS 0.05 M y gelatina al 0.1% (PBS-Gel). El anticuerpo utilizado fue el anticuerpo policlonal anti-hFSH-6 y como trazador se utilizó el estándar hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcado con Na^{125} (Amersham Internacional Limites, Reino Unido) por el método de la Cloramina T⁸⁶. El procedimiento del RIA fue similar al de LH, con una dilución final 1:200,000. Los resultados fueron expresados en UI/L en relación a la segunda preparación de referencia internacional de FSH (1 mg LER-907 = 53 UI FSH de la 2° IRP-HMG).

Todas las muestras de un mismo estadio puberal se analizaron en el mismo ensayo y se utilizaron los mismos controles de calidad para analizar las variaciones interanálisis.

Bioensayo *in vitro* de LH y FSH

Los ensayos biológicos *in vitro* para valorar la actividad biológica de las gonadotropinas pueden llevarse a cabo en tejidos endocrinos, cultivos primarios de células dispersas o en líneas celulares permanentes. Debido a que un gran número de sustancias pueden potenciar o inhibir la respuesta en un bioensayo, se debe elegir al ensayo más específico para cada caso. Uno de los bioensayos más sensibles y específicos para LH es el desarrollado por

Jia *et al*⁸⁷, en el cual se utilizan líneas celulares transfectadas con el receptor recombinante de LH, las cuales tienen una estabilidad del cultivo por mayor tiempo, responden de una manera dosis dependiente a la LH, permiten que el bioensayo tenga especificidad de especie, no requieren de un cultivo primario y puede ser completado en 24 horas posterior a la adición de la hormona.

La actividad biológica *in vitro* de la hormona luteinizante se determinó mediante el empleo del bioensayo que cuantifica el AMPc en células humanas renales fetales HEK-293, transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para LH de rata⁸⁸. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Life Technologies, Gaithersburg, MD), pH 7.3, complementado con 5% de suero fetal de ternera (Gibco, BRL), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA), 100 mg/mL de geneticina (Life Technologies), 50 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (Sigma) y crecieron en cajas de 162 cm² (Costa, Cambridge, MA, EUA). Las células confluentes se rasparon y se sembraron en cajas de 24 pozos de 16 mm (Gibco, BRL) por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ (5 x 10⁴ células/pozo de cultivo). Posteriormente, las células se lavaron y se expusieron por duplicado a diferentes dosis del estándar utilizado (LER-907) o de las muestras de cada paciente en presencia de 0.125 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma) disuelto en 450 µL de DMEM complementado por 24 horas a 37°C. Previo a la exposición de las células, cada muestra se inactivó por calentamiento durante 10 minutos a 56°C. Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de

evitar el efecto inhibitor no específico sobre la formación de AMPc de factores presentes en el suero; con este tratamiento no se altera la inmunorreactividad ni la bioactividad de las gonadotropinas^{89, 90}.

En el pozo correspondiente se agregaron por duplicado 300 μ L de medio y 12.5, 25, 50 y 75 μ L de cada una de las muestras en estudio, las cuales se diluyeron con medio con inmunorreactividad y bioactividad de gonadotropinas no detectable. El medio y las células se extrajeron después de 24 horas de incubación a 37°C en un incubador húmedo con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. El producto se calentó a 95°C por 3 minutos y posteriormente se almacenó a -20°C, hasta el momento de la cuantificación de su contenido de AMPc total por RIA. Todas las muestras de un mismo sujeto se estudiaron por duplicado.

Para la determinación de la actividad biológica de FSH, se repitió el procedimiento anterior, utilizando células HEK-293 transfectadas con el ADNc del receptor de FSH.

Radioinmunoanálisis del AMPc de los bioensayos de LH y FSH

Los especímenes procedentes de los bioensayos tanto de LH como de FSH se analizaron en su contenido de AMPc total (intra y extracelular) por RIA. El RIA se llevó a cabo utilizando como estándar el AMPc (81c-0220) (Sigma). El anticuerpo empleado fue el AMPc CV-27 del National Hormone & Peptide Program (NHPP) del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) (Harbor-UCLA Medical Center, Torrance,

California E.U.A.) a una dilución final de 1:50,000 con acetato de sodio 50 mM, albúmina sérica bovina 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 I¹²⁵ (Amersham International Limite, Reino Unido) por el método de Cloramina T⁸⁶.

Para incrementar la sensibilidad del ensayo, todas las muestras se acetilaron junto con los estándares, agregándoseles 25 µL de trietilamina y anhídrido acético en una proporción 2:1 v/v, diluyéndose en acetato de sodio 5 mM, pH 4.7. Posteriormente, el ensayo fue incubado a 4° C durante 24 horas, la reacción se detuvo con 3 mL de etanol frío y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Por último, se decantó el sobrenadante y a partir de los inmunoprecipitados se determinó la radioactividad unida al anticuerpo empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, II, EUA).

Actividad biológica de las gonadotropinas

La actividad biológica se calculó por interpolación. Los datos expresan la relación de la actividad *in vitro* en el bioensayo relativa a las concentraciones del inmunoensayo, como el cociente entre los valores calculados de la hormona bioactiva en base a la producción total de AMPc y la inmunorreactividad determinada por radioinmunoensayo de la hormona correspondiente (bioactividad/inmunorreactividad B/I). Se utilizó un ensayo en línea paralelo, donde todas las muestras se analizaron en diferentes dosis

y se calculó la potencia de al menos dos puntos que al unirse en línea recta exhiben paralelismo con la curva estándar.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los niveles de testosterona determinada por IFMA y de LH y FSH determinadas por RIA, así como para la bioactividad de la LH y la FSH entre las tres condiciones clínicas en cada uno de los estadios puberales. Se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para analizar diferencias entre pares de grupos. Valores con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Se formaron 3 grupos de estudio de acuerdo a la condición clínica: diabetes mellitus tipo 1 controlada, diabetes mellitus tipo 1 descontrolada o sujetos sanos. Cada uno de ellos incluyó siete sujetos en cada estadio puberal, excepto en el grupo de controles sanos en estadio 4 de Tanner, en el cual se eliminaron dos sujetos por muestra insuficiente. En el cuadro 1 se muestran las características de los sujetos estudiados. Como es de esperarse, en todos los estadios puberales el nivel de HbA1C fue diferente en cada condición clínica y permitió diferenciar claramente al grupo con DM1 bien controlada y el grupo con DM1 mal controlada. El volumen testicular fue similar en un mismo estadio puberal para las tres condiciones clínicas, excepto para el Tanner 1, donde los varones con diabetes mellitus tuvieron un volumen significativamente menor que los controles sanos (gráfica 1).

Niveles circulantes de Testosterona, LH y FSH

En el cuadro 2 se muestran los niveles circulantes de testosterona, hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo. En cada estadio puberal, la testosterona no mostró diferencia significativa entre las diferentes condiciones clínicas excepto en el Tanner 2 (gráfica 2), donde los sujetos con DM1 descontrolada tuvieron concentraciones significativamente mayores que el grupo con DM1 controlada y los sujetos sanos.

El promedio de las concentraciones circulantes de LH (gráfica 3) incrementó del estadio 1 al estadio 2 de Tanner en forma significativa en las

tres condiciones clínicas, con mínimos cambios en estadios subsecuentes. Para la hormona estimulante del folículo, el promedio no difirió significativamente entre los diferentes estadios puberales, excepto entre el Tanner 1 y 2 del grupo con DM1 controlada (gráfica 4). Al comparar las concentraciones circulantes de LH y FSH en las tres condiciones clínicas dentro de un mismo estadio puberal, no se encontraron diferencias entre los sujetos estudiados, excepto en el caso de la FSH en el estadio 2 de Tanner, donde los sujetos con DM1 controlada tuvieron concentraciones significativamente mayores que los controles sanos.

Actividad biológica de las gonadotropinas

La producción de AMPc total de las células transfectadas con el ADN complementario del receptor de rata de la hormona luteinizante o de la hormona estimulante del folículo en respuesta a la exposición al suero de los sujetos en estudio evidenció un incremento relacionado con las diferentes concentraciones de la LH o la FSH circulante que fue paralelo a la respuesta observada a la exposición al estándar (LER 907) (gráficas 5 y 6).

Hormona luteinizante. El análisis del cociente B/I de la LH mostró un incremento significativo entre el estadio 1 prepuberal y el estadio 2 y 3 de Tanner, independientemente de la condición clínica. En los estadios 4 y 5 de Tanner, la actividad biológica tendió a regresar a niveles similares a los observados en el Tanner 1 (cuadro 2 y gráfica 7). La comparación de las tres condiciones clínicas en cada estadio puberal, mostró que en el estadio 2 la actividad biológica de LH en sujetos con diabetes mellitus descontrolada fue

significativamente menor que en los controles sanos e incluso menor que en los sujetos con DMC en el estadio 3.

Hormona estimulante del folículo. Al igual que para el caso de la hormona luteinizante, la actividad biológica de la FSH en las diferentes condiciones clínicas incrementó del Tanner 1 al Tanner 2 y 3, sin embargo el incremento en los sujetos con DM fue menos evidente, sin alcanzar significancia estadística, y nuevamente en estadios 4 y 5 tendió a regresar a cocientes B/I similares al estadio 1. A diferencia de la LH, la actividad biológica de la FSH dentro de un mismo estadio de Tanner no se vio afectada por la condición clínica de diabético controlado, descontrolado o control sano (cuadro 2 y gráfica 8).

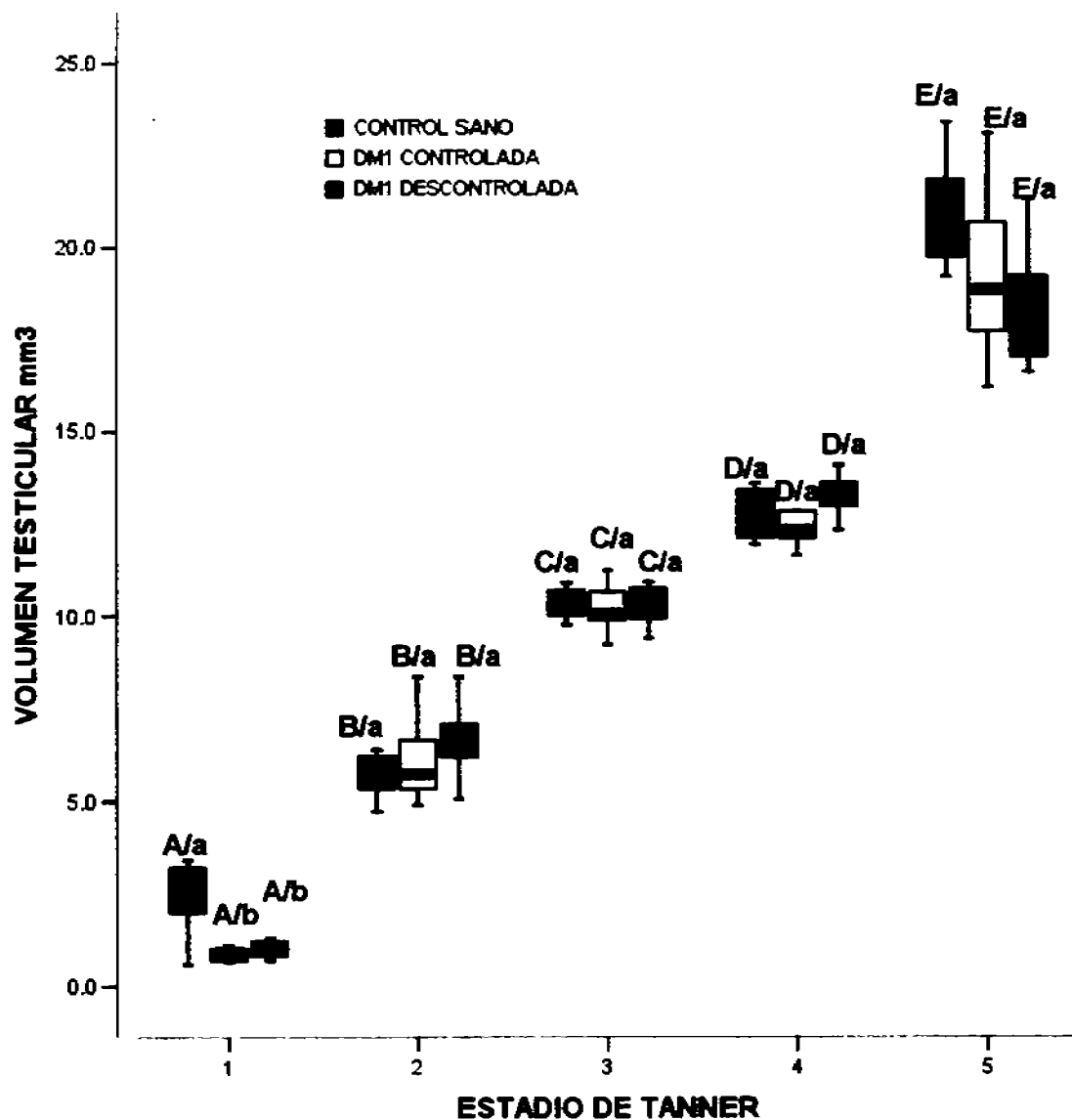
CUADRO 1. CARACTERISTICAS DE LOS VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y CONTROLES SANOS EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES (mdn ± Q). Letras discordantes en cada estadio puberal señalan diferencias significativas (p<0.05).

TANNER	CONDICION CLINICA (n)	EDAD Años	HbA1c %	EVOL Años	VOL. TEST mm ³	IMC Kg/m ²
1	CONTROL SANO (7)	10.7±1.1 ^a	5.1±0.3 ^a		3.0±0.6 ^a	18.1±2.6 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	8.8±1.1 ^a	6.6±0.9 ^b	4.0±2.5 ^a	0.9±0.1 ^b	16.7±1.2 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	10.7±1.1 ^a	11.2±0.3 ^c	4.9±1.8 ^a	1.1±0.2 ^b	17.6±2.3 ^a
2	CONTROL SANO (7)	12.3±0.6 ^a	5.4±0.3 ^a		6.0±0.6 ^a	19.2±1.5 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	13.3±1.1 ^a	7.5±0.8 ^b	2.4±2.3 ^a	5.7±1.0 ^a	20.9±1.4 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	14.7±0.3 ^b	13.0±1.8 ^c	8.2±3.5 ^a	6.7±0.7 ^a	19.6±1.1 ^a
3	CONTROL SANO (7)	14.5±0.9 ^a	5.7±0.4 ^a		10.2±0.4 ^a	20.2±0.9 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	13.9±1.8 ^a	7.6±0.6 ^b	1.1±4.5 ^a	10.0±0.6 ^a	18.7±1.4 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	15.7±1.4 ^a	10.9±2.4 ^c	11.2±3.1 ^b	10.3±0.6 ^a	20.0±1.8 ^a
4	CONTROL SANO (5)	16.3±0.9 ^a	5.6±0.2 ^a		12.7±0.7 ^a	23.0±2.2 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	15.0±0.7 ^a	5.8±0.7 ^a	3.0±1.3 ^a	12.3±0.4 ^a	20.6±1.7 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	14.7±1.1 ^a	11.3±0.5 ^b	5.0±2.9 ^a	13.3±0.5 ^a	19.6±2.6 ^a
5	CONTROL SANO (7)	22.9±6.5 ^a	5.5±0.2 ^a		20.5±1.5 ^a	24.2±0.5 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	16.9±3.9 ^{a,b}	7.4±0.9 ^b	7.9±5.2 ^a	18.9±2.0 ^a	24.0±1.8 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	16.2±1.1 ^b	11.5±1.4 ^c	4.2±2.3 ^a	18.5±1.3 ^a	23.2±2.5 ^a

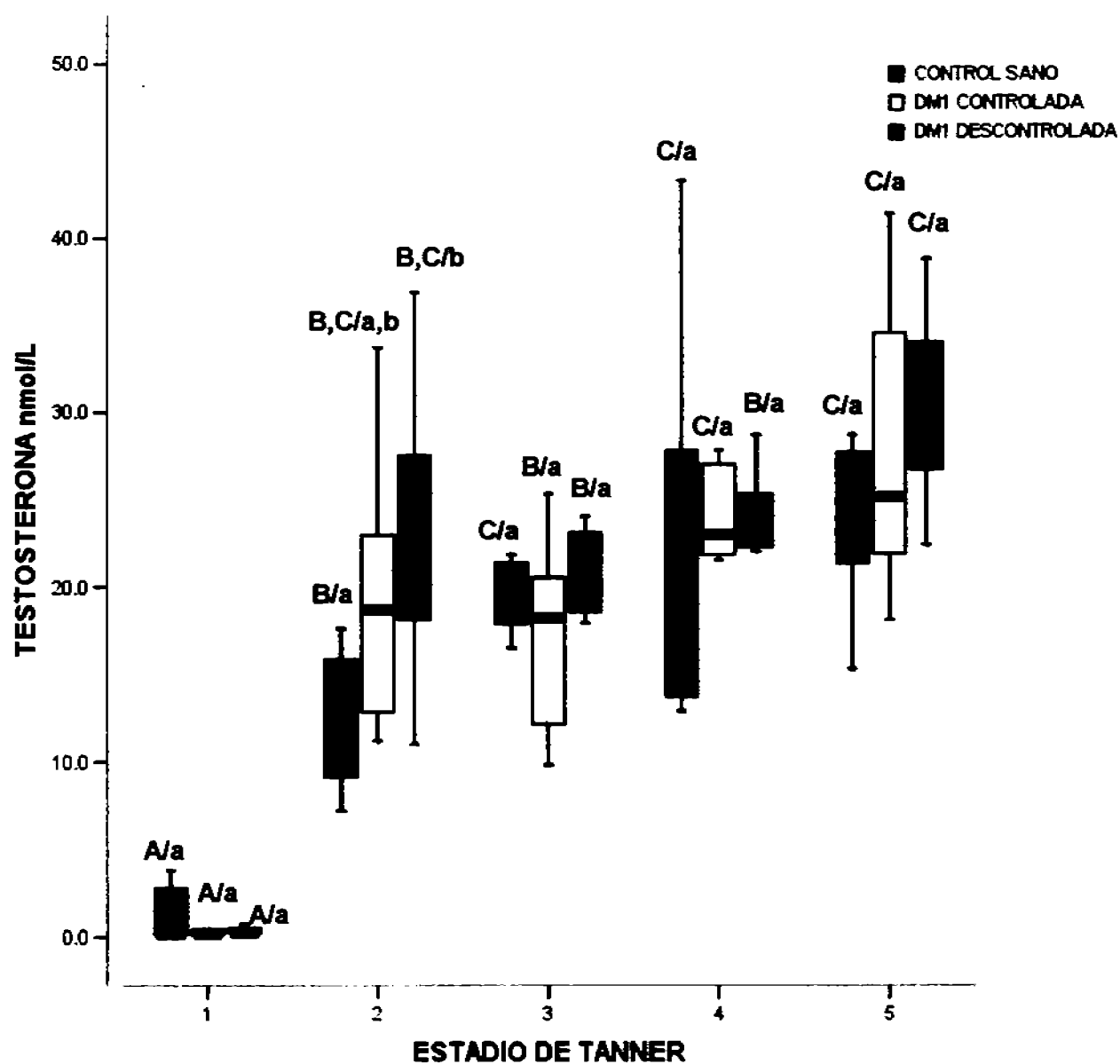
CUADRO 2. TESTOSTERONA, HORMONA LUTEINIZANTE, HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO Y COCIENTE BIOACTIVIDAD/INMUNORREACTIVIDAD (B/I) EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES (mdn± Q). Letras discordantes en cada estadio puberal señalan diferencias significativas (p<0.05).

TANNER	CONDICION CLINICA (n)	TESTOSTERONA nmol/L	LH UI/L	B/I LH	FSH UI/L	B/I FSH
1	CONTROL SANO (7)	0.17±1.7 ^a	7.5±1.7 ^a	0.46±0.2 ^a	2.3±1.3 ^a	0.11±0.1 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	0.16±0.1 ^a	7.2±0.4 ^a	0.36±0.1 ^a	1.8±1.1 ^a	0.24±0.1 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	0.24±0.2 ^a	5.7±1.8 ^a	0.44±0.1 ^a	2.7±1.5 ^a	0.13±0.0 ^a
2	CONTROL SANO (7)	13.1±4.8 ^a	11.2±2.5 ^a	2.1±0.6 ^a	4.4±0.8 ^a	0.28±0.1 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	18.7±5.5 ^{a,b}	11.7±2.8 ^a	1.7±0.1 ^{a,b}	8.6±3.9 ^b	0.20±0.1 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	25.7±6.4 ^b	10.2±3.7 ^a	1.2±0.3 ^b	4.9±2.3 ^{a,b}	0.38±0.3 ^a
3	CONTROL SANO (7)	20.7±2.6 ^a	11.8±3.9 ^a	2.1±0.7 ^a	4.5±1.1 ^a	0.73±0.4 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	18.2±4.7 ^a	9.0±0.7 ^a	1.9±0.9 ^a	3.8±0.7 ^a	0.63±0.4 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	20.4±3.0 ^a	13.0±5.1 ^a	1.1±0.3 ^b	3.7±0.7 ^a	0.72±0.1 ^a
4	CONTROL SANO (7)	19.3±1.1 ^a	10.4±9.0 ^a	1.1±0.8 ^a	5.8±1.7 ^a	0.49±0.2 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	23.0±2.8 ^a	9.2±1.6 ^a	0.5±0.9 ^a	4.7±2.2 ^a	0.28±0.2 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	24.0±2.2 ^a	9.9±9.3 ^a	0.87±0.2 ^a	2.9±2.2 ^a	0.32±0.0 ^a
5	CONTROL SANO (7)	26.4±5.6 ^a	12.5±2.3 ^a	0.68±0.1 ^a	4.0±1.0 ^a	0.41±0.1 ^a
	DM1 CONTROLADA (7)	25.1±7.7 ^a	12.1±6.5 ^a	0.78±0.1 ^a	4.1±2.2 ^a	0.72±0.4 ^a
	DM1 DESCONTROLADA (7)	29.3±5.3 ^a	12.5±3.3 ^a	0.65±0.1 ^a	4.8±0.8 ^a	0.42±0.2 ^a

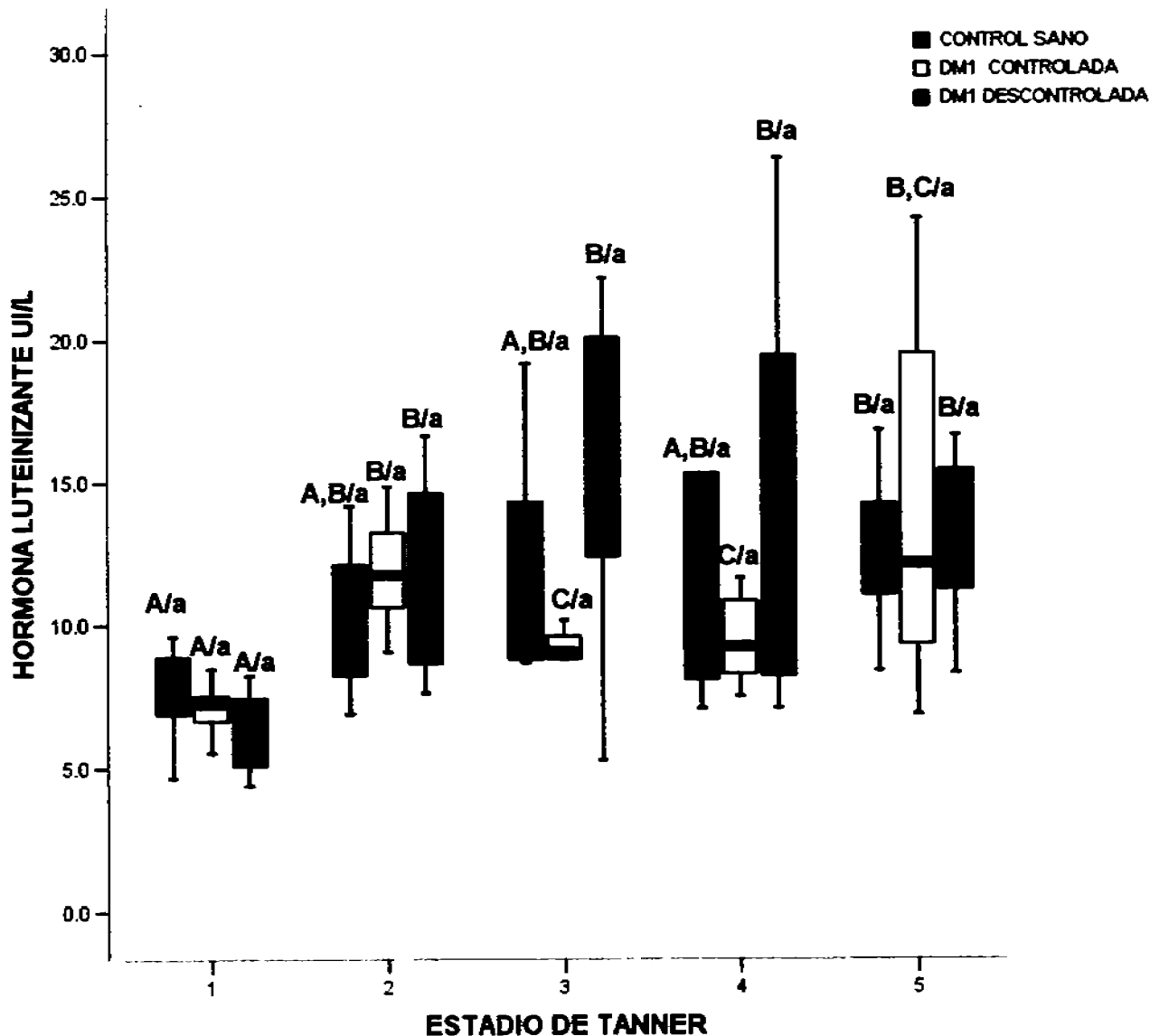
GRAFICA 1. VOLUMEN TESTICULAR EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



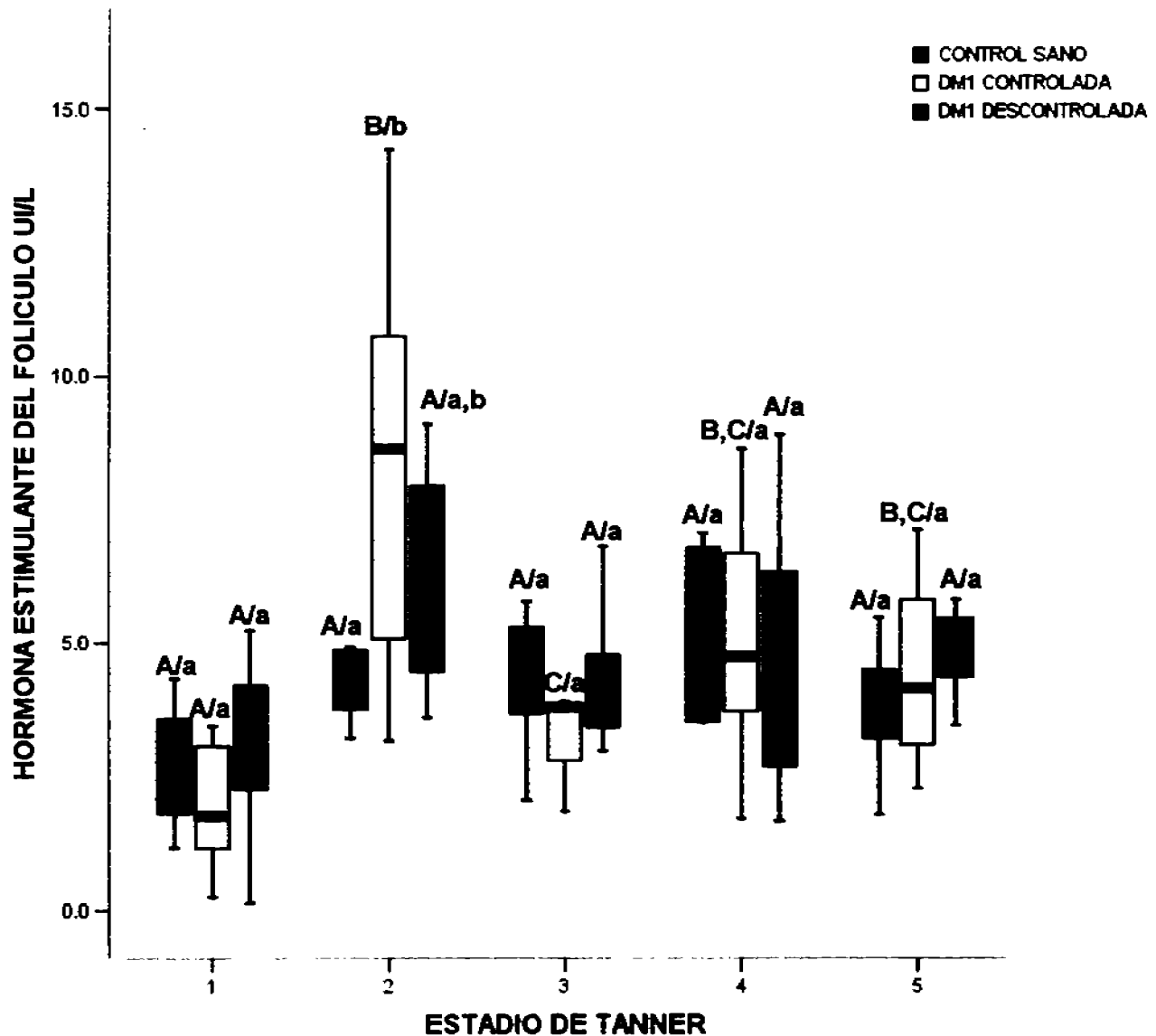
GRAFICA 2. CONCENTRACIONES DE TESTOSTERONA EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



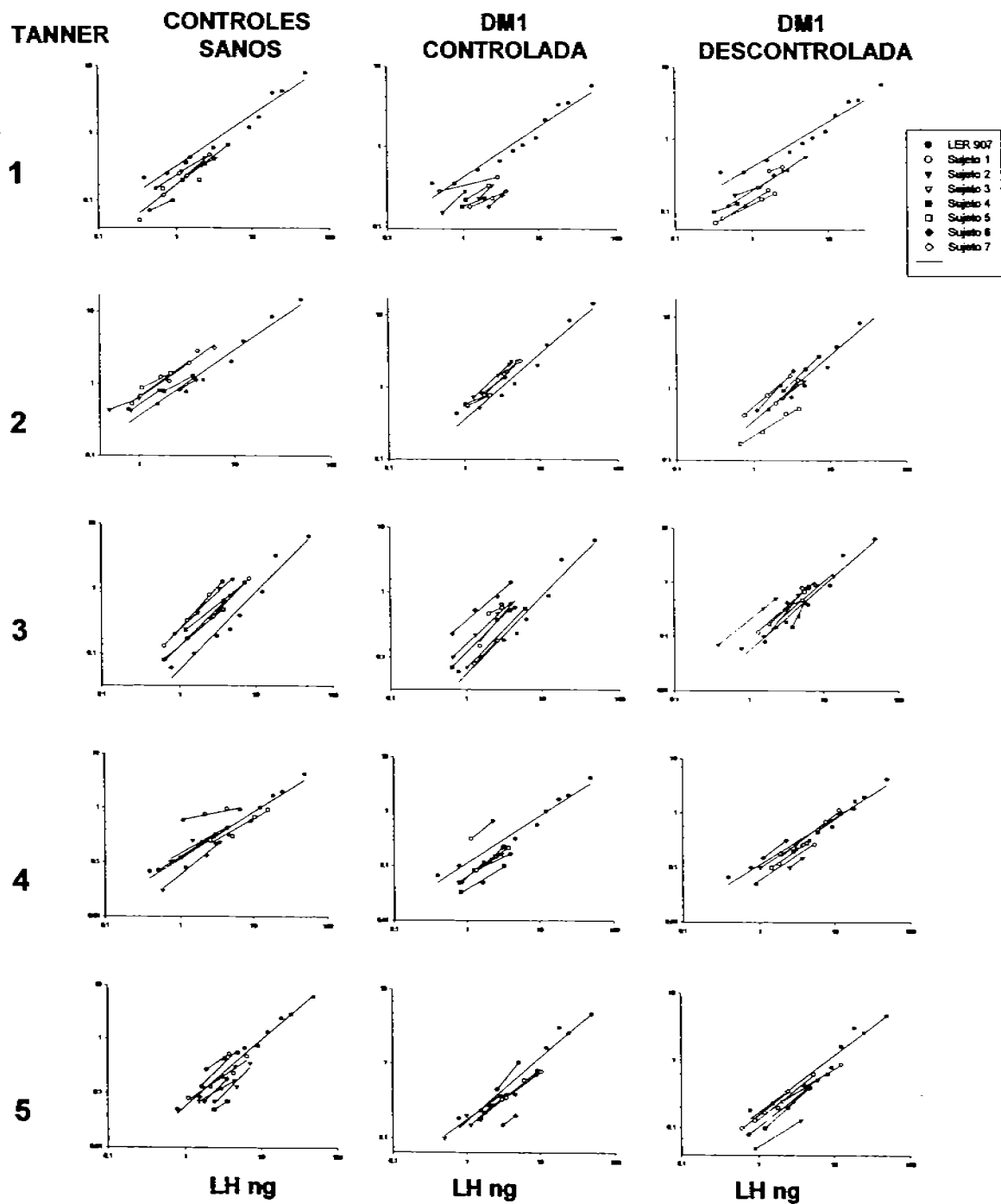
GRAFICA 3. CONCENTRACIONES DE HORMONA LUTEINIZANTE EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



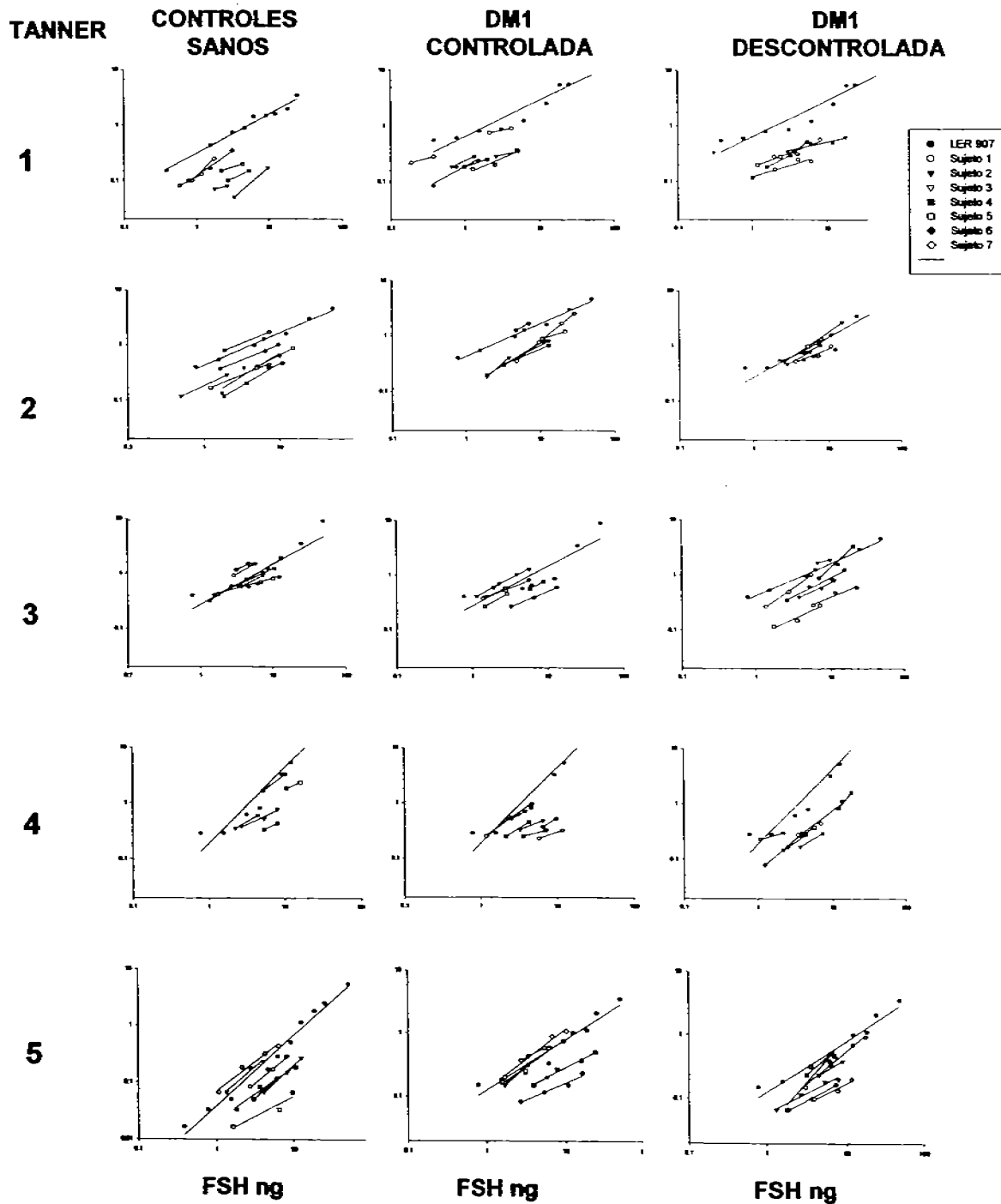
GRAFICA 4. CONCENTRACIONES DE HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



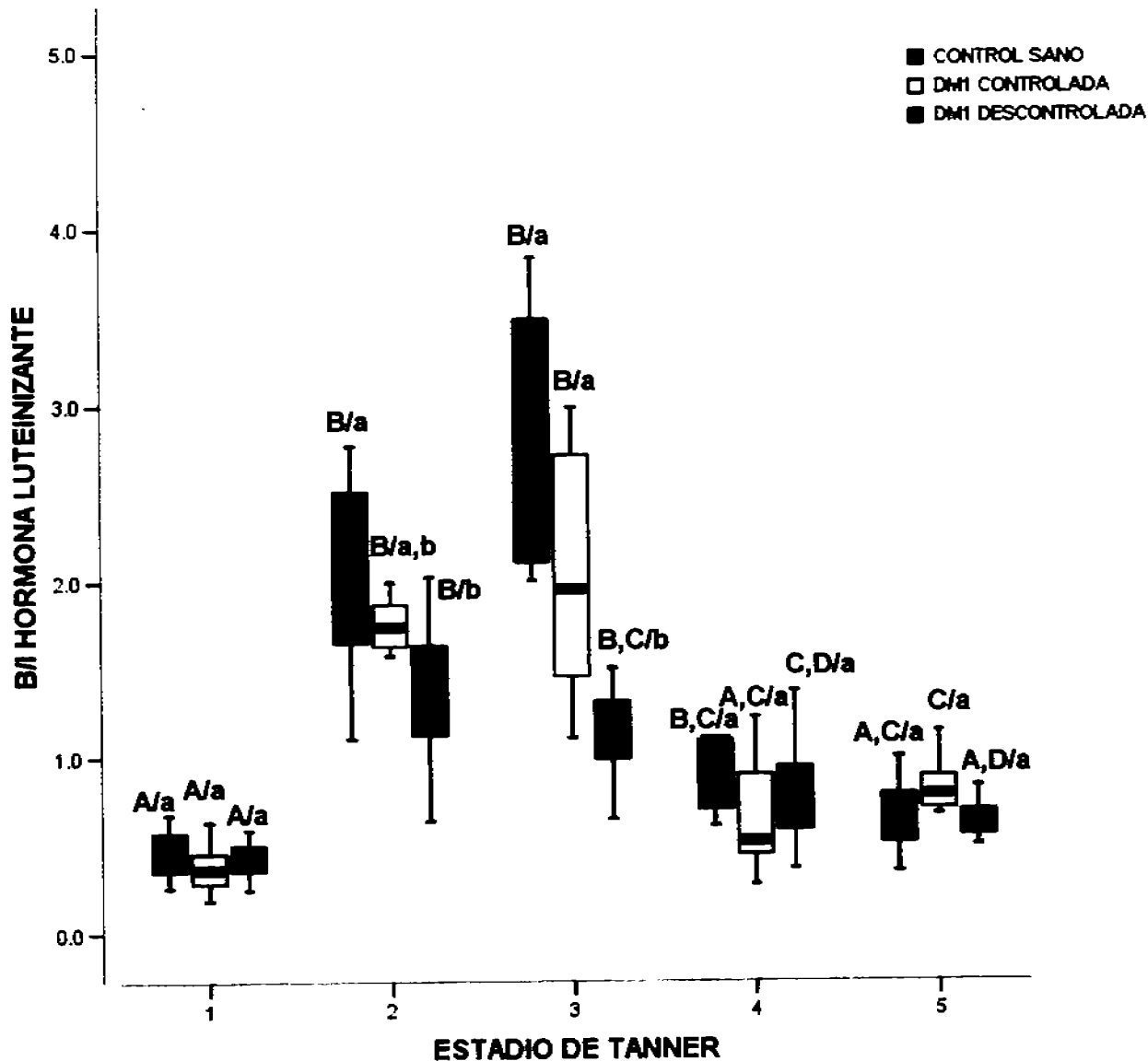
GRAFICA 5. IMPACTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA HORMONA LUTEINIZANTE SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc POR CELULAS HEK-293 TRANSFECTADAS CON EL ADNc DEL RECEPTOR DE LH. Los valores se expresan en relación al estándar LER-907.



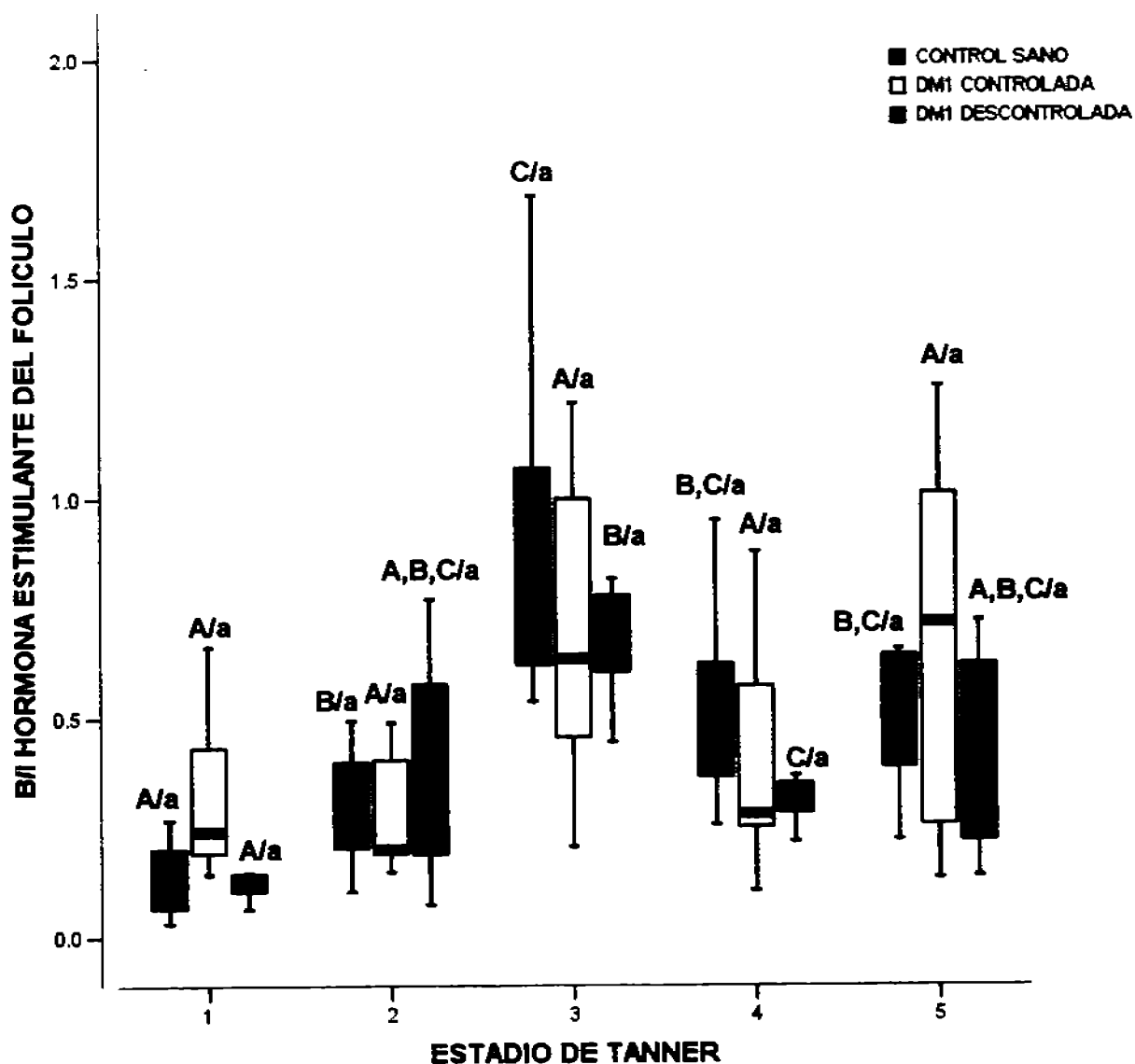
GRAFICA 6. IMPACTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO SOBRE LA PRODUCCION DE AMPc POR CELULAS HEK-293 TRANSFECTADAS CON EL ADNc DEL RECEPTOR DE FSH. Los valores se expresan en relación al estándar LER-907.



GRAFICA 7. COCIENTE BIOACTIVIDAD/INMUNORREACTIVIDAD DE LA HORMONA LUTEINIZANTE EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



GRAFICA 8. COCIENTE BIOACTIVIDAD/INMUNORREACTIVIDAD DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO EN LOS DIFERENTES ESTADIOS PUBERALES DE VARONES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) Y CONTROLES SANOS. Letras discordantes señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los estadios puberales de cada condición clínica (mayúsculas) o entre las tres condiciones en cada estadio puberal (minúsculas).



DISCUSION

La hormona luteinizante y la hormona estimulante del folículo tienen un papel determinante en el inicio y la progresión de la pubertad. Sus acciones dependen no sólo de las concentraciones circulantes, sino también de la actividad biológica de las mismas, determinada por las características de los oligosacáridos que forman parte de su estructura y que dan lugar a diferentes isoformas⁹¹. La cantidad y proporción de las diferentes isoformas de LH y FSH se produce y secreta bajo el estímulo endógeno de GnRH en respuesta a diferentes señales hormonales y metabólicas.

Este estudio fue diseñado para conocer la actividad biológica de la LH y la FSH de sujetos con diabetes mellitus comparada con sujetos sanos en los diferentes estadios puberales, con objeto de ampliar el conocimiento sobre el efecto del ambiente metabólico y hormonal generado por esta enfermedad. Se incluyeron solamente sujetos del sexo masculino para eliminar la posibilidad de variaciones de la actividad biológica, como en caso de las mujeres en quienes se presenta un incremento significativo en la fase lútea del ciclo menstrual⁵⁰.

Diversos estudios han demostrado que las gonadotropinas se almacenan en el gonadotropo y bajo el estímulo suprafisiológico de GnRH se liberan en dos fases, la primera de ellas en forma inmediata al estímulo, corresponde a la hormona ya sintetizada y almacenada en gránulos en contacto cercano con la membrana celular. Un segundo y mayor estímulo con GnRH, desencadena una mayor liberación tardía, que se atribuye a la

síntesis *de novo* de las gonadotropinas. Se ha documentado que la actividad biológica de las moléculas de las gonadotropinas liberadas a la circulación bajo la influencia de la GnRH endógena es similar a la obtenida por la administración de dosis suprafisiológicas de GnRH ^{48,50}, por lo que nuestros resultados en condiciones basales, aunque tomados de una muestra única, reflejan la actividad biológica de las gonadotropinas liberadas por la hipófisis.

En este estudio, los varones con diabetes mellitus tipo 1 descontrolada mostraron una disminución en la actividad biológica de LH en los estadios puberales 2 y 3 de Tanner comparado con los sujetos con DM1 controlada y los controles sanos. Las etapas 2 y 3 del desarrollo puberal, que marcan la imprescindible reactivación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, fueron las más afectadas por la DM1 comparadas con las etapas 4 y 5, que podrían considerarse de mantenimiento una vez que el eje ha logrado su reactivación. Esta disminución de la actividad biológica de LH en los estadios iniciales de Tanner de los sujetos con DM1, explicaría los reportes sobre el crecimiento y desarrollo de los sujetos con esta enfermedad, que aunque dentro de límites normales, inicia en forma más tardía y progresa significativamente más despacio que en los sujetos sanos ⁶²⁻⁶⁴. El predominio de isoformas altamente sializadas, con un pH más básico que las formas menos sializadas, se ha demostrado en algunas condiciones no fisiológicas como la obesidad ⁷⁷ y podría también ser el mecanismo que explique la menor actividad biológica encontrada en los sujetos con diabetes mellitus de este estudio, sobretodo en los casos con mal control glucémico. Existen otros mecanismos que en forma adicional podrían participar en la

disminución en la actividad biológica de las gonadotropinas de los sujetos con DM, como la glucosilación del receptor, o como se ha reportado para otras hormonas proteicas^{92,93}, la presencia de gonadotropinas glicadas, para lo cual se requiere otro modelo de estudio.

Es de señalar que en el estadio puberal 2, las concentraciones circulantes de testosterona total fueron significativamente mayores en los varones con diabetes mellitus descontrolada a pesar de una actividad biológica de LH disminuída. Aunque estos sujetos tuvieron una edad cronológica ligeramente mayor que los diabéticos controlados y los controles sanos, el volumen testicular no difirió significativamente. Una mayor concentración de testosterona circulante en sujetos con DM1 ha sido reportada previamente, con niveles de testosterona libre dentro de lo normal, sin relación con los andrógenos suprarrenales y relacionado en forma positiva con el nivel de HbA1c, con⁹⁴ y sin relación con los niveles de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG)⁹⁵. Existe la posibilidad de que la presencia de mayores niveles circulantes de testosterona en el grupo de sujetos con DM en estadio 2 de Tanner a pesar de la menor actividad biológica de LH, se deba a un mecanismo no dependiente de gonadotropinas aún no precisado, lo que podría afectar de forma secundaria la pulsatilidad de GnRH y la distribución de isoformas circulantes^{38,39} y explicar la menor actividad biológica de la LH observada en este grupo. Se han reportado cambios en el eje Hormona de Crecimiento-Factor de Crecimiento Insulinoide 1 asociados con la pubertad y el descontrol glucémico que podrían explicar parcialmente este hallazgo, por lo menos en el caso de las mujeres, aunque

la presencia de mayores niveles de IGF 1 circulantes en sujetos con DM no ha sido consistente.

La generación de AMPc se ha utilizado ampliamente en modelos *in vitro* como reflejo de la activación del complejo receptor-proteína Gs a través del cual ejercen su acción las gonadotropinas. El estudio de uno de los pasos iniciales e imprescindibles de la activación del receptor tiene la ventaja de que minimiza la posibilidad de que no pueda evidenciarse el efecto hormonal al estudiar productos intermedios o finales de la acción hormonal debido a que las células utilizadas, incluso en sistemas homólogos, pueden no contar con todo el mecanismo intracelular de generación de respuesta ante un estímulo determinado. Por otro lado, la generación del efecto hormonal final, como la producción de testosterona, puede ser modificada por otros factores, que en los diferentes modelos no pueden ser controlados fácilmente. Así mismo, la determinación de la producción total de AMPc disminuye la posibilidad de que no se demuestre el efecto de las gonadotropinas, por la discordancia que se ha reportado en algunos estudios entre la producción de AMPc intra y extracelular ⁹⁶.

Por otro lado, aunque existen estudios que apoyan una relación entre la generación de AMPc y el efecto final ⁹⁷, esto no ha sido consistente ⁹⁶. En estos casos, la determinación de AMPc como el principal segundo mensajero de la acción de las gonadotropinas podría no reflejar el efecto final de estas hormonas, ya que las isoformas producidas en el medioambiente hormonal y metabólico, como el caso de los sujetos con DM1 estudiados, podrían acompañarse de cambios conformacionales que permitan la activación del

receptor de LH por vías alternas⁹⁸ a través de 2º mensajeros diferentes de AMPc, llevando a una producción de testosterona adecuada e incluso ligeramente mayor que los controles sanos. Debido a que no contamos con la determinación de las concentraciones circulantes de estradiol o de la relación estradiol:testosterona, no podemos descartar la participación de esta hormona en la disminución de la B/I de LH por su efecto sobre la expresión del ARNm de algunas enzimas involucradas en la sialización y sulfatación terminales de las gonadotropinas^{99,100}. Sin embargo, no se ha demostrado que los varones con DM1 presenten mayores niveles de estradiol que los controles sanos y en nuestro estudio, no se encontraron diferencias en el índice de masa corporal en las tres condiciones clínicas, específicamente en los estadios de Tanner 2 y 3, que nos permitan inferir una diferencia en las concentraciones de estradiol en dichos sujetos.

López-Alvarenga *et al*⁷⁸, utilizando un ensayo homólogo, reportaron que adultos jóvenes con DM1 descontrolada presentan un cociente B/I de LH mayor que los controles sanos, lo que interpretaron como un posible incremento compensador con el fin de mantener la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en condiciones de enfermedad. En este estudio no pudimos reproducir estos hallazgos en el grupo de sujetos en estadio 5 de Tanner. Esto podría explicarse por diferencias en el modelo utilizado, además de que los sujetos con DM1 descontrolada en este estadio del desarrollo fueron más jóvenes y con mayor tiempo de evolución de la diabetes, que en el trabajo antes señalado.

Nuestros sujetos fueron estudiados en condiciones 'extremas' de control glucémico, ya que en sujetos con grados 'intermedios' de control (entre 8 y 10% de HbA1c), éste puede ser producto de una diferente combinación de periodos de hipo, normo e hiperglucemia. Sin embargo, condiciones inequívocas de buen y mal control glucémico, reflejan de forma más cercana el medio ambiente metabólico predominante en estos sujetos. Asimismo, se consideró que los sujetos en estudio estuviesen en la condición clínica señalada (DM controlada o descontrolada) durante las dos determinaciones previas de HbA1c, que abarcan un periodo promedio de 6 meses. Ya que las modificaciones agudas en los niveles de glucosa pueden modificar la pulsatilidad de la GnRH y potencialmente las isoformas de la LH y FSH liberadas, no se incluyeron sujetos con glucemias <70 mg/dl o >300 mg/dl al momento de la toma de la muestra. De igual manera, se analizó la relación entre la actividad biológica observada y la glucemia prevalente al momento de la toma de la muestra sin evidenciarse cambios atribuibles a esta última.

En el caso de la actividad biológica de la hormona estimulante del folículo, no pudimos demostrar una diferencia significativa entre las diferentes condiciones clínicas en ninguno de los estadios puberales. Lo anterior podría deberse a que las señales metabólicas emitidas en los sujetos con DM1, incluso en condiciones de descontrol glucémico, no son suficientes para modificar la distribución de las isoformas circulantes de esta gonadotropina. Por otro lado, no podemos descartar que, a pesar de que el modelo celular con transfección del receptor recombinante de FSH de rata ha sido

validado⁸⁸, se pudiesen evidenciar diferencias con otro modelo o que existan limitaciones por el tamaño de la muestra.

La actividad biológica de las gonadotropinas en un momento dado, es reflejo de la mezcla de isoformas circulantes producto de diferencias en la glucosilación terminal de estas hormonas. Se expresa como el índice obtenido entre la bioactividad calculada en base a la producción de AMPc y la inmunorreactividad de las gonadotropinas circulantes.

Las condiciones de heterogeneidad en la distribución de oligosacáridos de las diferentes isoformas, pueden potencialmente dar lugar a cambios conformacionales en la molécula de LH o FSH que impidan el reconocimiento de epítopes específicos por ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales como el IFMA. Aún así, se ha reportado por diversos autores que el cálculo del cociente B/I de las gonadotropinas utilizando la determinación de los niveles circulantes por diferentes ensayos (mono, poli o mono-policlonales) guarda una correlación adecuada entre ellos, por lo menos para las isoformas de FSH que se presentan en forma natural¹⁰¹, y que la diferencia reportada entre los niveles circulantes de gonadotropinas utilizando diferentes ensayos no parece tener preferencia sobre algún rango del punto isoelectrico de las isoformas¹⁰². De ser cierto incluso en condiciones de enfermedad, como en caso de la diabetes mellitus, la inmunofluorometría podría ser la técnica preferida para el cálculo de la actividad biológica en pacientes pediátricos, por el menor volumen requerido (25 µL para IFMA vs 100 µL para RIA).

Otro de los hallazgos fue un menor volumen testicular de los varones con DM1 en Tanner 1 comparados con los controles sanos, aún cuando no se presentó diferencia en la edad o el índice de masa corporal. Esto se acompañó de menores niveles de testosterona, aunque no alcanzó significancia estadística. El incremento progresivo en el volumen testicular observado en la etapa prepuberal depende en un gran porcentaje del incremento en el número de las células germinales y de la longitud de los túbulos seminíferos ¹⁰³. A partir del desarrollo intrauterino, los túbulos seminíferos parecen depender de las pequeñas cantidades de gonadotropinas y esteroides sexuales que caracterizan a la etapa prepuberal, ya que los sujetos con hipogonadismo hipogonadotrópico tienen menor volumen testicular desde esta etapa. En este estudio, el menor volumen testicular de los sujetos con DM1 en Tanner 1, aunque dentro de límites normales, puede ser un reflejo de una menor actividad biológica de las gonadotropinas incluso en la etapa prepuberal que no pudimos evidenciar por las características del modelo utilizado y/o debido a la determinación en muestra única en condiciones basales, que se caracterizan por bajas concentraciones circulantes de estas hormonas. Aunque se trata de un estudio transversal, el menor volumen testicular no parece persistir en los estadios subsecuentes del desarrollo, ya que del Tanner 2 al Tanner 5 fue similar en las tres condiciones clínicas.

En resumen, únicamente se vio afectada la actividad biológica de la hormona luteinizante en los estadios iniciales del desarrollo puberal, con disminución en los sujetos con DM1 descontrolada. En espera de contar con

alternativas de curación para esta enfermedad, todos los esfuerzos se deben enfocar a lograr el mejor control glucémico posible, ya que probablemente alteraciones en el ambiente metabólico y hormonal, con predominio en condiciones de descontrol glucémico, sean responsables de estas diferencias.

CONCLUSIONES

1. En las tres condiciones clínicas, la B/I de LH y FSH incrementa entre el estadio prepuberal y los estadios 2 y 3, posteriormente tiende a retomar a niveles similares al T1.
2. La actividad biológica de la LH en los estadios puberales 2 y 3, fue menor en los sujetos con DM1 descontrolada comparada con los sujetos sanos. La actividad biológica de la FSH no se vio afectada por la condición clínica.
3. La disminución en la B/I de la LH en los estadios iniciales de sujetos con DM1 podría explicar el retraso en el inicio y progresión de la pubertad que se reporta en varios estudios clínicos. La normalización en estadios subsecuentes permitiría completar el desarrollo puberal en forma satisfactoria.

BIBLIOGRAFIA

1. Parent AS, Teilmann G, Juul A et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variation around the world, secular trends, and changes after migration. *Endoc Rev* 2003; 24: 668-93.
2. Parra A, Ramos-Galván C. La influencia de la privación psicosocial y la composición corporal sobre las gonadotrofinas plasmáticas en niños y adolescentes. *Gac Med Mex* 1992; 128:7.
3. Palmert M, Boepple P. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2364.
4. Van Vliet G. Clinical aspects of normal pubertal development. *Horm Res* 1991; 36:93.
5. Ulloa-Aguirre A, Díaz-Cueto L, Méndez JP. La pubertad. Antología de la sexualidad humana. II. En: Pérez Fernández C y Rubio Aurióles E (eds). Miguel Angel Porrúa. México D.F; 1994. p.515.
6. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45:13.
7. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44:291.
8. Retter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 1982; 44:595.
9. Teresawa E, Fernández DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001; 22:111.
10. Teresawa E. Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15:141.
11. Ojeda SR, Ma YJ, Rage F. A role for TGF alpha in the neuroendocrine control of female puberty. In: Plant TM, Lee PA (eds). *The Neurobiology of Puberty*. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol, U.K.; 1995.p.103.
12. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99:391.
13. Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL. A diphasic pattern of gonadotropin secretion in patients with the syndrome of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40:670.
14. Boyar RM, Rosenfeld RS, Kapen S et al. Human puberty: simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J Clin Invest* 1974; 54:609.
15. Wu FCW, Butler GE, Kelnar CJH, Huhtaniemi I, Veldhuis JD. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male: a study using deconvolution analysis and an ultrasensitive immunofluorometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1798.

-
16. Veldhuis JD, Evans WS, Johnson ML, Wills MR, Rogol AD. Physiological properties of the luteinizing hormone pulse signal: impact of intensive and extended venous sampling paradigms on its characterization in healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:881.
 17. Spratt DI, O'Dea LS, Schoenfeld DA et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol* 1988; 254:E658.
 18. Schally A, Arimura A, Baba Y et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:393.
 19. Matsuo H, Baba Y, Nair RMV, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:1334.
 20. Hawes BE, Conn PM. Molecular mechanism of GnRH action: do G proteins and inositol phosphates have role?. En: Bouchard P, Caraty A, Coelingh Bennink HJT, Pavlou SN (eds). *GnRH, GnRH analogs, gonadotropins and gonadal peptides*. Butler & Tanner, 1993. p. 63.
 21. Turgeon JL, Waring DW. Differential changes in the rate and pattern of follicle-stimulating hormone secretion from pituitaries of cyclic rats superfused in vitro. *Endocrinology* 1982; 111:66.
 22. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 1989; 125:917.
 23. Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Program Horm Res* 1984; 40:43.
 24. Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Timossi C et al. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res* 1995; 26 (Supl):219.
 25. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Méndez JP. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. *A matter of Fact. Hum Reprod* 2001; 16: 599.
 26. Dias JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? II. A biochemical point of view. *Hum Reprod* 2001;16: 825.
 27. Tsatsoulis A, Shalet SM, Robertson WR. Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991; 35:193.
 28. Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenic perspective. En: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML, (eds). *Control of the onset of puberty*. Baltimore. Williams and Wilkins, 1990. p:1
 29. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-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.

-
30. Veldhuis JD. Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En: Yen SSC, Jaffe RB (eds): *Reproductive Endocrinology*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders; 1991. p: 409.
 31. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev* 1994; 15: 725.
 32. Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100:81.
 33. Catt KJ, Dufau ML. Basic concepts of mechanism of action of peptide hormones. *Biol Reprod* 1976; 14:1.
 34. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M et al. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54:77.
 35. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18:739.
 36. Ulloa-Aguirre A, Conn MP. G-protein-coupled receptors and the G protein family. En: Conn, P.M. (Ed), *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, Oxford University Press, New York; 1998.p:81.
 37. Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J Clin Invest* 1987; 80:294.
 38. Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P, Attardi B. Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1992; 130:726.
 39. Veldhuis JD, Urban RJ, Dufau MI. Evidence that androgen negative feedback regulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone impulse strength and the burst-like secretion of biologically active luteinizing hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1227.
 40. Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 1986; 234:205.
 41. Krummen LA, Woodruff TK, De Guzman G et al. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 1993; 132:431.
 42. Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H et al. H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 1997; 272:13835.
 43. Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1244.

-
44. Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Weber RF, D'Agata R. Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release in vitro. *J Endocrinol* 1996; 151:269.
 45. Marshall JC, Kelech RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 1986; 315:1459.
 46. Burr IM, Sizonenko PC, Kaplan SL, Grumbach MM. Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone with stages of puberty, testicular size, and bone age in normal boys. *Pediatr Res* 1970; 4:25.
 47. Dickerman Z, Barkey RJ, Prager-Lewin R, Gahnem F, Laron Z. Persistently low immunoreactive and normally bioactive plasma LH during male puberty. *Horm Metab Res* 1989; 21:42.
 48. Olivares A, Söderlund D, Castro-Fernández C et al. Basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution and in vitro biological-to-immunological ratio in male puberty. *Endocrine* 2004; 23: 189.
 49. August GP, Grumbach MM, Kaplan SL. Hormonal changes in puberty. III. Correlation of plasma testosterone, LH, FSH, testicular size, and bone age with normal pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34:319.
 50. 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; 16:1611.
 51. Dunger DB, Villa AK, Matthews DR et al. Pattern of secretion of bioactive and immunoreactive gonadotrophins in normal pubertal children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991; 35:267.
 52. Huhtaniemi I, Haavisto A-M, Anttila R, Siimes MA, Dunkel L. Sensitive immunoassay and in vitro bioassay demonstrate constant bio/immuno ratio of luteinizing hormone in healthy boys during the pubertal maturation. *Pediatr Res* 1996; 39:180.
 53. Huhtaniemi I, Ding YQ, Tähtelä R, Vällmäki M. The bio/immuno ratio of plasma luteinizing hormone does not change during the endogenous secretion pulse: reanalysis of the concept using improved immunometric techniques. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1442.
 54. Christin-Maitre S, Bouchard P. Bioassays of gonadotropins based on cloned receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125: 151.
 55. Van den Berghe G. Dynamic neuroendocrine responses to critical conditions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2002; 23: 370.
 56. Chambers TL, Buchanan CR. Abnormalities of growth and development in puberty. *J Royal Coll Physic London* 2000; 34:141.
 57. Expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:1183.

-
58. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1994; 331:1428.
 59. Diabetes Control and Complications Trial Cohort (DCCT). Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. *Diabetes Care* 1999; 22:99.
 60. Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D et al. Plasma glucose and prediction of microvascular disease and mortality. *Diabetes Care* 2000; 23:1113.
 61. Diabetes Control and Complications Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977.
 62. Du Caju MVL, Roman RP, Op de Beeck L. Longitudinal data on growth and final height in diabetic children. *Pediatr Res* 1995; 38:607.
 63. Ahmed ML, Connors MH, Drayer NM, Jones JS, Dunger DB. Pubertal growth in IDDM is determined by HbA1c levels, sex, and bone age. *Diabetes Care* 1998; 21: 831.
 64. Holl RW, Grabert M, Heinse E, Sorgo W, Debatin KM. Age at onset and long-term metabolic control affect height in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Pediatr* 1998; 157: 972.
 65. Penfold J, Chase HP, Marshall G et al. Final adult height and its relationship to blood glucose control and microvascular complications in IDDM. *Diabet Med* 1995; 12: 129.
 66. Schroeder B, Hertweck SP, Sanfilippo JS, Foster MB. Correlation between glycemic control and menstruation in diabetic adolescents. *J Reprod Med* 2000; 45: 1.
 67. Strotmeyer ES, Steenkiste AR, Foley TP, Berga SL, Dorman JS. Menstrual cycle differences between women with type 1 diabetes and women without diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1016.
 68. Espallargues M, Sampietro-Colom L, Estrada MD et al. Identifying bone-mass related risk factor for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature. *Osteoporosis Int* 2002; 12: 811.
 69. Aubert ML, Pierroz DD, Gruaz NM et al. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. *Mol Cell Endoc* 1998; 140: 107.
 70. Suter DE, Schwartz NB. Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin releasing hormone by male rat pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 1985; 117: 855.
 71. Hadashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone release by cultures pituitary cells. *Endocrinology* 1981; 108: 1441.
 72. Bucholtz DC, Chiesa A, Pappano WN et al. Regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion by insulin in the diabetic male lamb. *Biol Reprod* 2000; 62:1248.

-
73. Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC et al. Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. *Biol Reprod* 2000; 62:1256.
 74. Sudha S, Valli G, Julie PM et al. 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.
 75. Kovacs P, Parlow AF, Karkanias GB. Effect of centrally administered insulin on gonadotropin-releasing hormone neuron activity and luteinizing hormone surge in the diabetic female rat. *Neuroendocrinology* 2002; 76: 357.
 76. Valenti S, Giusti M, Mc Guinness D et al. Delayed puberty in males with beta-thalassemia major: pulsatile gonadotropin-releasing hormone administration induces changes in gonadotropin isoforms profiles and an increase in sex steroids. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 48.
 77. Castro-Fernández C, Olivares A, Söderlund D et al. A preponderance of circulating basic isoforms of luteinizing hormone (LH) is associated with decreased plasma half-life and biological-to-immunological ratio in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4603.
 78. López-Alvarenga JC, Zariñán T, Olivares A et al. Poorly controlled type 1 diabetes mellitus in young men selectively suppresses luteinizing hormone secretory burst mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5507.
 79. Babichev VN, Adamskaya EI, Kuznetsova TA, Shishkina IV. Neuroendocrine control of the gonadotropic function of the hypophysis in experimental diabetes. *Neurosci Behav Physiol* 1998; 28:1.
 80. Jackson RL. Growth and maturation of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatr Clin North Am* 1984; 31:545.
 81. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E et al. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care* 2000; 23: 1516.
 82. Rosen SW, Gann P, Rogol AD. Congenital anosmia: detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Ann Otol* 1979; 88:288.
 83. Kynoch PAM, Lehman H. Rapid estimation (2 1/2 hour) of glucosylated haemoglobin for routine purposes. *Lancet* 1977, 2: 16.
 84. Lövgren T, Hemmilä I, Petterson K. Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay. *Talanta* 1984; 31:909.
 85. Hemmilä I, Dakubu S, Mikkala VM, Siitari H, Lövgren T. Europium as label in time-resolved immunofluorometric assay. *Annal Biochem* 1984; 137:335.
 86. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 1963; 89: 114.
 87. Jia XC, Perlas E, Su JGJ et al. Luminiscence luteinizing hormone/choriogonadotropin (LH/CG) bioassay: measurement of serum bioactive LH/CG during early pregnancy in human and macaque. *Biol Reprod* 1993; 43:1310.

-
88. Gudermann T, Brockmann H, Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. *In Vitro* bioassay for human serum follicle-stimulating hormone (FSH) based on L cells transfected with recombinant rat FSH receptor: validation of a model system. *Endocrinology* 1994; 135:2204.
 89. Lee DW, Shelden RM, Reicher LE Jr. Identification of low and high molecular-weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitors in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990; 53:830.
 90. Sluss PM, Schneyer AL. Low molecular weight follicle-stimulating hormone receptor binding inhibitor in sera from premature ovarian failure patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1242.
 91. Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125: 133.
 92. Mooney MH, Abdel-Wahab YH, McKillop AM, O'Harte FP, Flatt PR. Evaluation of glycosylated glucagon-like peptide-1(7-36)amide in intestinal tissue of normal and diabetic animal models. *Biochem Biophys Acta* 2002;1569:75.
 93. Hunter SJ, Boyd AC, O'Harte FP et al. Demonstration of glycosylated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans. *Diabetes* 2003;52:492.
 94. Christensen L, Hagen C, Henriksen JE, Haug E. Elevated levels of sex hormones and sex hormone binding globulin in male patients with insulin dependent diabetes mellitus. Effect of improved blood glucose regulation. *Dan Med Bull* 1997; 44: 547.
 95. Meyer K, Deutscher J, Anil M et al. Serum androgen levels in adolescents with type 1 diabetes: relationship to pubertal stage and metabolic control. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 362.
 96. Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM et al. Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79:119.
 97. Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. 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. *Endocrine* 1999; 10:113.
 98. Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC et al. Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 517.
 99. Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A et al. Oestrogens regulate pituitary alpha 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. 1999;23:153.
 100. Dharmesh SM, Baenziger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:11127

-
101. Zambrano E, Barrios-de-Tomasi J, Cardenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies of the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 563.
 102. Oliver RL, Kane JW, Waite A, Mulders JW, Robertson WR. Do immunoassays differentially detect different acidity glycoforms of FSH? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51: 681.
 103. Muller J, Skakkebaek NE. Quantification of germ cells and seminiferous tubules by stereological examination of testicles from 50 boys who suffered from sudden death. *Int J Androl* 1983; 6: 143.