



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ENDOCRINAS**

“Determinación de las isoformas moleculares y porcentaje de glicosilación de las gonadotropinas hipofisarias en diferentes etapas del climaterio”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A:

MARCELINO HERNÁNDEZ VALENCIA

TUTOR:

DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO

COMITÉ TUTORIAL:

DR. DANTE AMATO MARTÍNEZ
DR. CARLOS M. TIMOSSO BALDI
DR. RAMON PANIAGUA SIERRA

México, D. F. 2006

**DETERMINACIÓN DE LAS ISOFORMAS MOLECULARES Y
PORCENTAJE DE GLICOSILACIÓN DE LAS**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS EN DIFERENTES ETAPAS DEL CLIMATERIO

(DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE GLICOSILACIÓN DE GONADOTROPINAS CON LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS CONJUGADOS Y CON TIBOLONA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS)

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

M.C. MARCELINO HERNÁNDEZ VALENCIA

TUTOR:

DR. ARTURO ZÁRATE TREVIÑO

COMITÉ TUTORIAL:
ASOCIADOS:

DR. DANTE AMATO MARTÍNEZ
DR. CARLOS M. TIMOSSO BALDI
DR. RAMON PANIAGUA SIERRA

INVESTIGADORES

QFB. ANGELICA SANDOVAL
QFB. MIRIAM RUIZ

SITIO DE REALIZACIÓN:

UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES ENDOCRINAS, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.
COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD, SEDE CENTRO.
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Índice

I. Resumen
Antecedentes

II. Planteamiento del problema
Justificación
Hipótesis
Objetivo

III. Material y métodos
Grupos de estudio
Método
Preparación de la muestra

IV. Lugar de estudio
Diseño del estudio
Tipo de estudio
Tamaño de la muestra
Criterios de inclusión
Criterios de exclusión
Criterios de eliminación

V. Descripción general del estudio
Análisis estadístico
Aspectos éticos
Factibilidad
Recursos

VI. Resultados
Validación del procedimiento
Recuperación hormonal
Comparación de los grupos de estudio
Respuesta clínica
Perfil cromatográfico

VII. Discusión

VIII. Referencias

IX. Apéndice 1
Apéndice 2
Anexo 1
Anexo 2

Palabras clave: Terapia hormonal, Isoformas, Gonadotropinas, Glicosilación

Resumen

Las formas glicosiladas de FSH y LH se cree que tienen un papel sutil a nivel celular, ya que podrían inducir diferentes respuestas a través de estimular sus receptores en diferentes grados en una misma vía de traducción de señales. Hasta ahora no se sabe cual es la interpretación bioquímica y fisiológica de las variaciones estructurales de las isoformas moleculares, así como los factores que la determinan, pero se ha hecho patente la interdependencia entre el nivel de estrógenos circulantes y el tipo de gonadotropinas que se secretan por la hipófisis. La tibolona es un fármaco sintético que ha demostrado tener un rápido efecto benéfico sobre la sintomatología sistémica que acompaña a la postmenopausia, pero aún se desconoce su efecto a nivel molecular, por lo que es necesario hacer su comparación con los estrógenos conjugados utilizados de forma habitual en la postmenopausia. Esto hace evidente que son necesarios estudios complementarios sobre las glicofomas de FSH y LH para asignar un papel fisiológico a la glicosilación alternativa.

Objetivo: El propósito de este estudio fue comparar los cambios en el porcentaje de glicosilación de FSH y LH con el uso de estrógenos conjugados y tibolona como terapia hormonal (TH) en la postmenopausia.

Tipo de estudio : experimental.

Material y método : Se formaron tres grupos de estudio, los cuales quedaron integrados por 10 mujeres con ciclos menstruales normales como grupo control, 10 pacientes postmenopáusicas que recibieron estrógenos conjugados (Premarin 0.625mg), así como 10 pacientes que recibieron tibolona (Livial 2.5mg). A todas las pacientes se les determinaron las concentraciones hormonales antes y después del uso de TH durante 6 meses. Para el procedimiento de separación molecular se usó Concanavalina-A, la cual es una Lectina que permite la separación de gonadotropinas en tres fracciones de acuerdo a la estructura de sus oligosacáridos, las cuales corresponden a la fracción no unida (NU: oligosacáridos triantenarios y bisectados), débilmente unida (DU: oligosacáridos biantenarios y truncados) y las isoformas fuertemente unidas (FU: oligosacáridos híbridos y con alto contenido de manosa). Las eluciones que contenían las fracciones de las isoformas fueron concentradas usando membranas Centriprep y en cada una fueron determinadas las concentraciones de gonadotropinas por quimioluminiscencia usando un sistema automatizado Immulite.

Resultados: El patrón de glicosilación después del uso de estrógenos conjugados y tibolona fue similar al observado en el grupo con ciclos menstruales normales, aunque con diferente porcentaje de glicosilación. Cuando el porcentaje de glicosilación fue comparado para FSH, en la fracción NU la glicosilación no tuvo diferencia significativa con el uso de estrógenos y tibolona, pero la fracción DU tuvo isoformas con un mayor porcentaje de oligosacáridos comparado con la fracción NU, donde el porcentaje de glicosilación recobrado fue mayor con el uso de tibolona comparado con los estrógenos conjugados (38 ± 2 vs 29 ± 3 $p < 0.05$). La fracción FU no mostró diferencia en la glicosilación hormonal entre el uso de estrógenos y tibolona. Cuando fue comparada la glicosilación de LH se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en la fracción NU con un mayor grado de glicosilación y en la fracción FU con un menor porcentaje de glicosilación en el grupo con tibolona comparado con usuarias de estrógenos conjugados, aunque el patrón de distribución fue similar en cada fracción a el observado en el grupo con ciclos menstruales normales.

Conclusiones : Se demostró un patrón y porcentaje de glicosilación diferente, relacionado con el tipo de TH, lo cual puede ejercer un diferente efecto clínico. Esto podría tener utilidad en la perimenopausia y otros estados de hipoestrogenismo en mujeres jóvenes.

Summary

The diversity of opinion in the adverse effects of therapy used to treat the postmenopausal symptoms, has originated the use of diverse ways and mechanisms of action that should be explored, since the bioavailability of the pharmacological drugs is variable. The actual tendency is to obtain the therapeutic efficacy in base to select the way of administration from hormonal therapy (HT). As prospective study, in random form 4 groups with postmenopausal women were formed. The group 1 received conjugated estrogens by oral way, the group 2 a synthetic steroid, the group 3 estradiol by nasal aspersion way and the group 4 utilized transdermal estradiol through parch. The evaluation criterion in efficacy of HT was the Greene scale that values six components (vasomotor, sexual, depression, somatic, psychological, anxiety) which applied in each patient before the hormonal intervention and later each month until the 6 months. LH, FSH and estradiol concentrations were determined by chemiluminiscence and the comparison among groups was made with Student t test before and after processing. The vasomotor component showed significant descent ($p < 0.05$) with the use of the four types of HT, the sexual component showed descent with the use of HT nasal, oral estrogens and transdermal way, in depressive component differences with oral synthetic steroid and with conjugated oral use was observed, upon analyzing the somatic component was observed decrease of the symptom with use of nasal and transdermal way, the psychological changes were observed with use of oral synthetic steroid and transdermal, the anxiety had difference with the nasal and with the oral conjugated way, although all the forms of HT in this component had an irregular pattern of changes. The changes in response to each way of pharmacological administration could be due to estrogens have gene and not gene effects, moreover can exist absorption variability with repercussion in the control of symptoms, which should be considered when selecting the way in the patient that will initiate HT.

Posmenopausal symptomatic changes with use of different hormonal therapy forms

ANTECEDENTES

La menopausia se define como la fecha de última menstruación, que se confirma clínicamente por ausencia de sangrado uterino durante un lapso de por lo menos 12 meses; el climaterio es considerado como el periodo que precede a la menopausia y que transcurre posterior a ésta, acompañado de los síntomas característicos de este estadio, la cual se subdivide en premenopausia y postmenopausia (1). En las últimas décadas el promedio de vida de las mujeres se ha incrementado. De acuerdo a las estadísticas mexicanas, existen en la actualidad más de 5 millones de mujeres entre los 45 y 50 años de edad y que por lo tanto se les puede considerar dentro de la menopausia, al igual que los estudios realizados en Estados Unidos de Norteamérica donde muestran que aproximadamente existen 30 millones de mujeres por arriba de los 50 años (2-3). Lo anterior determina que en estas mujeres, transcurra más de la tercera parte de su existencia en la postmenopausia, lo que representa que vivirán alrededor de 30 años en esta etapa, por lo tanto cuando la mujer atraviesa el climaterio se enfrenta por muchos años a variados y múltiples cambios somáticos y anímico-afectivos, que son el resultado de la deficiencia en la producción de estrógenos por el ovario (4-6). Existe otro grupo de mujeres más jóvenes que por diferentes causas han perdido sus ovarios, a consecuencia de ooforectomía quirúrgica ó por padecer menopausia precoz idiopática, por ello se ha despertado en los últimos años un interés obligado por conocer los cambios metabólicos que se asocian con la disminución en la producción hormonal ovárica. Se ha determinado que en la premenopausia la mujer cursa con subfertilidad a consecuencia de

dos hechos, inicialmente debido a que presentan menos ciclos ovulatorios y posteriormente a que de forma paulatina disminuye la producción hormonal por una deficiente estimulación hacia los ovarios, esta etapa tiene una correspondencia bioquímica la cual se caracteriza primero por deficiente producción de progesterona y más adelante disminución en los niveles de estrógenos con una elevación simultánea de las gonadotropinas hipofisarias, conocidas con los nombres de hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) (7-8), en respuesta biológica compensatoria al pobre efecto que se obtiene del ovario para producir las hormonas esteroideas (9-10).

Las hormonas glicoproteicas hipofisarias son una familia compuesta por TSH, FSH, LH, y otra de origen placentario la hCG, todas formadas por dos subunidades de polipeptidos glicosilados, la subunidad α es común para estas hormonas y la subunidad β es única y confiere especificidad biológica e inmunológica. Ambas subunidades tienen cadenas de carbohidratos unidas a asparagina. Las gonadotropinas (FSH y LH) son sintetizadas y secretadas por células especializadas llamadas gonadotropos, que se encuentran en la hipófisis anterior. La FSH es una proteína con peso molecular de 30 kD que puede disociarse en una subunidad α que tiene 92 aminoácidos, con peso molecular 14.6 kD y una subunidad β , que consta de 118 aminoácidos y peso molecular de 18 kD. Posee cuatro oligosacáridos ramificados unidos a asparagina, dos están localizadas en la subunidad α en los aminoácidos 56 y 82, las otras dos en la subunidad β unidas a la 13 y 30, estas cadenas laterales contienen D-manosa, D-galactosa, L-fucosa, ácido N-acetil-neuroamínico (ácido siálico), N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-

galactosamina. La LH tiene peso molecular 29 kD con la subunidad β de 114 aminoácidos, peso molecular de 14.8 kD con una cadena de oligosacaridos, así en total solo tiene tres cadenas laterales de carbohidratos al considerar las dos subunidades, por lo que el menor contenido de ácido siálico, se considera es la causa de la semidesintegración más rápida, pero que en términos generales las propiedades fisicoquímicas son muy similares a FSH (11-14). La presencia de uniones disulfuro confiere una elevada capacidad de plegarse para darle la estructura tridimensional a cada subunidad, lo cual es esencial para mantener la actividad biológica (15-16). Además, los oligosacaridos sobre la subunidad- α juegan un importante papel en el plegamiento de diferentes puntos funcionales de la subunidad y probablemente afecta la flexibilidad de la molécula, lo cual es crítico para el ensamble de la subunidad y posible formación de puentes disulfuro. Esta formación de uniones disulfuro inicia durante la síntesis del polipéptido y probablemente concluye después del ensamble de las unidades α - β en el retículo endoplásmico rugoso. En el humano, la subunidad- α común tiene 10 aminoácidos cisteína que forman cinco puentes disulfuro en el interior de las cadenas. Entre estos puentes que unen cisteína en la posición α 10-60, α 28-82 y α 32-84 el cual esta localizado en el llamado nudo de cisteína (17-18). Los carbohidratos de la subunidad- β de FSH juegan un papel mayor en la determinación de la proporción de eliminación metabólica y la potencia in vivo de la gonadotropina. Los carbohidratos unidos a la subunidad- α juegan un papel dominante en la capacidad de la hormona para activar el receptor e inducir la traducción de la señal. La subunidad- α deglicosilada recombinada con la subunidad- β intacta de FSH ovina

retiene su unión habilmente pero es inactiva en inducir activación de la adenil-ciclasa (19-20). Las formas glicosiladas de FSH pueden jugar un papel sutil a nivel celular, porque podrían inducir diferentes respuestas a nivel celular, lo cual puede funcionar a través de diferentes habilidades de las glicovariantes para inducir ó estabilizar los receptores, que puedan permitir la activación e inhibición en forma preferencial ó en diferentes grados una vía de traducción de señales específica. La alteración de la glicosilación de la subunidad- α en N52 hace a la FSH marginalmente competente para la esteroidogénesis pero no para la unión al receptor (21-22).

La glicosilación de las subunidades de las hormonas glicoproteicas inician en el retículo endoplásmico rugoso (RER) con la transferencia co-traslacional de uniones dolicol Glc3man9GlcNAc2 precursores de oligosacaridos para asparagina y la glicosilación de los sitios Asn-XSer/Thr. Después de la formación de dímeros y agregación de glucosa y manosa a la Man5GlcNAc2 en el RER y cisternas del aparato de Golgi (cis-Golgi), extensos procesos de la agregación de oligosacaridos al centro de la proteína de la hormona ocurren en el medial y trans-Golgi, para formar los oligosacaridos maduros. Numerosos carbohidratos intermedios resultan de este proceso traduccional, muchos de los cuales se convierten en las formas finales del complejo de cadenas de carbohidratos unidas a la proteína, que son responsables de muchas de las glicofomas sintetizadas y secretadas por la hipofisis (23-24). El proceso anterior hace que la amplia variabilidad en la composición de oligosacaridos constituya la principal base química para la formación de isoformas y la gran heterogeneidad molecular existente en cada hormona. Lo cual resulta de gran importancia, al

considerar que la regulación de la diferente distribución de oligosacaridos sializados y sulfatados en LH y FSH son de particular interés considerando que ambos son sintetizados en la misma célula (25-26). Los precursores polipeptídicos de las subunidades α y β están sujetos a una actividad proteolítica para remover sus peptidos de señales y los azucares de los sitios de unión.

Inmediatamente después de esto, la subunidad se pliega y ocurre la formación de múltiples uniones intramoleculares de disulfuro, así como la combinación de subunidades. El precursor inicial de oligosacaridos unidos a asparagina es remodelado por eliminación de su glucosa terminal, así los residuos de manosa son removidos por las exoglicosilasas en el retículo endoplásmico y cisternas del aparato de Golgi y por la agregación en pasos intermedios de otros azucares, incluidas N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa, catalizados por glicosiltransferasas específicas (27-28).

Otro evento co-traducciona es la agregación de oligosacaridos unidos a los aminoácidos serina ó treonina de las subunidades- α libres ó no unidas. Aparentemente la subunidad- α , en ausencia de una subunidad- β parece conformacionalmente diferente para permitir la agregación de los azucares unidos a serina y treonina (O-unidos) (29-30).

Es bien conocido que los oligosacaridos incorporados dentro de las hormonas glicoproteicas son importantes para algunos aspectos únicos de la función hormonal, ya que se ha encontrado consistentemente que la distribución y secreción de las glicofomas de FSH intrapituitaria cambian durante condiciones fisiológicas específicas, tales como la pubertad y el ciclo ovárico, indicando que el pleomorfismo de FSH es un fenómeno hormonalmente regulado.

A este respecto, se ha reportado que la actividad de algunas glicosiltransferasas (ej. sialiltransferasas y GalNAc-transferasas) y manosidos pueden ser modulados a nivel de la pituitaria por las hormonas tiroideas y los estrógenos, de este modo se afecta la sialización y sulfatación de todas las hormonas glucoproteicas en la pituitaria (31-32). Por lo tanto, las isoformas de LH y FSH tienen mayores cambios durante el periodo preovulatorio, en el cual hay una menor vida media, donde además se observan menores cantidades de isoformas sializadas, contrario a esto, más isoformas sializadas se encuentran en estados de hipoestrogenismo. Ante este hecho las observaciones muestran que después de la ovariectomía, la actividad de N-acetilgalactosamina transferasa y sulfotransferasa aumentan en gran proporción, lo cual origina mayor LH con oligosacaridos terminados con la secuencia GalNAc-4-SO₄, pero la administración de estrógenos regresa la actividad de estas transferasas a niveles basales (33-34). La sulfatación terminal favorece la eliminación de las gonadotropinas de la circulación, así la presencia de N-acetilglucosamina acelera esta eliminación por receptores específicos presentes en las células reticuloendoteliales hepáticas de Kupffer que unen glicoproteínas sulfatadas, en contraste, el ácido siálico disminuye la captura hepática y consecuentemente la degradación de la molécula sializada, así la vida media de FSH es por esto mayor que la de LH, ya que sus oligosacaridos terminan principalmente en sulfato (35-36). Las variantes de FSH con menos sialización son más potentes que las formas fuertemente sializadas para inducir la proliferación de las células de la granulosa y prevenir la atresia folicular. En esta forma, los carbohidratos son el mayor componente estructural de FSH, que corresponde a un exceso de 30% en la masa de la hormona.

Hasta ahora no se sabe cual es la traducción bioquímica y fisiológica de las variaciones estructurales de las isoformas moleculares, así como los factores que la determinan, con lo que se hace patente la interdependencia entre el nivel de estrógenos circulantes y el tipo de gonadotropinas que se secretan por la hipófisis (37-39), estas son algunas razones por las que se han emprendido estudios sobre los cambios fisiológicos a nivel molecular durante el climaterio.

La amplia variabilidad en la composición de oligosacáridos constituye la principal base química para la formación de isoformas y la gran heterogeneidad molecular observada en cada hormona, que afecta invariablemente la unión de la hormona con su receptor. Los receptores para estas hormonas tróficas pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G ó proteínas reguladoras unidas a GTP (guanosin trifosfato), por lo que los receptores de cada hormona comparten múltiples rasgos distintivos en su estructura mayor (40-41). Las células de la granulosa son las células blanco para la acción de FSH y estas son únicamente el tipo de célula que expresa el receptor de FSH en la hembra. En el ovario, FSH regula la función de la célula de la granulosa, incluyendo el desarrollo y selección de los folículos ováricos, maduración de los oocitos y junto con LH el proceso ovulatorio. La activación de los receptores proteicos inician una cascada de eventos que son amplificados en cada uno de los relevos de las señales de la vía de comunicación y que culminan en una elevada sensibilidad y respuesta celular específica. Hay amplia evidencia que sugiere el hecho que las dos subunidades hormonales hacen contacto con el receptor para iniciar su mensaje. Los estrógenos inhiben la síntesis de la subunidad- α de FSH por un mecanismo que

es independiente de la unidad promotora para la unión al receptor de estrógenos. En contraste el gene de FSH- β confiere una alta afinidad en los sitios de unión al receptor de estrógenos en su región 5'. Los cambios en la concentración de FSH y LH durante el climaterio se han determinado con toda precisión, pero es importante conocer si las isoformas moleculares de estas gonadotropinas cambian a través del tiempo y si guardan relación con el climaterio, ya que existe el concepto que la concentración de estrógenos regula tanto la producción de gonadotropinas como el grado de glicosilación, con base en que otras glicoproteínas sufren cambios estructurales con relación al ambiente hormonal del momento, por esto se piensa que las formas moleculares de gonadotropinas también cambian con relación al estado hormonal que predomina en el climaterio ya que típicamente corresponde a un descenso paulatino de la concentración de estrógenos, así en monos la ovariectomía es seguida por cambios en las propiedades de LH y FSH pituitaria, lo cual muestra un ligero incremento en el tamaño molecular y tardan más en ser eliminados de la circulación (42-45). Se ha demostrado que los esteroides sexuales (estradiol, testosterona y progesterona) también regulan la producción de FSH- β y secreción de FSH en una gran variedad de condiciones experimentales, así en las ovejas ooforectomizadas el tratamiento con estradiol disminuye la concentración de FSH- β mRNA (46-47). Las dos subunidades están asociadas no-covalentemente y las unidades individuales son biológicamente inactivas, así las regiones variables son las que confieren especificidad inmunológica y biológica a la hormona, además FSH está internamente unida por seis uniones disulfuro (48). Los oligosacáridos unidos a la subunidad- β juegan un papel crítico en la determinación del

ensamblaje específico de ambas subunidades, así como en el proceso que ocurre después de la formación de dímeros.

El climaterio se caracteriza por que aparecen síntomas tan variados a consecuencia de esta depleción hormonal tales como: insomnio, palpitaciones, cefalea, vértigo, alteraciones en la temperatura corporal, aumento de peso, mialgias y artralgias, así como trastornos psicoafectivos: ansiedad, depresión, irritabilidad, angustia, desesperación, dificultad para concentrarse y mantener la atención, falta de energía, fatiga fácil, olvidos, melancolía, tristeza y pérdida de la autoestima, también se presentan cambios en la actividad sexual, como son la disminución de la libido, falta de lubricación vaginal, dispareunia, disorgasmia y síntomas urogenitales.

Se han desarrollado múltiples opciones terapéuticas para ofrecer diversidad en la terapia estrogénica, para utilizarlos con base en el criterio de selección ya que la terapia hormonal (TH) debe ser individualizada y dinámica, tomando en cuenta las características obstétricas y sociodemográficas de las mujeres. Así, recientemente se cuenta con un esteroide conocido como tibolona (7a, 17a)-17-hidroxi-7metil-19-norpregnen-5(10)-eno-20-ien-3ona (Org OD 14), que posee una actividad estrogénica y en forma adicional una leve acción progestagénica y androgénica. Pertenece a la familia de los 19-nortestosterona, es metabolizado en tres isómeros esteroideos con una variabilidad que permite propiedades estrogénicas, progestagénicas y androgénicas, de tal forma que estos metabolitos difieren en su actividad y dominancia de acuerdo a el tejido blanco. Por lo tanto, la tibolona tiene efecto estrogénico sobre hueso y síntomas vasculares, pero induce atrofia del endometrio por la

conversión local a través de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa a su isomero Δ^4 progestacional. Además, a las dosis estándar es efectivo en la inhibición de la proliferación de células mamarias in vitro, así como también a corto plazo mejorar la resistencia a la insulina. Este fármaco ha demostrado tener un rápido efecto benéfico sobre el estado afectivo y emocional, así como de la gratificación sexual y la sintomatología sistémica que acompaña a la menopausia (49-50) pero aún se desconoce su efecto a nivel molecular, por lo que es necesario hacer su comparación con los estrógenos naturales utilizados de forma habitual en la menopausia.

En relación a los cambios a estos tres niveles en que actúa la tibolona, se sabe que las concentraciones de andrógenos disminuyen en 10% en la vida adulta comparado con las adolescentes, por lo que inclusive la dehidroepiandrosterona se ha utilizado como un marcador de la edad, además esta disminución se asocia con aumento del catabolismo que sucede de la edad joven a la de vejez. En animales de experimentación se ha observado que ocurren ligeros cambios en las propiedades de las formas circulantes de FSH y LH, después de modificarles la retroalimentación negativa de los esteroides. Así, en ratas la administración de andrógenos incrementa la actividad biológica de FSH y reduce la proporción de eliminación de la circulación. En monos Rhesus, la ovariectomía es seguida por cambios en las propiedades de LH y FSH, lo cual ocasiona un ligero aumento en el tamaño molecular y también su eliminación de la circulación es más lenta. Por otro lado, el reemplazo estrogénico en animales castrados, incrementa el tamaño molecular de FSH y LH en la

hipófisis, pero este tamaño se reduce por la digestión de los extractos de la hipófisis con neuraminidasa para remover el ácido siálico de las gonadotropinas. Además, FSH regula la expresión de su propio receptor y el de LH en las células de la granulosa, en forma dosis-dependiente, ya que se han encontrado concentraciones elevadas de mRNA del receptor y después de la ovulación disminuye esta transcripción, por lo tanto este mecanismo requiere de estradiol y es inhibido por los andrógenos (51-52). Esto resulta por lo complejo del mecanismo intraovárico, donde los estrógenos inhiben la producción de andrógenos ováricos, por bloquear directamente la conversión de progestinas C₂₁ hacia andrógenos C₁₉. Por otro lado, los andrógenos tienen la capacidad de promover la actividad de aromatasa estimulada por gonadotropinas en las células de la granulosa, pero altas concentraciones foliculares de 5 α -reductasa de andrógenos, así como dehidrotestosterona pueden actuar como inhibidores competitivos de la actividad de aromatasa en las células de la granulosa. Por otro lado, en ausencia de gonadotropinas, los andrógenos promueven la atresia folicular y antagonizan el aumento en el peso de los ovarios asociado a estrógenos.

La interacción de FSH con el receptor involucra el reconocimiento inicial de la región externa de la porción terminal de NH₂, por múltiples y discontinuas regiones (aminoácidos 1-15, 71-85 y 101-111) de la subunidad- β de FSH alineada en una conformación tridimensional, la estructura particular de esta región y los cambios conformacionales ocurridos por el reconocimiento de la subunidad- β de la hormona, permite la estimulación del receptor después de una orientación propia y la posición de las regiones específicas localizadas en ambas subunidades del dímero dentro del sitio de

activación del receptor definida por las hexosas y las regiones transmembranales del receptor. La glicosilación del receptor de FSH no está involucrado directamente en la unión de la hormona, el receptor requiere estrictamente al menos un sitio de unión N glicosilada para plegarse adecuadamente y lograr en la membrana su expresión y función (53-54). Aunque se ha propuesto que la expresión de las isoformas truncadas ó alteradas puede representar un mecanismo a través del cual la célula regula y define el tipo específico de respuesta a la señal de FSH.

Al remover los grupos de carbohidratos unidos a la estructura de la molécula, se reduce en forma importante la habilidad de las hormonas para activar las células blanco en el ovario porque tiene poco efecto sobre el sitio de unión en su receptor. Los carbohidratos unidos a la subunidad- α , pero no los que se unen a la subunidad- β de una hormona son críticos para la activación del receptor asociado a su proteína G acoplada al sistema de señales. Estas proteínas G unidas a los receptores de superficie median la acción intracelular a través de la activación de una ó más guaninas unidas a nucleótidos traductores de señales a proteínas (proteínas G). Una de las características de los receptores de FSH y LH es que se acoplan al sistema de señales de proteína G que activan el sistema de proteína cinasa A. Las proteínas G son heterodímeros formados de una subunidad- α estimuladora la cual tiene actividad GTP-asa, unida a un complejo formado de una cadena β y una γ . La activación del receptor induce cambios conformacionales en su estructura, así la formación del complejo gonadotropina-receptor origina el reemplazo de guanosin difosfato por GTP unido a la subunidad- α , lo que lleva a la disociación de la subunidad- α de la

proteína G del complejo $\beta\gamma$ (55-56). La subunidad- α libre se une a la adenilato ciclasa, lo cual convierte adenosin trifosfato en AMPc, incrementado estos niveles a nivel intracelular, que activa finalmente la proteína cinasa A. Esta proteína cinasa A modula la función de una gran variedad de proteínas intracelulares a través de la fosforilación específica de los aminoácidos de serina y treonina. Esto indica que AMPc es el principal mediador en la acción del receptor de FSH y LH, aunque también se ha observado que ocurre activación de las señales mediadas por la proteína cinasa C, lo cual utiliza fosfolípidos de membrana para producir inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El InsP3 causa la liberación de calcio secuestrado dentro del espacio intracelular, incrementando las concentraciones de calcio en el citoplasma, además el DAG activa la proteína cinasa C (57-58).

La caracterización de las bases moleculares de la interacción de FSH con su receptor y la traducción de esta señal es importante desde el punto de vista clínico, ya que puede permitir el desarrollo y producción de una variedad de análogos potencialmente útiles para regular en forma exógena la función gonadal. El hecho que los carbohidratos presentes en las gonadotropinas juegan un papel importante en la activación del receptor y señales de transducción, también ofrece medidas alternativas para el diseño de análogos. Por todo lo anterior en términos generales, es importante concentrar la atención en las mujeres climatéricas a través de la TH, que persigue cumplir con dos objetivos, uno de ellos es aliviar los síntomas que aparecen al descender los niveles de estrógenos en la circulación y el otro es evitar los problemas que pueden aparecer a largo plazo por la deficiencia crónica de estrógenos (59-60) y con

ello elevar la calidad de vida para esta población, por las complicaciones sistémicas secundarias a estos cambios hormonales. Todo lo anterior hace evidente que aún son necesarios mayores estudios sobre las glicoformas de FSH y LH para asignar un papel fisiológico a la glicosilación alternativa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En modelos animales en condiciones de hipoestrogenismo el porcentaje de glicosilación aumenta, lo cual se revierte con la administración de estrógenos.

La postmenopausia es una etapa dentro de la vida femenina que involucra grandes cambios, entre los que destacan el estado hipergonadotropinémico, lo cual ofrece un ambiente hormonal adecuado para el estudio de los cambios en la glicosilación de gonadotropinas, ya que las altas concentraciones permite la separación en tres fracciones de acuerdo a la cantidad de glicosilación para su estudio, sin perderse la capacidad de detección hormonal.

Por lo anterior, se ha planteado el estudio de los cambios sistémicos de FSH y LH en la circulación, para tratar de identificar el efecto de los estrógenos sobre la regulación en la glicosilación de las gonadotropinas en las mujeres postmenopáusicas, a través de la sustitución con estrógenos conjugados y con tibolona, lo cual permitirá conocer si revierten en la misma proporción los cambios presentes en la glicosilación de las gonadotropinas. Por lo que consideramos importante comparar las formas moleculares glicosiladas predominantes en la postmenopáusia y luego de la terapia hormonal con uso de estrógenos conjugados y de tibolona.

JUSTIFICACION

En nuestro país existen alrededor de 5 millones de mujeres postmenopáusicas (2). Hasta el momento no ha sido posible precisar el inicio de los cambios en la glicosilación asociados a las complicaciones tempranas y tardías. Por lo anterior, es importante establecer cuales cambios de la postmenopausia revierten durante la terapia hormonal con el uso de estrógenos conjugados y con un esteroide reciente como la tibolona, para tratar de identificar en que momento los cambios moleculares de las gonadotropinas se asocian a la sintomatología presente en este periodo de la vida.

HIPOTESIS

La glicosilación de las formas moleculares de gonadotropinas hipofisarias tienen un porcentaje menor en las mujeres postmenopáusicas que utilizan tibolona como terapia hormonal por la actividad androgénica asociada, comparado con el perfil de glicosilación de las mujeres que utilizan estrógenos conjugados.

OBJETIVO

Cuantificar las formas moleculares de gonadotropinas hipofisarias en tres grados de glicosilación en las mujeres durante la postmenopausia y después del uso de terapia hormonal con tibolona y con estrógenos conjugados

MATERIAL Y METODOS

Población de estudio.

Se estudió un grupo de mujeres en diferentes etapas de la vida, que para fines de estudio se subdividió en cuatro grupos que comprendieron a la etapa reproductiva con ciclos ovulatorios y menstruales normales, etapa postmenopáusica y la etapa postmenopáusica con uso de terapia hormonal, este último grupo se subdividió en pacientes que usaron estrógenos conjugados y quienes usaron tibolona; las mujeres fueron captadas en la consulta externa de ginecología endocrinológica del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 del Centro Médico "La Raza", a las cuales se les realizó el seguimiento en la Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Grupos de estudio.

Mujeres jóvenes con ciclos ovulatorios y menstruales normales.

Definición conceptual: es el periodo en el que las mujeres tienen ciclos ovulatorios normales, determinado clínicamente por que los periodos menstruales se han presentado por lo menos durante los tres ciclos previos, sin asociarse a ninguna otra sintomatología perimenstrual.

Definición operacional: se consideró a las mujeres que tenían edad entre 20 a 35 años y que no cursaban con trastornos menstruales, confirmando previamente que no existieran otros trastornos orgánicos (ej. miomatosis uterina, endometriosis, adenomiosis). Se realizó la confirmación hormonal en los días preovulatorios, con determinación de FSH, LH y Estradiol (E₂), donde se esperaba encontrar concentraciones de FSH 10-32 mUI/mL, LH 5-50 mUI/mL y E₂ 120-320 pg/mL, considerados como concentraciones normales. Además se hicieron determinaciones de progesterona en el día 21 del ciclo donde se esperaban concentraciones de 5-20 ng/mL, para confirmar la ovulación en el ciclo de la toma de muestra.

Categorías: presencia o ausencia de opsomenorrea y amenorrea
concentración de LH, FSH, E₂

Escala de medición: nominal
cuantitativa continua (mUI/mL, pg/mL)

Mujeres postmenopáusicas sin terapia hormonal.

Definición conceptual: periodo posterior a un año, en que se presentó el último ciclo menstrual, acompañado de sintomatología caracterizada por cambios vasomotores (sofocos, bochornos, irritabilidad, nerviosismo, insomnio).

Definición operacional: se consideró dentro de este periodo a las mujeres que tenían más de 46 años de edad, con 12 meses por lo menos de haber presentado su última menstruación y presentaban sintomatología vasomotora característica de esta etapa. En las que además se descartó la posibilidad que la suspensión de la menstruación no haya sido atribuible a otra causa (desnutrición, histerectomía, pérdida de endometrio por síndrome de Asherman). La determinación de la concentración hormonal se esperaba fuese FSH alta, LH alta y E2 bajo, de acuerdo a las concentraciones consideradas como normales anotadas en el primer grupo.

Categorías: presencia o ausencia de ciclo menstrual
concentración de FSH, LH y E2

Escala de medición: nominal
cuantitativa continua (mUI/mL, pg/mL)

Mujeres postmenopáusicas con uso de terapia hormonal.

Definición conceptual: es el periodo en que la mujer cursa con franco periodo postmenopáusico de más de un año de evolución y tienen sintomatología sistémica establecida, caracterizada por melancolía, pérdida de la autoestima, olvidos, llanto fácil, trastornos cardiovasculares y osteoporosis, mejoradas por la terapia hormonal.

Definición operacional: se consideró dentro de este periodo a las mujeres que tenían más de 46 años de edad, con la sintomatología climatérica remitida con el uso de terapia hormonal para control de esta etapa. Con la determinación hormonal se esperaba encontrar concentraciones de FSH, LH bajos y E2 normal, de acuerdo a la concentración considerada como normal.

La TH con estrógenos conjugados (Premarin) se utilizó a dosis de 0.625 mg por vía oral, administrada todos los días por la noche en forma continua.

La TH con uso de tibolona (Livial) se dosificó a 2.5mg por vía oral por la noche, también administrada todos los días sin interrupciones. En ambos casos de TH se utilizó por un periodo de 6 meses en que se han establecido los cambios en la glicosilación.

Categorías: presencia ó ausencia de amenorrea
concentración de FSH, LH, E2

Escala de medición: nominal
cuantitativa continua (mUI/mL, pg/mL)

METODO

Cromatografía en Concanavalina A.

Se procedió a realizar la separación de las formas moleculares utilizando la concanavalina-A (Con-A), lectina que permite la separación de las formas moleculares de gonadotropinas en tres fracciones de acuerdo a su grado de glicosilación : a) formas que se unen fuertemente a la lectina, b) formas que se unen débilmente a la lectina y c) formas moleculares que no se unen a lectina. Las formas de alto grado de ramificación (triantenarias y bisectadas) las cuales no se unen a lectina, así como las formas débilmente retenidas, compuestas por cadenas de oligosacáridos biantenarias y truncadas son grupos de formas que han completado la incorporación de residuos de azúcar en las cisternas del aparato de Golgi, mientras que las isoformas fuertemente retenidas por la lectina, son cadenas de carbohidratos de alto contenido en manosa y de tipo híbrido que no han completado su procesamiento en el aparato de Golgi. Por lo tanto, la cromatografía por afinidad en Con-A, permite la caracterización de las cadenas carbohidratadas internas al ácido siálico.

Se empleó la técnica descrita previamente (61), donde se utiliza Con-A en columnas de vidrio de 0.6X15 cm, conteniendo 2.5 ml de gel con lectina inmovilizada (Concanavalina A conjugada para Sepharose 4B, Sigma Chemical Co), equilibrada con buffer de equilibrio de Con-A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 0.5 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM) (apéndice 1). Las muestras (0.350 ml de suero, correspondientes a 21-23 mg de proteínas totales como máximo) se siembran en la columna y se les permite interactuar con la lectina por 30 min. Las formas que no interactúan

con la lectina son eluidas con 7 ml de buffer de equilibrio de Con-A (isoformas no unidas : NU). Posteriormente, 0.5 ml de buffer con 10 mM methyl- α -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Co.) se aplica dentro del gel e incuba por 1 h. Se agregan 7 ml del mismo buffer y el material debilmente unido (DU-ConA) se colecta. Finalmente, 0.5 ml de buffer con 0.25 M methyl- α -D-mannopyranoside (Sigma Chemical Co.) se agrega a la columna e incuba por 1 h. Una suma adicional de 7 ml se agrega y las fracciones firmemente unidas (FU-ConA) conteniendo las fracciones de gonadotropinas se colectan. Estas fracciones son colectadas a una velocidad de flujo de 16 gotas/min, para obtener volúmenes de 0.75 mL. Todo el procedimiento debe llevarse a cabo a 4°C (62-63). Las eluciones que contienen las fracciones no unidas, debilmente unidas y firmemente unidas de las isoformas de gonadotropinas se concentran usando membranas Centriprep (Amicon, Beverly, MA) y en cada una de ellas se determina la concentración de FSH y LH por el ensayo de quimioluminiscencia utilizando un sistema automatizado Immulite (Diagnostic Products Co. Los Angeles, CA) que se basa en la obtención de energía luminosa a partir de la reacción química entre una enzima que es la fosfatasa alcalina y uno de sus sustratos, el fosfato de dioxetano, este es un compuesto inestable que al reaccionar, pierde el grupo fosfato emitiendo luz. Esta señal es amplificada unas cien veces obteniéndose una gran sensibilidad en el orden de picogramos. Este método tiene una sensibilidad de 0.7 mUI/mL para LH y 0.1 mUI/mL para FSH, con un coeficiente de variación intraensayo de 6.7 % y 3.7 % respectivamente. La reacción es estable y se mantiene por más de 30 min, además por ser un inmunoensayo se basa en la unión entre un antígeno y un anticuerpo específico y cualquiera de ellos puede

ser marcado por el compuesto quimioluminiscente. Se guardarán alicuotas (1 a 3 mL) del suero de las mujeres en estudio para la utilización en cada uno de los experimentos a realizar.

No se esperan variaciones de las formas moleculares de la misma persona en estudio, ya que el estado hormonal es constante y no se ha encontrado variación en cada paciente, así como tampoco entre cada integrante de un mismo grupo (45).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

SUERO: Dializar contra solución fisiológica durante 90 minutos, haciendo un cambio de la solución a los 45 minutos. Se dializa a 4°C (en cámara fría) con agitación constante. Membranas de diálisis: cut-off 12000 (SIGMA).

Relación suero/buffer: 2 ml suero/350-400 ml de buffer.

CROMATOGRAFÍA:

-Volumen máximo de siembra: 0.6 ml.

-Máxima concentración de proteínas totales: 21 mg para 2.5 ml de lectina. Esto equivale a 0.35 ml de suero.

-Mínima cantidad de FSH que se necesita sembrar para obtener una buena recuperación: 200 ng LER 907 para suero ó fracciones post-Rotofor; 0.25 mg para FSH recombinante.

-Buffers: Equilibrio

Glucósido 10 mM

DEGASEADOS Y NO

FRÍOS

Manósido 100 mM

Flujograma del procedimiento (anexo 2).

PROCESAMIENTO DE LAS FRACCIONES ELUÍDAS DE LA COLUMNA.

Las fracciones deben purificarse de los ácidos libres el mismo día.

Para ello se dializan de la siguiente manera:

-Se arman bolsas de diálisis usando la membrana de diálisis gruesa para las fracciones de 7 ml (aprox. 14 cm de membrana/fracción); ó membranas finas para fracciones de 1 ó 2 ml (aprox. 22 cm de membrana/fracción de 2 ml).

-Se dializa contra solución fisiológica a 4°C (en cámara fría con agitación constante) realizando los siguientes cambios de la solución de diálisis:

1° DIA: toda la noche (el mismo día que se guarda la columna).

2° DIA: 1° cambio

3 horas

2° cambio

1 hora

3° cambio

1 hora

4° cambio

1 hora

-Cortar la diálisis

-Concentrar si fuera necesario (ver protocolo de concentración).

CONCENTRACIÓN

Concentradores: CENTRIPEP 10

Cut-off: 10000 MW

Capacidad de muestra: 15 ml

Volumen final concentrado: 0.6 - 0.7 ml (máximo)

Fuerza de centrifugación máxima: 3000 g

Preparación: Cuando los concentradores son nuevos se procede de la siguiente manera:

-Se llenan con H₂O deionizada hasta el volumen máximo y se dejan toda la noche en refrigeración.

-Al día siguiente, se centrifugan 2-3 veces por periodos de 10 minutos a 2800 rpm cambiando el H₂O entre cada centrifugación.

Protocolo de concentración:

-Se coloca la muestra a concentrar en la parte externa del concentrador y se cierra el mismo.

-Se centrifuga la muestra por periodos de 10 minutos a 2800 rpm, vaciando el filtrado cada vez.

ALMACENAMIENTO:

Los concentradores se guardan en la cámara fría sumergidos en H₂O deionizada. Si no se van a usar por mucho tiempo, se sumergen en azida 0.1% (en H₂O deionizada).

La membrana no debe secarse en ningún momento.

LUGAR DEL ESTUDIO

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas,
Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio longitudinal, comparativo de casos y controles

A las mujeres climatéricas que presentaron la evidencia de trastorno en el perfil hormonal, no se les modificó intencionadamente su variable de estudio hasta después de tomar la muestra a estudiar en caso de necesitar TH. Con las muestras de sangre obtenidas de cada paciente se formaron alícuotas y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el estudio en forma independiente de las pruebas hormonales y los experimentos de glicosilación de las gonadotropinas. Los experimentos en el suero de cada paciente fueron analizados de forma individual y se llevó a cabo independientemente de la etapa de la vida en cada grupo de estudio, posteriormente a través de cromatografía por afinidad en Con-A se describió la isoforma molecular predominante de las gonadotropinas y los cambios en la glicosilación, para compararlos entre cada grupo de mujeres en estudio.

TIPO DE ESTUDIO

Experimental

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluyeron 10 pacientes por cada etapa de la vida en estudio, lo que hace un total de 30 pacientes, establecidas como tamaño de muestra previos al inicio del estudio, por considerar la labor estrecha en el seguimiento de las pacientes y la bondad del estudio experimental, donde se quiere confirmar la consistencia en la repetición de los resultados. El grupo con ciclos menstruales normales lo integraron 10 pacientes, otras 10 pacientes postmenopáusicas recibieron estrógenos naturales con determinaciones basales y control a los 6 meses de terapia, finalmente otras 10 pacientes postmenopáusicas recibieron tibolona con determinaciones basales y uso de TH también por 6 meses para realizar las determinaciones. El tiempo de realización de cada cromatografía por paciente impide un estudio que incluya más mujeres, además que el número de muestras por etapa solamente nos sirvió para evaluar que representen similitud de las formas moleculares en cada repetición del experimento por cada grupo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Mujeres que esten de acuerdo en ingresar al estudio

Edad entre 20 a 55 años

Mujeres que no hayan recibido TH previamente

Mujeres que presenten sintomatología característica del climaterio

Mujeres a las que se les determine cambio hormonal en correspondencia con la etapa de la vida a la que pertenecen

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Mujeres que aún presenten periodos menstruales irregulares

Mujeres con menopausia quirúrgica (histerectomía, ooforectomía bilateral)

Mujeres que lleven medidas profilácticas (ejercicio, dieta especial, fisioterapia) para mejorar el estado orgánico y psicológico durante el climaterio

Mujeres que presenten enfermedades sistémicas ó que tengan ingesta crónica de medicamentos, tales como ranitidina, clomifeno, cloroquina, esteroides.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Mujeres que reinicien con sangrados menstruales, aunque sean irregulares

Mujeres con presencia de ovarios poliquísticos, confirmados por ultrasonido ginecológico

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Las mujeres postmenopáusicas fueron captadas en la consulta externa de ginecología-endocrinológica de la UMAE No. 3 del CMR y enviadas al hospital de especialidades donde se encuentra la Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas del CMN S-XXI, una vez allí se les informó verbalmente en detalle, de la importancia del estudio y la necesidad de su consentimiento para tomarles a cada paciente una muestra de 10 mL de sangre, además de las muestras que se necesitan para su control hormonal y exámenes básicos. La muestra se dividió en dos tubos de 5 mL, lo cual se obtuvo en una sola punción a través de un vacutainer de la vena cubital. Todas las muestras se obtuvieron aproximadamente a las 8:00 am, esto evitó los posibles cambios que se pudieran presentar en las concentraciones hormonales debido a los diferentes horarios de punción y que en consecuencia harían imposible interpretar los resultados. Las pacientes iniciaron en beneficio la TH como medida para mantener una mejor calidad de vida, además se les informó de los resultados obtenidos al concluir el trabajo (anexo 1). Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, para separar el suero, que permaneció guardado en alicuotas a -20 C, hasta tener el total de muestras necesarias para iniciar el corrido cromatográfico, las muestras se procesaron de acuerdo al número secuencial que se les asignó, de acuerdo al ingreso de las mujeres al estudio, es decir, no se analizaron por etapas para evitar con esto el posible sesgo sistemático. Las cromatografías en Con-A, se utilizaron solo como una herramienta de separación de fracciones, que permitió analizar el desplazamiento de las formas moleculares de acuerdo a la glicosilación y se llevó a cabo por el investigador principal, para mantener la homogeneidad en el criterio de la técnica de laboratorio, con lo que se evitó resultados irregulares en cada muestra, por otro lado existe el apoyo de equipo de laboratorio computarizado con los que se hicieron las lecturas de las fracciones obtenidas, lo que impide la manipulación de los resultados obtenidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó con análisis de varianza de dos vías, en donde el factor uno fue la forma molecular predominante de acuerdo a la cantidad de glicosilación y el factor dos fue cada grupo de estudio.

Además, para determinar la isoforma predominante en cada fracción se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión.

Todo el análisis para una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$

ASPECTOS ÉTICOS

Se solicitó firma de la carta de consentimiento informado y por escrito de participación, a las mujeres postmenopáusicas que decidieron ingresar al estudio (anexo 2), ya que se obtuvo sangre venosa en una cantidad mayor a lo habitual para la realización de sus exámenes de control hormonal, lo que involucraba una cantidad de 10 ml más para nuestro estudio. Las mujeres que necesitaron TH de acuerdo a los resultados hormonales basales se les indicó tratamiento y vigilancia médica posterior a la toma de la muestra sanguínea, ya que posteriormente no se ocupó de su participación en el estudio y obtuvieron el beneficio de iniciar su TH.

FACTIBILIDAD

El estudio fue factible, ya que se cuenta con una población que acude a tercer nivel de atención, enviadas de los hospitales de referencia cuando inician con los cambios y trastornos psicossomáticos del climaterio, para su evaluación y posterior control desde el punto de vista endocrinológico. Las mujeres llegan sin haber recibido previamente ningún tratamiento, ya que aún predomina en el criterio de medicina tradicional la idea que el climaterio es un hecho fisiológico y al cual no se debe intervenir, por lo que se deja en la mayoría de los casos a las mujeres sin el beneficio de la TH, con lo anterior es fácil todavía en estos días encontrar en la consulta externa a una gran cantidad de mujeres en la postmenopausia ó en cualquiera de sus etapas sin haber recibido el beneficio previo de la TH.

RECURSOS

En la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Endocrinas existe el material y recursos físicos, así como el personal capacitado para realizar determinaciones hormonales, además para dar inicio a la separación de las isoformas a través de cromatografía por afinidad en Con-A. El personal esta reconocido a nivel internacional por sus múltiples trabajos en el área hormonal y por sus publicaciones de control de calidad en la técnica, los cuales asesoraron al autor principal para la realización y control de calidad en la técnica de cromatografía. Así mismo, los recursos financieros para montar la técnica, comprar reactivos y columnas estan considerados dentro de los gastos habituales para las líneas de investigaciones básicas de la unidad.

RESULTADOS

Usamos cromatografía por afinidad en Con-A para comparar los cambios de las gonadotropinas circulantes en la postmenopausia con dos condiciones terapéuticas. Este método es el más efectivo y aprobado actualmente para separar fracciones de oligosacaridos unidos a asparagina de acuerdo a su estructura, lo cual facilita el estudio de las hormonas glicoproteicas, ya que la Con-A es una proteína que tiene la capacidad de unirse específicamente a los carbohidratos de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, ya que reconoce sitios de unión hidrogeno localizados en la estructura del oligosacarido. La efectividad para obtener estas fracciones es debido a la variación en la afinidad relativa de las diferentes estructuras de oligosacaridos para unirse a la Con-A, pero además esta unión puede separarse por desplazamiento utilizando una osmolaridad mayor donde un carbono es oxidado a grupo carboxilo, por lo que este método de afinidad a las bases estructurales puede utilizarse con seguridad para obtener fracciones de glicoproteínas.

Validación del procedimiento.

Se evaluó el patrón cromatográfico de proteínas totales en suero, eluidas de una columna con Con-A, la muestra empleada tenia elevadas concentraciones de proteínas determinadas previamente. La figura 1 muestra el patrón de concentración de proteínas determinadas por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Cada punto representa la recolección de 1 ml de elusión donde se observa que al iniciar la separación de la primera fracción (tubos 1 al 12), la concentración de las proteínas no unidas inicia su salida

de la columna y esta concentración es descendente en cada tubo de la separación por elusión. Al agregar glucósido a la columna e iniciar la separación de la segunda fracción (tubos 13 al 24), se obtienen concentraciones también descendentes hasta obtener el total de las proteínas débilmente unidas a la Con-A y después de agregar manósido a la columna y dejarlo interactuar se obtuvo la tercera fracción (tubos 25 al 36), donde se recolectaron el resto de las proteínas que habían permanecido fuertemente unidas y la elusión fue descente hasta obtener el tubo sin proteínas.

Recuperación hormonal.

Para determinar el total de recuperación de FSH y LH, se establecieron las concentraciones hormonales de una muestra conocida para identificar la cantidad de hormona que entraba a la columna de cromatografía y la cantidad que se obtenía, así se realizó la recuperación de las tres fracciones en Con-A, donde se obtuvo para FSH de 26.4 mUI/mL al iniciar la cromatografía una concentración recuperada de 25.1 mUI/mL, que corresponde al 95.1% de la hormona total sembrada en la columna. Para LH con una concentración inicial de 63.9 mUI/mL se recuperó una concentración de 61.3 mUI/mL, que corresponde al 95.9% del total de la hormona determinada previamente (figura 2). Estos porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los parámetros aceptados para el análisis y validación de las isoformas hormonales estudiadas.

Comparación de los grupos de estudio.

Se formaron los grupos de pacientes en base al planteamiento del estudio, donde un grupo quedo integrado por 10 pacientes jóvenes en etapa reproductiva a quienes se les tomó muestra de sangre en la fase folicular para evaluar las concentraciones hormonales y el perfil de cromatografía en Con-A. Otro grupo quedó integrado por 20 pacientes postmenopáusicas a quienes también se les tomó muestra de sangre para las determinaciones hormonales antes del inicio de la TH, posteriormente se dividieron en dos subgrupos de 10 pacientes que iniciaron la TH, como se muestra en la distribución de la tabla 1, donde además se observa que los dos grupos de pacientes postmenopáusicas al inicio de la terapia fueron similares en la edad y antecedentes obstétricos sin diferencias estadísticamente significativas. La TH se administró a dosis estandar con estrógenos conjugados (Premarin 0.625mg) en 10 pacientes y las otras 10 pacientes iniciaron Tibolona (Livial 2.5mg), en ambos grupos como dosis diaria por vía oral durante 6 meses, al cabo del cual se les tomó otra muestra de sangre para repetir las determinaciones hormonales y cromatografía por afinidad, estos cambios hormonales de los grupos en estudio se muestran en la tabla 2. Antes del inicio de la TH, las concentraciones hormales de FSH y LH fueron mayores en las mujeres postmenopáusicas comparadas con el grupo de mujeres en fase folicular. Las concentraciones de estradiol en las mujeres menopáusicas fueron <10.0 pg/mL, lo cual aumentó con el uso de estrógenos conjugados a concentraciones consideradas como normales, pero no así con el uso de Tibolona, lo cual coincide con los reportes previos, ya que se sabe no cruzan con las determinaciones hormonales de estradiol,

por lo que a pesar del uso del farmaco las concentraciones de estradiol permanecen bajas.

Respuesta clínica.

Para evaluar la respuesta clínica entre los dos grupos de estudio en la postmenopausia se utilizó la escala de Greene, la cual a través de puntuaciones indica la mejoría de los síntomas de este periodo. Se observa en la figura 3, que la sintomatología en ambos grupos de pacientes fue similar al inicio del estudio, con mejoría significativa después de 6 meses de TH en ambos grupos. Esta mejoría clínica con el uso de estrógenos naturales tuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) después de 6 meses de terapia, pero fue aún mayor esta mejoría ($p < 0.001$) con el uso de Tibolona en el mismo tiempo de uso. También se aplicó la escala al grupo control dentro de la fase folicular para confirmar que la sintomatología fuera mínima comparada con las pacientes menopáusicas en su determinación basal y después de los 6 meses de la TH.

Perfil cromatográfico.

Las cromatografías por afinidad, muestran un perfil descendente para FSH en cada fracción obtenida en el grupo estudiado dentro de la fase folicular, de las cuales el mayor porcentaje se encontró en las formas no unidas (NU), con un descenso en el porcentaje de las formas débilmente unidas (DU) y un porcentaje aún más bajo para las formas fuertemente unidas. El perfil para las fracciones de LH en este mismo grupo dentro la fase folicular mostró un patrón

ascendente al considerar cada fracción obtenida, donde las formas NU de LH fueron las que tuvieron los porcentajes más bajos, con aumento en el porcentaje de las formas DU y predominio en el porcentaje de recuperación de las formas fuertemente unidas (FU). Al considerar los perfiles cromatográficos en los dos grupos de mujeres con terapia, se observó que el perfil cromatográfico se modificó con distribución similar al observado en el grupo con ciclos ovulatorios normales, pero con porcentajes de distribución diferentes tanto para FSH como para LH en cada una de las fracciones obtenidas, por lo que se muestran en forma independiente para cada hormona.

Para comparar las fracciones de FSH en cada grupo estudiado, se muestra la figura 4, donde se observa que los grupos con estrógenos conjugados y con tibolona regresan a concentraciones similares a la fase folicular en la fracción NU sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos, aunque con diferencia significativa ($p < 0.05$) al compararlos con el porcentaje antes del inicio de la terapia. Al analizar los porcentajes recuperados en la fracción DU, se observa con el uso de tibolona una mayor recuperación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararlo con el grupo de menopausia antes del tratamiento y similar al observado en la fase folicular, lo que indica una mejor recuperación que con el uso de estrógenos naturales, el cual no tuvo diferencia estadística comparado con el porcentaje antes del inicio del tratamiento, ya que esta fracción contiene formas ligeramente más glicosiladas comparadas con la fracción NU. En cambio, la fracción FU fue similar entre el uso de estrógenos conjugados y tibolona, pero ambos diferentes ($p < 0.05$) a lo observado en la menopausia sin

terapia hormonal, donde existe un mayor porcentaje de formas glicosiladas.

Al comparar el perfil de LH, se observa en la figura 5 que con el uso de tibolona, la fracción NU tuvo un mayor porcentaje que antes del tratamiento, el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), aunque el patrón de distribución fue similar al observado en los otros grupos. En la fracción DU no hubo ninguna diferencia estadística entre los porcentajes de los grupos estudiados, ya que todos tuvieron una distribución similar; en cambio en la fracción FU hubo un porcentaje menor de recuperación con el uso de tibolona con diferencia estadística ($p < 0.05$) comparado con el porcentaje antes del tratamiento, con una distribución diferente en el perfil cromatográfico, ya que los otros tres grupos restantes de comparación fueron similares entre ellos en relación a su porcentaje, los cuales fueron mayores.

Lo anterior demuestra que existe un patrón de glicosilación diferente al utilizar estrógenos conjugados y tibolona como terapia de reemplazo hormonal en la menopausia, comparado con las concentraciones basales de estas mujeres. La comparación de gonadotropinas circulantes muestran que las formas de FSH más retenidas en Con-A son las DU, indicando una mayor cantidad de oligosacáridos incorporados en la estructura de FSH, por lo que poseen una vida media plasmática mayor y actividad por más tiempo al unirse a su receptor. Así, el porcentaje en las fracciones indica una mayor proporción de cadenas de carbohidratos biantenarias y truncadas después del uso de TH con el esteroide sintético.

DISCUSIÓN

Los cambios moleculares están asociados con el contenido variable de oligosacáridos unidos a la estructura de las gonadotropinas, indicando que cada isoforma puede contener diferente patrón de glicosilación, por lo tanto estas isoformas aunque difieren en mínima proporción, es suficiente para condicionar cambios en la actividad biológica, en la inmunoreactividad y en la vida media plasmática. Este sutil espectro en la glicosilación constituye la base para la formación de isoformas y la extensa heterogeneidad vista en todas las hormonas glicoproteicas.

La importancia en la diferencia de la glicosilación pudiera tener implicaciones sobre la mejoría en la sintomatología, ya que la sialización aunque también altera la potencia biológica, quizás lo verdaderamente importante en la postmenopausia sea la vida media que permite a las gonadotropinas un mayor tiempo de contacto con el receptor y así un efecto biológico por más tiempo aunque con menor actividad, con lo cual la potencia biológica no resulta del todo necesaria, ya que no se busca obtener la función ovárica normal, sino mejorar el estado general de la paciente.

Lo anterior resulta relevante, ya que se han reportado hallazgos que muestran la presencia de receptores de gonadotropinas en diferentes tejidos y no exclusivamente en el ovario. El descubrimiento de receptores para LH en la salpinge y el útero ha sugerido que pueden tener función en estos órganos, así como para el desarrollo de la respuesta sexual secundaria, además a la LH se le han atribuido efectos sobre el sistema inmune, así como en la glándula tiroides y en el riñón. Los bioensayos de FSH han

demostrado la capacidad que tiene para incrementar el peso del ovario, estimular la esteroidogénesis de la granulosa, también la síntesis de activador de plasminógeno y la acumulación del AMP-cíclico en las células de Sertoli, mientras que LH tiene la capacidad de incrementar la síntesis de andrógenos, así como la capacidad de promover la pérdida de ácido ascórbico del ovario ó para inducir la ovulación. Además, en animales de experimentación se ha encontrado expresión de gonadotropinas en el cerebro, lo cual hace concebir la idea que participan en el desarrollo neuronal, lo cual es parte fundamental en la presencia de la sintomatología de la menopausia y quizás tenga alguna participación en la mejoría de estos síntomas, sin embargo esto no ha sido explorado en el humano.

La actividad biológica/inmunológica de las gonadotropinas se sabe que varían dependiendo de otros factores endocrinos, particularmente de las concentraciones de hormonas esteroideas y la estimulación de GnRH. Los oligosacáridos N-unidos parecen tener función en el ensamble de la hormona durante su síntesis, en la eliminación de la proteína del suero y en la iniciación de las señales de transducción una vez que la hormona se ha unido a su receptor. Los oligosacáridos tanto de LH como de FSH terminan en sulfato y ácido siálico, de los cuales el 40% de LH es neutral, el 25% tiene sulfato y ácido siálico y el resto 35% está sializado. Los valores comparables para FSH son de 12% de la hormona es neutra, el 5% tiene tanto sulfato como ácido siálico y el 83% está sializado. Estos cambios le dan estabilidad a las hormonas circulantes y los oligosacáridos tienen una función en la transducción de señales, ya que se ha visto que la habilidad de la

hormona deglicosilada para permitir la transducción de señales es proporcional a su contenido de oligosacaridos, los cuales podrían también facilitar un cambio en la interacción entre la región transmembrana y la región extracelular del receptor.

La eliminación de los sacáridos de la posición Asn52 de la subunidad- β disminuye la secreción, mientras que remover los de la posición Asn78 aumenta la degradación intracelular de la subunidad- α . La eliminación de la glicosilación de la subunidad- β de las posiciones 13 ó 30, así como de ambas disminuye un poco la proporción de secreción de la hormona, además el proceso de ensamble de los heterodimeros no se completa y la hipófisis secreta subunidades libres no combinadas. La N-acetilgalactosamina transferasa, que se encuentra en la hipófisis anterior, hace capaz a la hipófisis de hacer gonadotropinas sulfatadas. La N-acetilgalactosamina transferasa actúa previa a la manosidasa, por lo que la acción de la manosidasa se bloquea y la glicoproteína resultante contiene solo una antena, aunque la mayoría de los oligosacaridos son biantenarios, algunos son triantenarios ó bisectados. Los oligosacaridos triantenarios son los que se encuentran en mayor cantidad en la subunidad- α libre. La secreción de las gonadotropinas de la hipófisis anterior es estrechamente controlado, así estas hormonas entran a la vía de regulación cuando están almacenadas en los granulos de secreción y son liberadas en respuesta a la GnRH, aunque el transporte de LH y FSH hacia estos diferentes granulos, no ha sido completamente entendido. Además, no se sabe cual de los oligosacaridos son los más importantes, así como la razón para que los azúcares sean requeridos en la transducción de señales. La presencia de distintos oligosacaridos en FSH y LH, junto con otros

cambios conformacionales es un determinante directo de las señales intracelulares activadas, por lo tanto en el periodo perimenopáusico, en el cual las concentraciones de gonadotropinas en suero aumentan, el perfil de las isoformas de FSH y LH en sangre pueden tener profundos efectos a nivel del receptor y la actividad celular intrínseca. Además, se ha observado que tanto la N-acetilgalactosamina transferasa y la sulfotransferasa hipofisarias aumentan varias veces después de la ovariectomía, lo que condiciona un incremento en los oligosacáridos de las gonadotropinas, pero la administración de estrógenos regresa la actividad de estas transferasas a concentraciones basales, por lo tanto la administración de fármacos con diferente actividad sobre el perfil de glicosilación pudieran ser de utilidad en mujeres jóvenes después de cirugía ovárica y otras complicaciones como ovarios refractarios, en los que conocer cual es la isoforma que más favorece a la actividad celular ayudaría a una mejor terapéutica. En este estudio se ha encontrado que las isoformas originadas por las variantes en la glicosilación pueden diferir de acuerdo al fármaco empleado, pero a pesar que existen formas de preparar productos terapéuticos con DNA recombinante, los métodos de purificación aún son complicados e impuros, por lo que la administración de fármacos que cambien la glicosilación hormonal podrían ser una variedad útil para la aplicación terapéutica a corto plazo.

Cambios en el patrón de glicosilación de las gonadotropinas puede influenciar la actividad biológica de las hormonas durante la regulación de las gonadas. Los carbohidratos no parecen hacer un contacto esencial con la región de unión extracelular del receptor al momento de unirse, por lo que los sacáridos interactúan con otra

parte del receptor ó se proyectan dentro de la región transmembrana para iniciar los cambios que llevan a la traducción de señales. Aún los mecanismos por los cuales los carbohidratos influyen las habilidades de las gonadotropinas para estimular la actividad de adenil-ciclasa y por lo tanto iniciar la transducción de señales no ha sido aclarado.

A pesar de la potencial importancia que las isoformas hormonales podrían tener en la regulación endocrina y los extensos estudios diseñados para aclarar estas funciones, la importancia fisiológica de las isoformas de las gonadotropinas no ha sido aún establecida, esto se ha debido parcialmente a las dificultades de purificación y caracterización de pequeñas cantidades de las isoformas del plasma. Es necesario un mejor entendimiento de la síntesis de gonadotropinas en el área de agregación de oligosacáridos, lo cual otorgará avances y contribución de cómo es controlada la secreción de diferentes isoformas de las hormonas. Estudios de los detalles en la estructura y función de ambas hormonas ahora son posibles gracias a la metodología actual, este desarrollo permitirá el diseño de pruebas iniciales que pueden ser de utilidad clínica.

Son necesarios más estudios para entender como se llevan a cabo los cambios en la glicosilación y los factores involucrados que originan los cambios de las gonadotropinas, cuando se utiliza TH con estrógenos conjugados y con otros esteroides.

Con estos resultados se puede hipotetizar que las diferencias en la glicosilación entre las isoformas podrían provocar cambios conformacionales particulares en el receptor, lo cual les permitiría activar de manera selectiva diferentes proteínas de la familia G, las cuales son las transductoras de las señales intracelulares.

REFERENCIAS

- 1.- Belchetz P. Endocrinology of the menopause. Practitioner 1990;234:491-493
- 2.- Estadísticas vitales. Secretaría de salud. Dirección nacional de información y estadística. 1993.
- 3.- Fazio AF. A concurrent validation study of the NCHS General Well Being Schedule. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1977;78-1347 (Vital and Health statistics; series 2, No. 73)
- 4.- Holte A, Mikkelsen A. Psychosocial determinants of climacteric complaints. Maturitas 1991;13:205-215
- 5.- Epperson CN, Wisner KL, Yamamoto B. Gonadal steroids in the treatment of mood disorders. Psych Med 1999;61:676-697
- 6.- Furuholm M, Karlgren E, Carlström K. The effect of estrogen therapy on somatic and psychical symptoms in postmenopausal women. Acta Obstet Gynecol Scand 1984;63:655-661
- 7.- Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. Horm Res 1980;36:53-78
- 8.- Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L. Pituitary follicle stimulating hormone heterogeneity: assessment of biological activities of each FSH form. Fertil Steril 1983;40:242-245
- 9.- Sherwin BB, Gelfand MM. A prospective one-year study of estrogen and progestin in postmenopausal women: effects on clinical symptoms and lipoprotein lipids. Obstet Gynecol 1989;73:759-766
- 10.- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. Endocrine Reviews 1994;15:725-751
- 11.- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. Annu Rev Biochem 1981;50:465-470

- 12.- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995;16:765-787
- 13.- Stanton PG., Burgon PG., Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterisation of FSH and LH isoforms. *Mol Cell Endo* 1996;125:133-141
- 14.- Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signals transduction. *FASEB J* 1989;3:1915-1920
- 15.- Keri RA, Andersen B, Kennedy GC. Estradiol inhibits transcription of human glycoprotein hormone alpha subunit gene despite the absence of a high affinity binding site for estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1991;5:725-733
- 16.- Kim KE, Gordon DF, Maurer RA. Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone beta-subunit. *DNA* 1988;7:227-233
- 17.- Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Dias JA. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994;369:455-461
- 18.- Dighe RR, Murthy GS, Kurkalli BS, Moudgal NR. Conformation of the alpha-subunit of glycoprotein hormones: a study using polyclonal and monoclonal antibodies. *Mol Cell Endocrinol* 1990;72:63-70
- 19.- Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Zambrano E, Ulloa-Aguirre A. A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology* 1998;67:153-163
- 20.- Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, Brown MB, Riding JW, Beitins IZ. Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79:119-128

21.- Papandreou M, Sergi I, Medri G, Labbe-Jullie C, Braun JM, Canonne C, Ronin C. Differential effect of glycosylation on the expression of antigenic and bioactive domains in human thyrotropin. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:137-150

22.- Keene JL, Nishimori K, Galway AB, Matzuk MM, Hsueh AJW, Boime I. Expression of recombinant human choriogonadotropin in Chinese hamster ovary glycosylation mutants. *Mol Endocrinol* 1989;3:2011-2017

23.- Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988;947:287-306

24.- Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR. Structural features of mammalian gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 1996;125:3-19

25.- Albanese C, Colin IM, Crowley WF. The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Horm Res* 1996;51:23-61

26.- Smith PL, Baenziger JU. A pituitary N-acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones. *Science* 1988;242:930-933

27.- Ulloa-Aguirre A, Mendez JP, Cravioto A, Grotjan E, Damian-Matsumara P, Espinoza R. Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotrophin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod* 1990;5:661-669

28.- Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones *J Biol Chem* 1988;263:36-44

29.- Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummings JT, Clarke I. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 1991;129:1805-1813

30.- Emmanouel DS, Stavropoulos T, Katz AI. Role of the kidney in metabolism of gonadotropins in rats. *Am J Physiol* 1984;247:786-792

- 31.- Ulloa-Aguirre, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999;11:205-215
- 32.- Helton TE, and Magner JA. Sialytransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 1994;134:2347-2353
- 33.- Hartree SA, Renwick GCA. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992;287:665-679
- 34.- Cappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endor Rev* 1983;4:179-184
- 35.- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH. The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem* 1971;246:1461-1467
- 36.- Fiete D, Baenziger JU. Isolation of the SO₄-4-GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α -specific receptor from rat liver. *J Biol. Chem* 1997;272:14629-14637
- 37.- Wilson CA, Leigh AJ, Chapman. Gonadotrophin Glycosylation and funtion. Review. *J Endocrinol* 1990;125:3-14
- 38.- Whitcroft SIJ, Stevenson JC. Hormone replacement therapy: risks and benefits. *Clin Endocrinol* 1992;36:15-20
- 39.- Hernández-Valencia M, Mason M, Fonseca Me, Zárate A. Variaciones de las formas moleculares de LH y FSH durante el ciclo ovárico normal. *Ginec Obstet Mex* 1996;64:140-145
- 40.- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reprod* 1998;4:260-283
- 41.- Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Arora. The tirad intracellular loop of the rat gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor couples the receptor to Gs- and Gp/11-mediated signal transduction pathways: evidence from loop fragment transfection in GGH3 cells. *Endocrinology* 1998;139:2472-2478

42.- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 1990;11:177-180

43.- Wide L, Naessen T. 17β -Oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol* 1986;40:783-789

44.- Fonseca ME, Masón M, Ochoa R, Hernández-Valencia M, Zárate A. Variaciones de las formas moleculares de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) durante el ciclo menstrual y la menopausia. *Ginec Obstet Mex* 1996;64:508-516

45.- Mason M, Hernández-Valencia M, Zárate A, Fonseca ME, Ochoa R. La proporción de formas moleculares de gonadotropinas se altera en pacientes con el síndrome de ovarios poliquísticos. *Ginec Obstet Mex* 1997;65:382-386

46.- 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;80:294-299

47.- Mercer JE, Clements JA, Funder JW, Clarke IJ. Regulation of follicle-stimulating hormone β and common α subunit messenger ribonucleic acid by gonadotropin releasing hormone and estrogen in sheep pituitary. *Neuroendocrinology* 1989;47:563-566

48.- Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC. Structure-function relationship of gonadotropins. *Horm Res* 1987;43:383-429

49.- Hernández-Valencia M, Fonseca ME, Ochoa R, Zárate A. Efectos metabólicos en la menopausia de un esteroide sintético (tibolona) con acción estrogénica característica. *Ginec Obst Méx* 1997;65:145-147

50.- Zárate A, Hernández-Valencia M, Ochoa R, Santos A. Experiencia clínica con tibolona en la terapia de reemplazo hormonal en la posmenopausia. *Ginec Obst Mex* 1996;64:47-50

51.- Reichert LE, The functional relationship between FSH and its receptor as studied by synthetic peptide strategies. *Mol Cell Endocrinol* 1994;100:21-27

- 52.- Davis D, Liu X, Segaloff DL. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol* 1995;9:159-170
- 53.- Dunkel L, Jia XC, Nishimori K, Boime I, Hsueh AJ. Deglycosylated human chorionic gonadotropin (hCG) antagonizes hCG stimulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation through a noncompetitive interaction with recombinant human luteinizing hormone receptors. *Endocrinology* 1993;132:763-769
- 54.- Calvo FO, Keutmann HT, Bergert ER, Ryan RJ. Deglycosylated human follitropin: characterization and effects on adenosine cyclic 3',5'-phosphate production in porcine granulosa cells. *Biochemistry* 1986;25:3938-3943
- 55.- Weiner RS, Dias JA. Biochemical Analyses of proteolytic nicking of the human glycoprotein hormone alpha-subunit and its effect on conformational epitopes. *Endocrinology* 1992;131:1026-1036
- 56.- Vakharia DD, Dias JA, Andersen TT. Determination of subunit contact-associated epitopes of the beta-subunit of human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1991;128:1797-1804
- 57.- Braun T, Schofield PR, Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 1991;10:1885-1890
- 58.- Thomas D, Rozell TG, Liu X, Segaloff DL. Mutational analyses of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine-rich repeats 1-6 are involved in hormone binding *Mol Cell Endocrinol* 1996;10:760-768
- 59.- Zárate A. Algunas recomendaciones terapéuticas en el manejo médico de la menopausia. *Rev Fac Med UNAM* 1993;36:103-106
- 60.- Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Campo S. FSH isoforms: bio and immuno-activities in post-menopausal and normal menstruating women. *Clinical Endo* 1996;44:181-189

- 61.- Cheng CY, Frick J, Gunsalus GL, Musto NA, Bardin CW. Human testicular androgen binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin. *Endocrinology* 1984;114:1395-1401.
- 62.- Papandreou MJ, Asteria C, Pettersson K, Ronin C, Beck-Peccoz P. Concanavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1008-1013.
- 63.- Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endo* 2001;174:41-49

Apéndice 1.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS Y REACTIVOS A UTILIZAR. BUFFERS:

BUFFER DE EQUILIBRIO:

	250 ml	500 ml	1000 ml
-TRIS 50 Mm	1.51 g	3.02 g	6.04 g
-NaCl 0.5 M	7.3 g	14.6 g	29.2 g
-Cl ₂ Ca 1 mM	0.0277 g	0.0554 g	0.1108 g
-Cl ₂ Mg 1 mM	0.05 g	0.1 g	0.2 g
ó solución 100%	0.051 ml	0.102 ml	0.204 ml
-Cl ₂ Mn . H ₂ O	0.035 g	0.07 g	0.14 g
ó . 4 H ₂ O	0.0495 g	0.099 g	0.1979 g
-pH = 7.4			

El Cl₂Mg se agrega después de llevar a pH.

GLUCÓSIDO 10 mM:(DU)

-Metil α -D-glucopiranososa: 0.1942 g/100 ml buffer de Equilibrio.

MANÓSIDO 100 mM:(FU)

- Metil α -D-manopiranososa: 1.9420 g/100 ml buffer de Equilibrio.

REGENERACIÓN 1: Buffer Tris-CIH pH 8.5

	1000 ml
-TRIS 0.1 M	12.1 g
-ClNa 0.5 M	29.2 g
-pH 8.5: Llevar a pH con CIH fumante.	

REGENERACIÓN 2: Buffer acetato pH 4.5

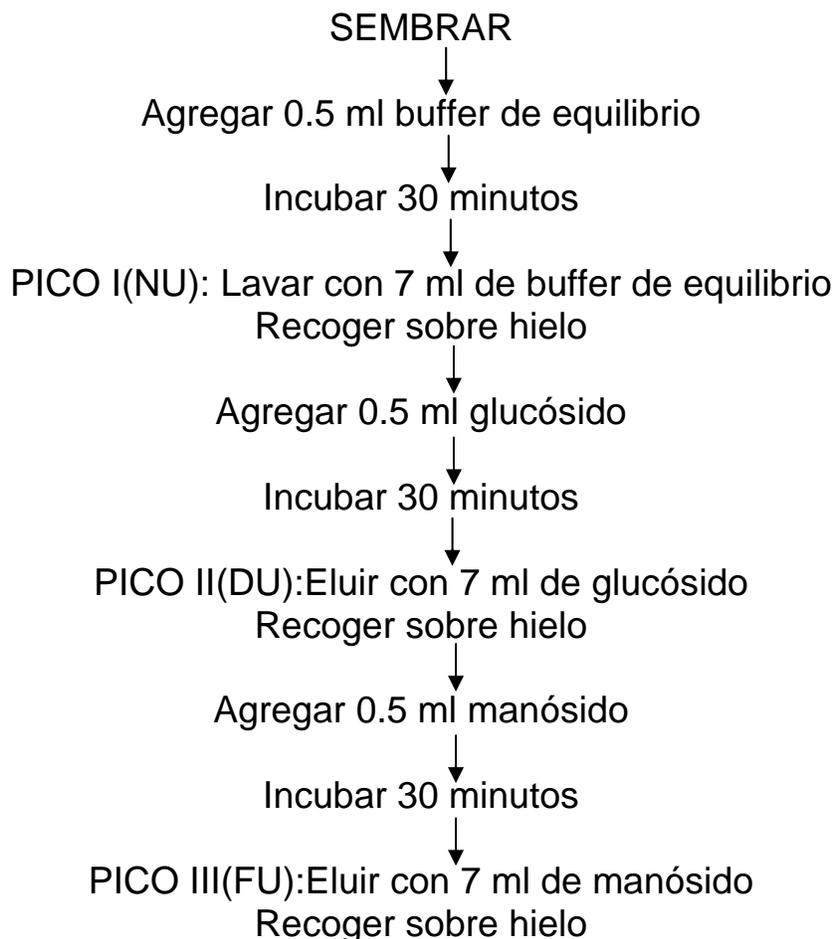
-Acetato de sodio 0.1 M	13.6 g del . 3 H ₂ O ó 8.2 g del anhidro
-Cl ₂ Mg 1 mM	0.203 g ó 0.204 ml de solución 100%
-Cl ₂ Ca 1 mM	0.111 g
-Cl ₂ Mn 1 mM	0.144 g
-pH 4.5: Llevar a pH con AcH.	

Continúa apendice 1.

ARMADO DE LA COLUMNA: Con-A-Sepharose (Pharmacia-Biotech). En una columna de vidrio de 0.5 mm de diámetro se colocan 2.5 ml de H₂O (cerrando con Parafilm el extremo inferior) y se marca la altura. Luego se retira el H₂O y se seca la columna lo mejor posible. Se hace un tapón con lana de vidrio a modo de rejilla para que la lectina no se escape de la columna. Se homogeniza bien la lectina y se agrega en forma intercalada con el buffer de equilibrio hasta llegar a la altura marcada. Tanto el buffer como la lectina deben estar a temperatura ambiente, el buffer debe degasarse antes de usar (para evitar la formación de burbujas). En la lectina no deben quedar burbujas; si esto pasara se deberá desarmar la columna y armarla nuevamente. Una vez armada la columna, se lava con 2-3 columnas de buffer de equilibrio para eliminar los conservantes. La columna se almacena en la cámara fría en un tubo de ensayo con buffer de equilibrio suficiente para que sobrepase el nivel de lectina (y ésta no se seque) y se tapa con Parafilm. Si la columna no se usa por un par de meses, se debe equilibrar y almacenar en Equilibrio-Azida 0.1%.

Apéndice 2.

Flujograma :



REGENERACIÓN DE LA COLUMNA:

- Lavar con 2 columnas de buffer de regeneración 1.
- Lavar con 2 columnas de buffer de regeneración 2.
- Lavar con 2 columnas de buffer de equilibrio.

ALMACENAMIENTO DE LA COLUMNA:

Se guarda en la cámara fría sumergida en buffer de equilibrio. Si la columna no se usa por un par de meses, se debe equilibrar y almacenar en Equilibrio-Azida 0.1%.

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE GLICOSILACIÓN DE GONADOTROPINAS CON LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS CONJUGADOS Y CON TIBOLONA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS

NOMBRE DE LA PACIENTE: _____

EDAD: _____ ESTADO CIVIL: _____ ESCOLARIDAD: _____

A.H.F. :

A.P.P. :

A.G.O. : MENARCA: ADRENARCA: TELARCA: PUBARCA:

IVS: COMP. SEX. RITMO:

G: P: A: C:

PPF: DOC:

HIJOS: FECHA: PESO: TALLA: SEXO: LACTACION:

1° _____

2° _____

3° _____

4° _____

FECHA DE INICIO

MENOPAUSIA : _____

SINTOMATOLOGIA :

RESULTADOS :

LABORATORIO	BASAL	POSTX.	CROMATOGRAFIA
FSH	_____	_____	_____
LH	_____	_____	_____
ESTRADIOL	_____	_____	_____
PROGEST.	_____	_____	_____
PRL	_____	_____	_____

Laboratorio clínico de Endocrinología (8:00 h en ayuno)
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas
Hospital de Especialidades, CMN S-XXI, IMSS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO 2

México, D:F: a__de_____del 200_.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado "DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL PERFIL DE GLICOSILACIÓN DE GONADOTROPINAS CON LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRÓGENOS CONJUGADOS Y CON TIBOLONA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS" registrado ante el Comité Local de Investigación con el número 072/97. El objetivo de este estudio es determinar las isoformas moleculares predominantes en sangre venosa de mujeres climatéricas en sus diferentes etapas.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en extraerme 10 mL de sangre venosa en una sola ocasión, misma que se realizará al obtener sangre para el resto de mis estudios del control hormonal.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios de la vigilancia estrecha derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: exposición a las molestias de la extracción de sangre venosa, condicionando posible vertigo, así como ligero malestar en el área de punción. Obteniendo el beneficio de reconocer oportunamente cualquier alteración del curso evolutivo del climaterio.

El investigador principal se ha comprometido a darme información de los hallazgos y sobre cualquier procedimiento alternativo que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, matrícula y firma del investigador principal

Testigo

Testigo

Figura 1.- Fracciones obtenidas del total de glicoproteínas

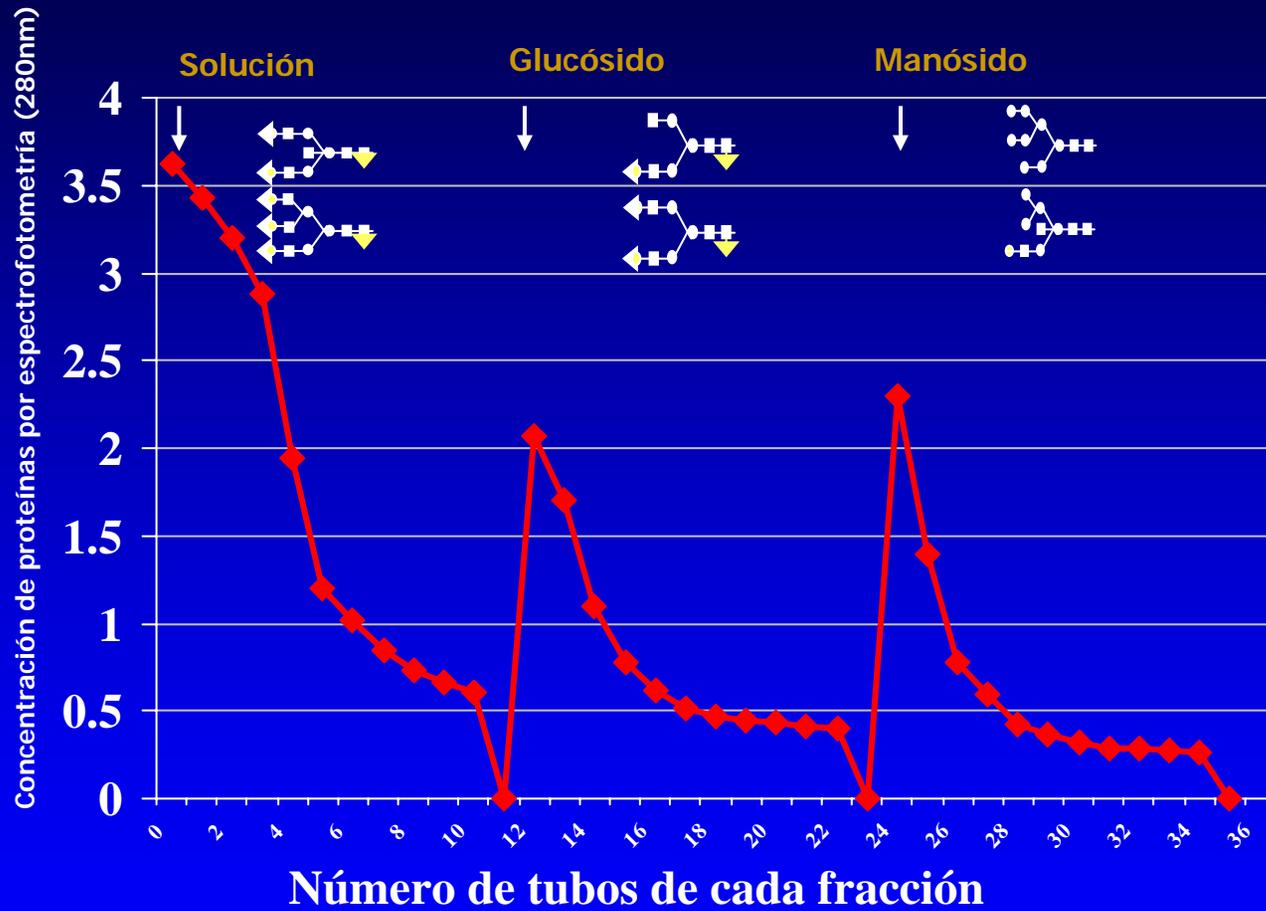


Figura 2.- Total de hormona recuperada posterior a la cromatografía en Con-A

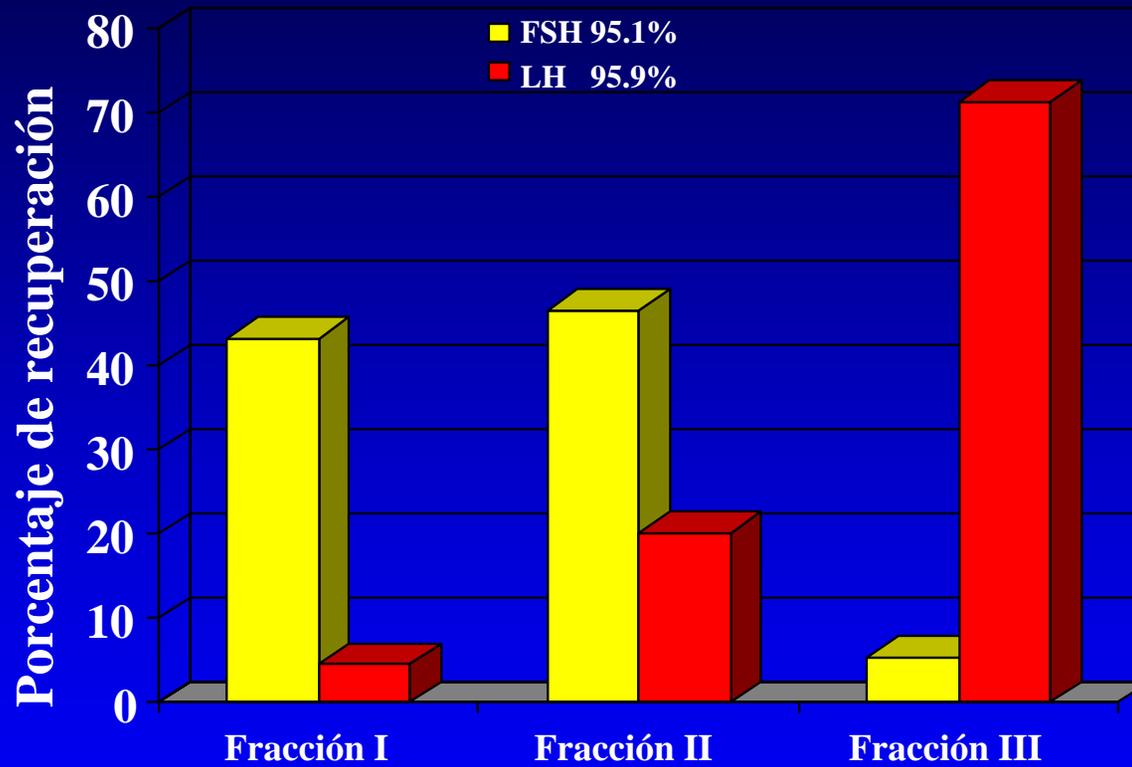
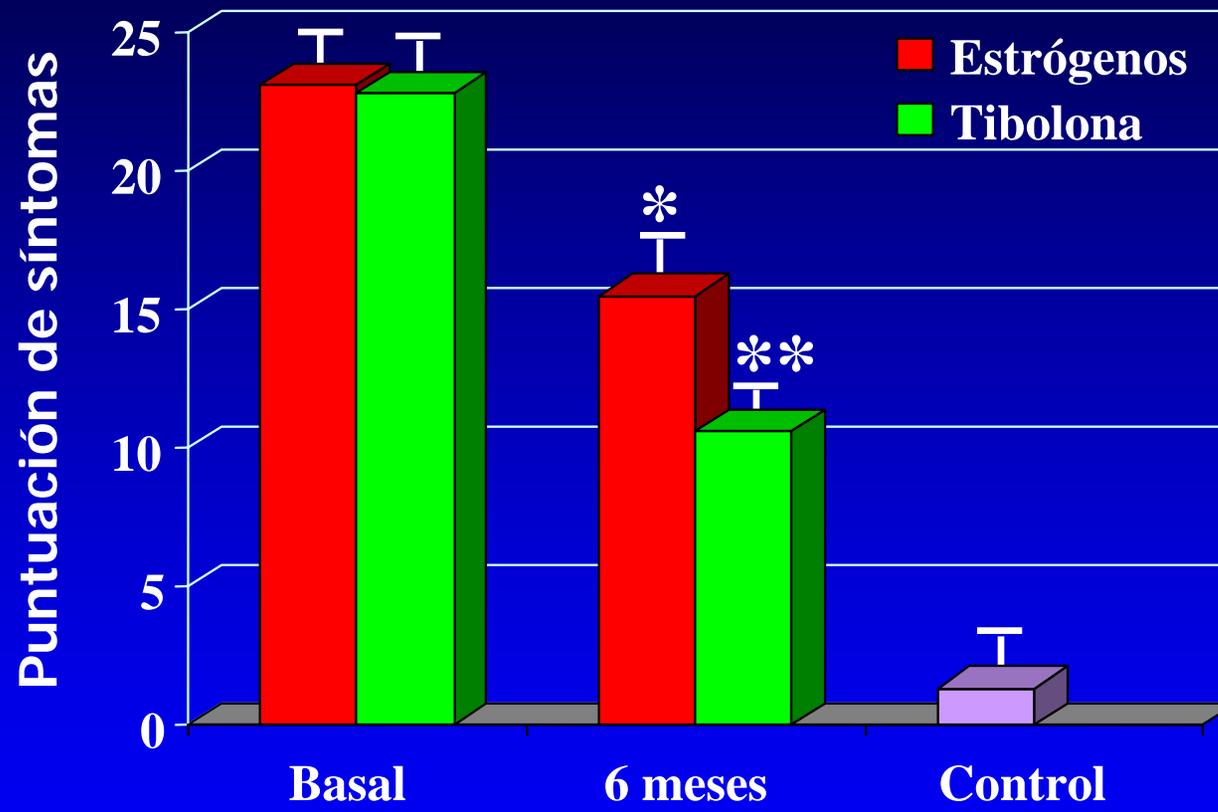
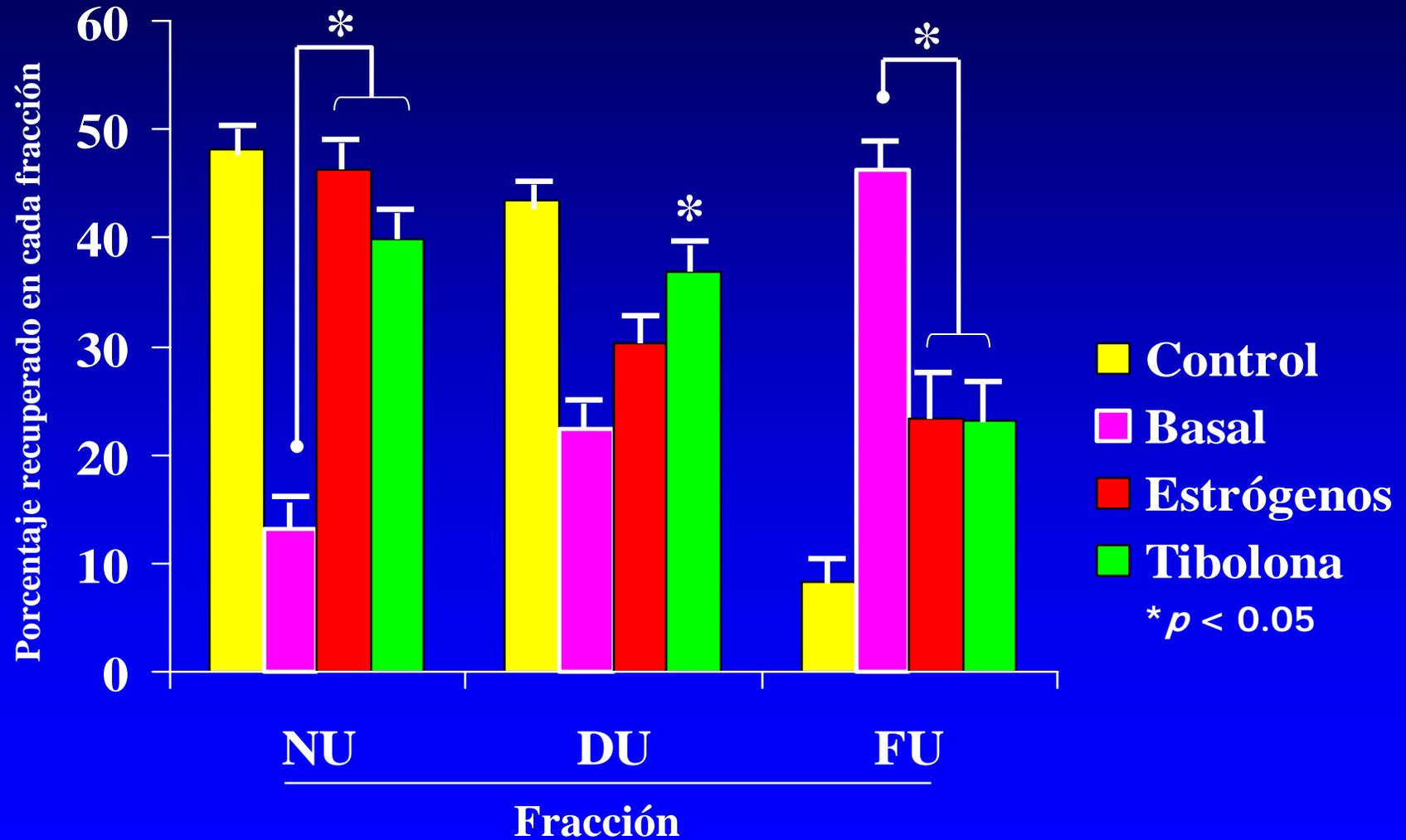


Figura 3.- Evaluación clínica con la Escala de Greene



* $p < 0.05$
** $p < 0.001$

**Figura 4.- Glicofomas de FSH
Comparación entre Grupos**



**Figura 5.- Glicoformas de LH
Comparación entre Grupos**

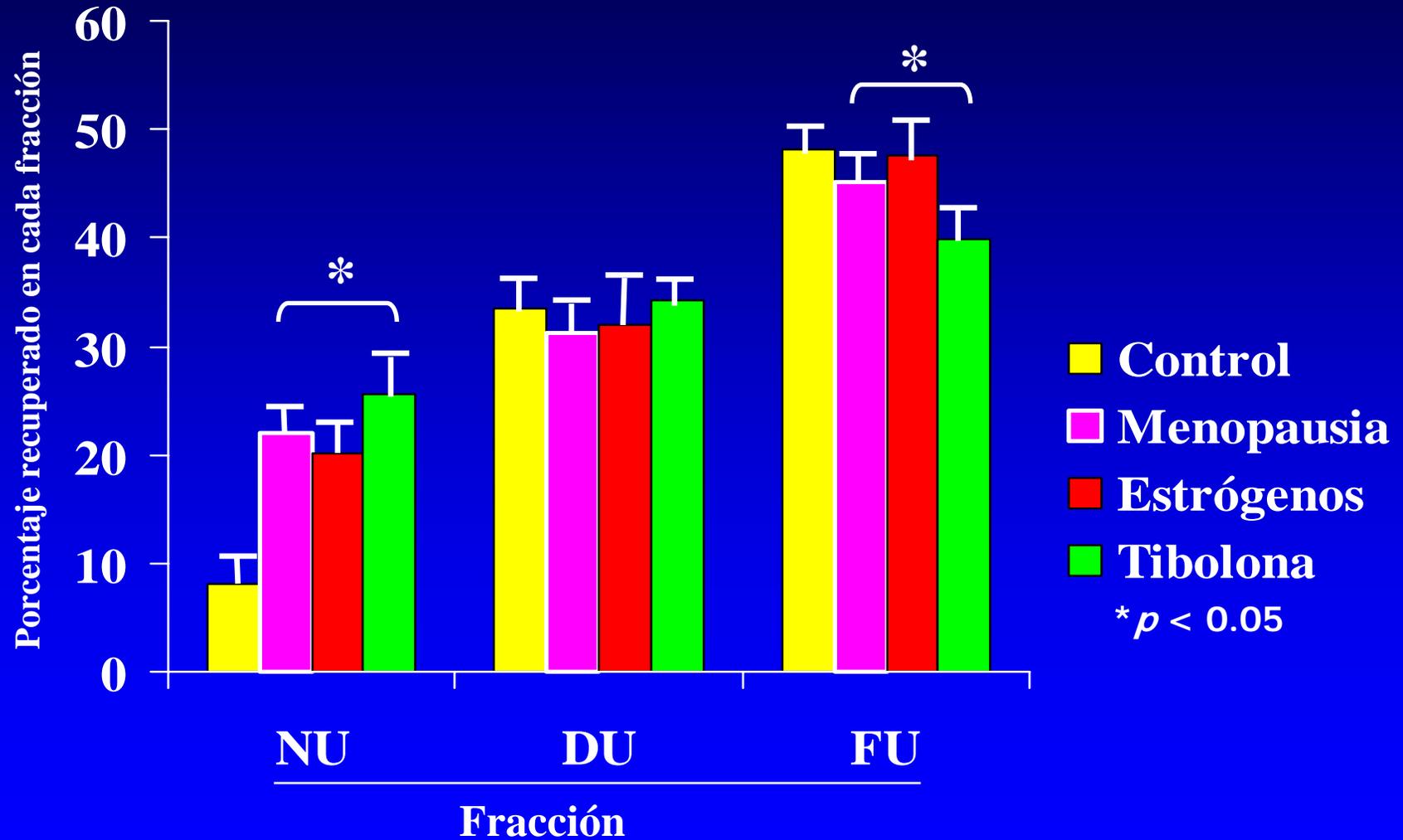


Tabla 1.- Características de los Grupos en Estudio

Grupos		Edad Menopausia (Intervalo)	Edad Tratamiento (Intervalo)	Gestas	Paras	Cesáreas	Abortos
Control	(I)	—	27.3±4.1 (21-34)	1.5±0.8 (0-III)	1.3±0.9 (0-III)	0.1±0.1 (0-I)	0.2±0.1 (0-I)
Menopausia (E2)	(II)	48.1±2.2 (46-53)	50.0±3.3 (47-57)	2.4±0.5 (II-III)	1.8±0.9 (0-III)	0.3±0.2 (0-II)	0.3±0.1 (0-II)
Menopausia (T)	(III)	47.9±2.7 (46-55)	48.7±3.6 (46-56)	2.3±1.0 (0-IV)	1.9±1.2 (0-IV)	0.2±0.1 (0-II)	0.2±0.1 (0-I)

Datos presentados como Promedio±Desviación Estándar

* $p < 0.05$

Tabla 2.- Determinaciones Hormonales de los Grupos en Estudio

Grupos	FSH (mUI/mL) (21-153)	LH (mUI/mL) (30-110)	Estradiol (pg/mL) (N. D.)
Control	9.2±1.2	6.2±1.4	155.5±32.2
Menopausia	80.1±21.3	64.2±35.9	< 10.0
Estrógenos	32.4±4.6*	18.5±2.6*	124.8±12.6*
Menopausia	84.9±12.2	56.2±14.8	< 10.0
Tibolona	46.4±27.5*	24.7±16.4*	16.9±6.2

Datos presentados como Promedio±Desviación Estándar

* $p < 0.05$