

3  
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO DE  
LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE ( FSH )  
Y DE LA HORMONA LUTEINIZANTE ( LH ) EN  
HOMBRES CON HIPOGONADISMO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
ANGELICA MARIA ARREDONDO PINEDA

U N A M  
FES  
ZARAGOZA



LO FIRMADO EN  
DE NUESTRA DELIBERACION

ASESORES:

Q. F. B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ  
DRA. MA. EUGENIA FONSECA YERENA

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

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

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

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

**COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO DE LA  
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)  
Y DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH)  
EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO**

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE HORMONAS DE LA  
UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES ENDOCRINAS  
CONJUNTAMENTE CON EL SERVICIO DE ANDROLOGIA DEL HOSPITAL  
DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
DEL IMSS.

**J U R A D O**

**PRESIDENTE: Q.F.B. ROSALINDA PLIEGO ESCALANTE.**

**VOCAL: Q.F.B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ**

**SECRETARIO: DRA. MA. EUGENIA FONSECA YERENA**

**SUPLENTE: Q.F.B. JOSE PONCE GUERRERO**

**SUPLENTE: Q.F.B. PILAR CEDILLO MARTINEZ**

## DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO CON TODO MI CARIÑO Y AGRADECIMIENTO A MIS PADRES: RUBEN ARREDONDO NUÑEZ Y SOCORRO PINEDA CHAVEZ POR QUE A USTEDES DEBO EN GRAN MEDIDA LO QUE HE LLEGADO A SER, POR HABER FORJADO EN MI EL SENTIMIENTOS DE RESPONSABILIDAD Y SUPERACION.

A MIS HERMANOS: ADRIAN, HORTENCIA, PATRICIA Y ARACELI.

A MIS CUÑADOS: ALEJANDRA, ROSA, FELIPE Y ROBERTO.

A MIS SOBRINOS: RUBEN, ADRIANA, ERISVETT, ANTONIO, RAUL E IVONE,

A LA MEMORIA DE AQUELLAS PERSONAS QUE SIEMPRE ME BRINDARON SU AMOR Y CONFIANZA Y CON QUIENES ME HUBIERA GUSTADO COMPARTIR ESTE MOMENTO Y BRINDARLES MI AYUDA: ROSA NUÑEZ, FLAVIA CHAVEZ, JESUS PINEDA, RUBEN ARREDONDO PINEDA Y FELIPE A. HERNANDEZ ARREDONDO.

GRACIAS LES DOY A TODOS USTEDES POR CREER EN MI, POR EL CARIÑO, APOYO Y COMPRESION QUE SIEMPRE ME HAN BRINDADO Y POR SUS PALABRAS DE ALIENTO Y FORTALEZA QUE ME DIERON EN LOS MOMENTOS DIFICILES.

## AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES: Q.F.B. MACRINA MASON VELASCO  
DRA. MARIA EUGENIA FONSECA YERENA  
Q.F.B. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ

A UNA PERSONA INCANSABLE: DRA. MA. LUISA CASTILLO DE SANCHEZ

POR QUE DE USTEDES HA QUEDADO EN MI NO SOLO EL CONOCIMIENTO  
SINO TAMBIEN EL EJEMPLO DE LUCHA, TENACIDAD, ENTREGA Y DESEO  
DE SUPERACION COMO PROFESIONISTAS Y MADRES DE FAMILIA.

A LA DRA. ROSARIO TAPIA DEL SERVICIO DE ANDROLOGIA DEL  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL, POR  
EL APOYO BRINDADO EN LA EVALUACION CLINICA DE LOS PACIENTES  
MANEJADOS.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A LAS SIGUIENTES PERSONAS POR  
SU VALIOSA COLABORACION PARA LA REALIZACION DE ESTE  
TRABAJO:

DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO  
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA DE ENFERMEDADES  
ENDOCRINAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL IMSS

Q.F.B. MARIA DE LAS MERCEDES ESPINOSA LEGORRETA  
Q.F.B. SOLEDAD MEDINA GUADARRAMA  
Q.F.B. HORACIO CORSI VILLALOBOS  
DEL LABORATORIO DEL HOSPITAL DE CARDIOLOGIA DEL CMN.

Q.F.B. RUTH BARRA RODRIGUEZ  
Q.F.B. JOVITA MALDONADO REYNA  
DEL LABORATORIO CENTRAL DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL  
CMN.

Q.F.B. OLIVA ROSALES OROZCO  
DEL LABORATORIO DE MEDICINA NUCLEAR DEL HOSPITAL DE  
ESPECIALIDADES DEL CMN.

Q.F.B. RAQUEL RETANA UGALDE  
DR. VICTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ.  
DE LA COORDINACION DE INVESTIGACION DE LA FES ZARAGOZA

SR. ANTONIO HERNANDEZ AGUILAR  
DEL ARCHIVO CLINICO DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CMN.

## AGRADECIMIENTOS

A LAS FAMILIAS: GONZALEZ MELENDEZ Y PINEDA RAMIREZ.

A LAS QUIMICAS (OS): ROSA ELBA GALVAN DUARTE, CARMEN BAUTISTA RAMIREZ, CONSUELO MONDRAGON SANCHEZ, BLANCA DELGADILLO TELLEZ, CARLOS RIVERA PAREDES, RICARDO A. SALAS, CARMEN MENDOZA MORA, RAQUEL OCHOA RESENDIZ, MARTHA GARCIA PEREZ, AIDA VELEZQUEZ MIRANDA, SILVIA VELAZQUEZ MEZA, JULIA E. RUIZ GARCIA, ELBA LOUSTAUNAU VIDRIO, CARLOS VARGAS LOPEZ, DALILA PASCOE LIRA, EDUARDO HERNANDEZ VAZQUEZ, MIRIAM RUIZ ALBARRAN, HORTENCIA CRUZ JIMENEZ.

A LAS ENFERMERAS: ROSALIA ELIAS GONZALEZ Y LETICIA SANDOVAL SANDOVAL.

A LAS SRITAS: PATRICIA HERNANDEZ SALINAS, CARMEN MENDOZA MORAN Y ROSA ACEVEDO ZARAGOZA.

A LA SRA: CONCEPCION VILLEGAS.

A LOS SRES: GUILLERMO AMAYA SEGOVIA, DOUGLAS ALFREDO RAMIREZ DIAZ Y FERNANDO SEGURA R.

A TODO EL PERSONAL DE LA ASOCIACION MEXICANA DE BIOQUIMICA CLINICA.

A MIS AMIGOS DE TODA LA CARRERA PORQUE CON ELLOS COMPARTI ALEGRIAS Y SINSABORES BRINDANDOME SIEMPRE SU AMISTAD INCONDICIONAL:

Q.F.B. ANA ISABEL BARCO GONZALEZ  
Q.F.B. CARMEN CAMACHO VENEGAS  
Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LOPEZ

A USTEDES MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO POR SU MOTIVACION, POR SU AYUDA MORAL, POR SU AMISTAD Y CARINO.

ESPECIALMENTE Y CON MUCHO CARIÑO DEDICO ESTE TRABAJO AL  
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ, POR TODO EL APOYO QUE  
ME HA BRINDADO, POR SU CONFIANZA, COMPRENSION, CONOCIMIENTOS  
Y POR QUE ES Y SEGUIRA SIENDO UNA MOTIVACION CONSTANTE PARA  
MI SUPERACION.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	5
MARCO TEORICO .....	8
EJE NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCION .....	9
GONADA MASCULINA .....	9
GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS (LH Y FSH) .....	12
ESTEROIDES GONADALES .....	15
CONTROL DE LA FUNCION TESTICULAR .....	18
HIPOGONADISMO MASCULINO .....	22
EVALUACION DE LA FUNCION GONADAL EN EL HOMBRE .....	24
EVALUACION CLINICA .....	24
PRUEBAS DE LABORATORIO .....	27
PRUEBAS DE RESERVA TESTICULAR .....	30
ESTIMULACION CON GONADOTROPINA CORIONICA .....	30
ESTIMULACION CON CITRATO DE CLOMIFENO .....	31
ESTIMULACION CON HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS .....	32
BIOPSIA DE TESTICULO .....	33
OBJETIVOS .....	36
HIPOTESIS .....	37
MATERIAL Y METODOS .....	38
TIPO DE ESTUDIO .....	38
POBLACION .....	38
CRITERIOS DE INCLUSION .....	38
CRITERIOS DE EXCLUSION .....	39
VARIABLES DEPENDIENTES .....	39
VARIABLES INDEPENDIENTES .....	39
TECNICAS .....	43
DISENO ESTADISTICO .....	48
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS .....	50
DISCUSION DE RESULTADOS .....	132
CONCLUSIONES .....	139
ANEXO .....	140
BIBLIOGRAFIA .....	148

## RESUMEN

Se realizó un estudio de tipo observacional, prospectivo, transversal y comparativo con el fin de evaluar el perfil molecular inmunorreactivo y las formas moleculares de \*FSH y \*LH en varones con falla testicular, comparándolo con el de pacientes normales, para así establecer la existencia de alguna diferencia cualitativa o cuantitativa entre ambos.

Se valoró también el ambiente hormonal que prevalece en cada grupo, para esclarecer si los esteroides gonadales (testosterona y estradiol) participan en la regulación de las diferentes variantes moleculares de FSH y LH. Además de lo anterior se determinó el contenido de ácido siálico en cada isohormona para conocer su grado de glicosilación y saber si ésta también se modifica por la concentración de hormonas esteroides, influyendo así sobre su perfil molecular.

Para ello se estudiaron 10 pacientes normales, con concentraciones hormonales dentro de los valores de referencia, y además 7 pacientes con diagnóstico de hipogonadismo y que de acuerdo a los resultados de laboratorio correspondían a un hipogonadismo hipergonadotrópico es decir a falla testicular primaria. La edad de los pacientes en ambos grupos fue de 20 a 70 años.

A dichos pacientes se tomó una muestra sanguínea para determinar la concentración basal de testosterona, (T) estradiol, (E2) LH, FSH y prolactina (PRL). Después de los sueros fueron sometidos a filtración en Sephadex G-100 para separar las formas moleculares de LH y FSH, las que se cuantificaron en las fracciones cromatográficas por radioinmunoanálisis (RIA), obteniéndose así los perfiles de elución para ambas hormonas realizando además la determinación de ácido siálico en cada fracción.

Los resultados obtenidos muestran que la concentración de T disminuyó con la edad en el grupo normal pero fué más baja en el grupo con hipogonadismo, mientras que la concentración de E2 y la relación E2/T fue mayor en este último grupo.

En lo que respecta a las formas moleculares se establecieron 5 formas moleculares para FSH (100-66, 60, 45, 32-30, 17-15 y < 15 Kd) y 5 formas moleculares para LH (100-66, 60, 45, 34, 21-15 y < 15 Kd). En el grupo normal prevalecieron las formas moleculares de 100-66 y 45 Kd de la FSH, la primera disminuye con la edad y a partir de los 50 años predominó la de 45 kd. En el grupo con hipogonadismo dominó la forma molecular de 100-66 kd de FSH, detectándose la isoforma de 60 kd solamente en el caso de cáncer

testicular. Se observó un alto porcentaje de subunidades libres con un peso molecular (PM) menor de 15 kd en los perfiles de FSH en ambos grupos, en tanto que para la LH su proporción fué baja para ambos grupos. En los perfiles moleculares de LH en el grupo control predominaron las formas grandes (100-60 y 45 kd) de los 20 a los 50 años, después de esta edad se elevo considerablemente la forma molecular de 34 kd. En el grupo con hipogonadismo predominaron también las formas grandes (100-60 y 45 kd) aunque la primera disminuyó con la edad mientras que la de 45 kd aumentó.

El perfil cromatográfico del ácido siálico fue muy similar al de la FSH, que mostró mayor grado de glicosilación que la LH en los hombres normales, sobre todo en las fracciones correspondientes a las formas grandes; la concentración de ácido siálico fue mucho menor en los hombres con hipogonadismo, y además se encontraron perfiles anormales de glicosilación.

Por otra parte las formas moleculares grandes (100-66 kd) mostraron una correlación lineal positivo con la concentración de T y una relación inversa con la concentración de E2, lo que explica la disminución de las formas grandes con la edad, así como en los pacientes con hipogonadismo, en cambio otras formas de menor peso molecular son estimuladas por estrógenos, lo que explicaría su elevación en pacientes con hipogonadismo.

De lo anterior se podría concluir que los esteroides gonadales: testosterona (T) y estriadol (E2) tienen un papel importante no solo en los mecanismos que controlan la secreción de gonadotropinas hipofisarias mediante el mecanismo clásico de retroalimentación (Feed Back negativo) sino que además influyen de manera considerable sobre el perfil molecular de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) ya que modulan y controlan la proporción de las formas moleculares de ambas hormonas, siendo dependientes de la concentración a la cual se encuentren dichos esteroides, por lo que la edad en los hombres normales también juega un papel decisivo para el predominio de determinadas formas moleculares debido a los cambios hormonales que se presentan al avanzar la edad. Esta regulación se ejerce probablemente a través de la glicosilación de las moléculas de las gonadotropinas; como se observó, están más sializadas las moléculas grandes que dependen de T y es mayor el contenido de ácido siálico en los hombres normales, por lo que podría decirse que en los hombres con hipogonadismo la glicosilación deficiente o alterada de FSH y LH y la ausencia de algunas isoformas como la de 60 kd de FSH y la de 34 kd de LH pueden ser factores que determinan probablemente una baja bioactividad de las gonadotropinas y por lo tanto un estímulo inadecuado para el testículo, determinando así el hipogonadismo.

## INTRODUCCION

La importancia social y biológica de engendrar un hijo ha sido reconocida a través de la historia, por la mayoría de las culturas del mundo, recurriendo en tiempos pasados a artificios tales como talismanes, ceremonias religiosas, rituales, etc. que se creía permitían la procreación.

En la actualidad, debido al gran crecimiento poblacional, al decremento del nivel de vida de las personas, al ritmo de vida tan acelerado y a la contaminación ambiental, el número de problemas de salud a aumentado considerablemente, entre ellos los relacionados con la procreación. En Estados Unidos por ejemplo, se dice que más de un millón de personas se enfrentan a este problema y aunque en México no se conocen cifras exactas, se calcula que es elevado el número de personas que presentan alteraciones de la fertilidad.

La investigación bioquímico-Médica se ha enfrentado a este problema con gran ímpetu, creando diversos exámenes que permiten valorar adecuada e íntegramente a estos pacientes, lo que unido a las nuevas técnicas de procreación como la fertilización intrauterina, la fertilización "in-vitro" o la transferencia intrafalopiana de gametos, permiten ofrecer alguna esperanza a las parejas infértiles. No obstante

estos éxitos, aún se siguen enfrentando ciertos prejuicios morales y algunos inconvenientes como el elevado costo de éstos métodos, lo que impide su acceso a personas de escasos recursos económicos.

Si bien la fertilidad es un problema que puede afectar tanto a mujeres como a hombres, es preciso mencionar que las investigaciones y avances realizados en esta área, han sido enfocados principalmente hacia la mujer, encontrándose escasas investigaciones o avances que afronten el problema a nivel masculino; por eso se piensa que es conveniente explorar este campo con la finalidad de encontrar nuevas alternativas de diagnóstico y/o tratamiento para este tipo de pacientes, a través de estudios más minuciosos, de menor costo y altamente confiables.

Este trabajo tiene como finalidad abordar el problema de la esterilidad masculina a nivel de cambios cualitativos o cuantitativos en la composición de isohormonas inmunorreactivas de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en hombres que presentan falla testicular primaria (hipogonadismo hipergonadotrópico), observando si el ambiente hormonal que presentan influye de alguna manera sobre las isoformas de LH, FSH y su actividad biológica, repercutiendo finalmente sobre la función reproductora de estos pacientes.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El hipogonadismo masculino es una entidad clínica que se ha incrementado significativamente en los últimos años, debido, Probablemente, a los factores ya mencionados. Dentro de esta patología, las gonadotropinas hipofisarias, conocidas como hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) juegan un papel muy importante en el desarrollo y reproducción de los seres humanos, ya que al ejercer adecuadamente su función biológica, son las responsables de mantener la función testicular, determinando la síntesis de andrógenos y la espermatogénesis. Ambas funciones pueden afectarse cuando ocurren cambios en la estructura de LH y/o FSH que impidan una adecuada unión de la hormona a sus receptores celulares modificando su acción biológica (1). A este respecto se sabe en la actualidad, que las hormonas de naturaleza protéica como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la prolactina (PRL) y la hormona del crecimiento (GH) se presentan en la circulación como una mezcla de diferentes formas moleculares o isohormonas, las cuales difieren entre sí, por presentar diferencias estructurales que modifican su acción biológica, así como sus propiedades fisicoquímicas, carga eléctrica y peso molecular, lo cual se ha aprovechado para su separación y caracterización mediante técnicas cromatográficas (2,3) o electroforéticas (4,5).

El estudio de las isohormonas ha mostrado gran utilidad para explicar aparentes diferencias e incongruencias entre los niveles hormonales y la actividad biológica de las hormonas, en situaciones clínicas difíciles de explicar, como es para la prolactina (PRL) la presencia de galactorrea en mujeres normoprolactinémicas (3) o por el contrario, la ausencia de manifestaciones clínicas en mujeres con hiperprolactinemia. En el caso de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) se ha establecido que las diferencias que presentan sus isohormonas se debe fundamentalmente a su grado de glicosilación, ya que determina su capacidad para unirse a los receptores celulares (5). Por otra parte, algunos estudios basados en el tratamiento de muestras de suero con neuraminidasa sugieren que el ácido siálico o N-acetilneuramínico es el principal carbohidrato que influye en la carga eléctrica y peso molecular (PM) de las isohormonas, así como en la acción biológica de las gonadotropinas (6).

También se ha encontrado, que las moléculas de FSH y LH son más ácidas y tienen mayor PM en las mujeres postmenopaúsicas que en las mujeres jóvenes (7) así como también en los hombres normales en comparación con los castrados, siendo el ácido siálico el responsable de las diferencias encontradas, de ahí que se piense que la

glicosilación es controlada de alguna manera por la concentración de esteroides gonadales.

a estos datos se ha demostrado, que los estrógenos (endógenos o exógenos) determinan el predominio de formas menos acídicas y de menor PM, como ocurre en las mujeres postmenopáusicas sujetas a tratamiento con estrógenos (2). En el hombre, la composición de isohormonas que presenta ha sido poco estudiada, no se sabe si la testosterona influye en el grado de glicosilación, ni cuales son las isohormonas predominantes en condiciones normales o patológicas.

Con base en estas observaciones se decidió realizar un estudio sobre las isohormonas de las gonadotropinas en hombres normales y en pacientes con falla testicular primaria (hipogonadismo hipergonadotrópico), con la finalidad de establecer si existen diferencias cualitativas o cuantitativas en la composición de isohormonas, que pudieran ser atribuidas a los cambios hormonales. Para ello se decidió utilizar la filtración en gel, comparando el comportamiento cromatográfico del suero de hombres con una función testicular normal con el de los hombres con hipogonadismo, relacionando además la concentración de ácido siálico, en cada una de las isohormonas, con la inmunorreactividad, la edad y el cuadro clínico de los pacientes.

## MARCO TEORICO

Las hormonas han sido definidas como mensajeros químicos producidos por un tejido del organismo (glándula) que viajan por la circulación y modifican las funciones o la actividad metabólica de tejidos distantes (tejido "blanco").

Desde el punto de vista químico las hormonas se clasifican en cuatro variedades: 1) Las hormonas de tipo protéico como la insulina y las gonadotropinas adenohipofisarias, 2) las hormonas polipeptídicas como las hormonas neurohipofisarias: vasopresina, ocitocina y ACTH (hormona adrenocorticotropica) 3) derivados de aminoácidos como la tiroxina, triyodotironina, epinefrina y norepinefrina y 4) las hormonas esteroides, entre las que destacan las hormonas sexuales como al estradiol (E2) y la testosterona (T) y las hormonas corticosuprarrenales (8).

La función hormonal se desarrolla en cuatro ámbitos generales: a) Reproducción, b) Crecimiento y desarrollo, c) Mantenimiento del medio interno y 4) Producción, utilización y almacenamiento de energía (8). En este trabajo, nos enfocaremos a la función reproductora, en la que las hormonas tienen un papel muy importante, regulando la gametogénesis, el desarrollo anátomo-funcional y la conducta sexual de ambos sexos, proceso que es fundamental para la reproducción humana.

## **EJE NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCION**

El eje neuroendocrino que controla la reproducción en el hombre consta de cuatro componentes principales: 1) El hipotálamo, 2) la glándula hipofisaria, 3) los testículos y 4) los órganos sexuales secundarios.

Los componentes de este sistema funcionan de una manera finamente regulada e integrada en la llamada regulación neuroendócrina, dando como resultado un funcionamiento testicular adecuado y una concentración de testosterona óptima para mantener las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual. Este eje se encarga además, de regular la maduración de los espermatozoides necesarios para la fertilidad (8).

Las principales hormonas que participan en este mecanismo, son las gonadotropinas adenohipofisarias: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH); y las hormonas esteroides: testosterona (T) y estradiol (E2) de las cuales hablaremos posteriormente.

### **GONADA MASCULINA**

Los testículos del hombre adulto normal, miden aproximadamente 3 por 5 cm, tienen un volúmen de 15 a 25 ml, presentan elasticidad y una consistencia firme; se encuentran dentro del escroto, que además de ser una

cubierta protectora conserva la temperatura testicular 2 °C por debajo de la temperatura abdominal. Se encuentran conformados por dos componentes principales: a) los túbulos seminíferos y b) el compartimento intersticial dentro del cual se encuentran las células de Leydig.

Los túbulos seminíferos están formados por las células de Sertoli y las células germinales. Las primeras revisten la membrana basal y forman uniones de tipo "occludens" en otras células iguales. Estas uniones impiden el paso de proteínas del espacio intersticial al interior de los túbulos seminíferos y con ello se forma una "barrera hematotesticular". Las células de Sertoli rodean las células germinales en desarrollo, por medio de prolongaciones citoplásmicas que constituyen un medio esencial para la diferenciación de tales células, además de encargarse del movimiento de las células germinales desde la base del túbulo hacia el interior del mismo, así como de la liberación de los espermatozoides. Las células de Sertoli también muestran fagocitosis activa de células germinales lesionadas y corpúsculos residuales, que son parte del citoplasma de las células no utilizadas en la formación de espermatozoides. Por otra parte, en respuesta a la FSH y la testosterona (T), las células de Sertoli secretan una proteína ligadora de andrógenos (ABP), molécula que tiene gran afinidad por la testosterona. Esta proteína llega al

interior de los túbulos y proporciona la concentración de T necesaria para el desarrollo de las células germinales durante el proceso de la espermatogénesis.

Por otra parte, las células de Leydig ubicadas en el compartimento intersticial son las encargadas de secretar bajo el estímulo de la LH la testosterona, la cual a su vez determina en forma directa o indirecta, la diferenciación de los genitales externos e internos en la etapa embrionaria, el desarrollo sexual del hombre durante la pubertad, y de conservación de la libido y la potencia sexual en el adulto. Ambos componentes testiculares guardan estrecha relación con el eje hipotálamo-hipófisis y requieren que este eje esté intacto para iniciar y conservar su función, además de las estructuras genitales secundarias necesarias para la maduración funcional y el transporte de los espermatozoides. Por lo anterior, los trastornos del hipotálamo, la hipófisis o los testículos, pueden ocasionar anomalías en la producción de testosterona y en consecuencia de las gonadotropinas, o cambios en la proporción de las isoformas biológicamente activas (9, 10), ocasionando problemas a nivel de los receptores. Por otra parte pueden producir también alteraciones en la calidad o cantidad de los espermatozoides, lo que puede determinar problemas de esterilidad o infertilidad en el varón (8).

## GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS

La hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son glicoproteínas secretadas por las células basófilas de la hipófisis; se encuentran en la circulación como una mezcla heterogénea de isoformas que difieren en sus propiedades fisicoquímicas contenido de carbohidratos y grado de acción biológica, y se cree que son moduladas por el ambiente hormonal, en especial por la concentración de estrógenos y testosterona (2, 9, 10), por lo que presentan variaciones cuantitativas en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas (11).

También se ha demostrado en estudios realizados en extractos de pituitarias de monos rhesus (9) y de ratas (10) que los cambios en la concentración de T, produce alteraciones en las isoformas de LH y FSH y por lo tanto su acción biológica. Sin embargo como ya se mencionó este tipo de estudios no han sido realizados en forma sistemática en hombres con función testicular normal, ni en pacientes con patología testicular, como es el hipogonadismo hipergonadotrópico.

**HORMONA LUTEINIZANTE (LH)**

La LH es una hormona que pertenece a la familia de las hormonas glucoprotéicas; su estructura protéica está formada por dos subunidades llamadas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ). La subunidad alfa presenta una secuencia de 96 aminoácidos y es estructuralmente muy similar a la subunidad alfa de la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), en cambio la subunidad beta de cada una de estas hormonas, es diferente y es la que les confiere la especificidad ligando-receptor para su acción biológica. La subunidad beta de la LH presenta 115 aminoácidos y por si misma es biológicamente inactiva, requiere necesariamente la presencia de la subunidad alfa para manifestar su actividad. El peso molecular de la molécula entera es aproximadamente de 28,000 - 34,000 daltons, del cual 12% a 14% son carbohidratos entre los cuales se encuentran la fucosa, manosa, glucosamina, galactosamina y ácido siálico o N-acetilneuramínico, los cuales se unen a la cadena protéica a nivel de una aspargina (12). La hormona luteinizante es secretada hacia la circulación por las células gonadotropas de la pituitaria anterior, de manera pulsátil; la frecuencia de la pulsación es sin embargo, un reflejo de la frecuencia de la secreción pulsátil de la GnRH la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (13), mientras

que la amplitud de la liberación pulsátil depende no solamente de los pulsos de GnRH, sino también de otros factores tales como el ambiente esteroideo gonadal, el cual puede afectar la respuesta de la pituitaria a las pulsaciones de GnRH (14). La hormona luteinizante se mide convencionalmente en sangre, por métodos inmunológicos como el radioinmunoensayo, que aunque permite evaluar la concentración hormona no siempre correlacionan bien con la actividad biológica. Así, en recientes estudios se han reportado algunas discrepancias entre la inmunorreactividad y la actividad biológica (15) mencionando que aunque el mecanismo molecular de tales diferencias es desconocido, probablemente puede atribuirse a las formas moleculares y su contenido de carbohidratos, lo que como ya se mencionó pueden modificar la acción biológica de la hormona.

La función más importante de la LH en el hombre es estimular a las células intersticiales del testículo para la producción de testosterona la principal hormona androgénica, la que a su vez determina el desarrollo de los órganos sexuales secundarios: el conducto deferente, la próstata y las vesículas seminales, regulando también la conducta sexual.

## **HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (FSH)**

La FSH al igual que la LH es una glicoproteína compuesta de dos subunidades (alfa y beta). La subunidad alfa es idéntica a la de la LH, mientras que la subunidad beta es única y presenta 115 aminoácidos con dos cadenas laterales de carbohidratos y un ácido siálico terminal. La presencia de estos grupos de carbohidratos es importante porque además de influir en su grado de acción biológica disminuye la depuración metabólica de esta hormona a nivel renal, presentando por lo tanto una vida media plasmática mayor que la de la hormona no glicosilada (16). La FSH también es secretada de manera pulsátil por las células gonadotropas, pasa a la circulación y va al testículo para estimular el epitelio de los túbulos seminíferos para la espermatogénesis, por lo cual, alteraciones en la secreción de esta hormona o en la proporción de sus isoformas pueden determinar esterilidad (17, 18).

## **ESTEROIDES GONADALES**

Los tres esteroides de importancia básica en la función reproductora del hombre son testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y estradiol (E2). La T es el principal andrógeno secretado por los testículos, específicamente por las células de Leydig, en

tanto que otros andrógenos como la dihidroepiandrosterona (DHEA) provienen de las suprarrenales. Los testículos secretan además cantidades pequeñas de dihidrotestosterona, el andrógeno más potente a nivel intracelular, y un andrógeno débil la androstendiona (A). Las células de Leydig también secretan pequeñas cantidades de estradiol (E2), estrona (E1), pregnenolona, progesterona (P), 17 alfa-hidroxipregnenolona y 17-alfa-hidroxiprogesterona. Cabe mencionar que la dihidrotestosterona (DHT) y el E2 son producidos no sólo por secreción directa de los testículos, sino fundamentalmente por conversión en los tejidos periféricos, a partir de precursores de andrógenos y estrógenos secretados por los testículos y las suprarrenales (8).

En la sangre, andrógenos y estrógenos circulan en forma libre o ligados a proteínas séricas transportadoras; la testosterona se encuentra en un 55% ligada a la proteína ligadora de T (TeBG) o globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), en un 42 % a la albúmina y solamente 2% a 3% en forma libre; esta última es la única que puede penetrar en las células y ejercer sus efectos metabólicos (19). Varios factores hormonales y condiciones patológicas pueden alterar los niveles de TeBG sanguíneos. Por ejemplo, estrógenos y hormonas tiroideas incrementan los niveles plasmáticos de TeBG reduciendo la fracción de T "libre". Por el contrario andrógenos, glucocorticoides, la hormona de

crecimiento y la obesidad, disminuyen los niveles de TeBG, incrementando la fracción de T "libre" permitiendo una mayor disponibilidad para el órgano blanco (20).

La T sale de la circulación y rápidamente atraviesa la membrana celular de las células blanco donde es transformada enzimáticamente a otro andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT), por la enzima microsomal 5 alfa reductasa. Después la DHT se une a una proteína receptora intracitoplásmica específica, diferente de la proteína que liga andrógenos y de la SHBG. La interacción del complejo DHT receptor con la cromatina nuclear, culmina con la síntesis de RNA mensajero que es transportado al citoplasma, donde dirige la transcripción y la síntesis de nuevas proteínas, factores de crecimiento, o enzimas inducidas por andrógenos que son responsables de los cambios que constituyen en conjunto la acción androgénica.

En el hombre, se conocen diversos efectos biológicos de los andrógenos que son esenciales para la diferenciación apropiada del sistema genital interno y externo durante el desarrollo fetal. En la pubertad, hay crecimiento del escroto, epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales, próstata y pene, mediado por los andrógenos. Asimismo estimulan el crecimiento del músculo estriado y la laringe, que da por consecuencia el engrosamiento de la voz y de las láminas cartilagosas epifisarias, por lo cual se manifiesta en la pubertad una fase de

crecimiento lineal acelerado. Los andrógenos también estimulan el crecimiento del vello ambisexual (púbico y axilar) de tipo androide o masculino (barba, bigotes, vello del tórax, abdomen y dorso), además estimula la actividad de las g'landulas sebáceas, la eritropoyesis y otros efectos anabólicos, siendo responsables también de los cambios conductuales característicos del sexo masculino (8).

### CONTROL DE LA FUNCION TESTICULAR

#### EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-TESTICULOS

La secreción de LH y en grado menor la de FSH (Fig. 1), está regulada por la estimulación episódica de la hipófisis, por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o LH-RH), la cual es un decapeptido sintetizado por las neuronas hipotalámicas secretado de manera pulsátil hacia el sistema venoso portal hipotálamo-hipofisario, por el cual es llevado hasta la hipófisis anterior, en donde se une a receptores específicos de alta afinidad, sobre la membrana plasmática de los gonadotropos de la pituitaria para estimular la síntesis de LH y FSH. Los efectos de la GnRH sobre la liberación de las gonadotropinas son dependientes del

calcio, mediado por un incremento en el movimiento de fosfolípidos, formación de diacilglicerol, trifosfato de inositol y finalmente la activación de calcio y de la proteincinasa dependiente de fosfolípido (proteincinasa C).

La síntesis hipotalámica de GnRH y su liberación es a su vez regulada por neurotransmisores estimulatorios e inhibitorios (catecolaminas, serotonina y aminoácidos), péptidos opiodes como las beta endorfinas y metaencefalinas, neuropéptidos como la sustancia P, el neuropéptido Y y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). La pulsatibilidad de la LH es un reflejo estricto de la pulsatibilidad de GnRH, sin embargo puede no ser necesariamente igual para la producción hormonal gonadal, ya que ésta puede responder a tratamientos suprafisiológicos con gonadotropinas exógenas como la Gonadotropina coriónica (HCG). En el hombre la LH liberada por la hipófisis pasa a la circulación y es captada por las células de Leydig en las que se une a receptores específicos de membrana. Esta unión activa la adenilatociclase y genera AMPc y otros mensajeros, fenómeno que culmina con la secreción de andrógenos como la T y la DHT. Aunque la testosterona al alcanzar un nivel adecuado (6-10 ng/ml) ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH (retroalimentación o feed-back negativo), la T puede ser parcialmente convertida a estradiol (E2) por la

aromatasa, sin embargo, se sabe que su efecto inhibitorio sobre la liberación de LH es por sí misma y persiste al mismo nivel en presencia de un inhibidor de aromatasa. La DHT inhibe la liberación de LH con un incremento concomitante en la concentración de E2. (21)

Los estrógenos y andrógenos producen efectos diferenciales sobre la frecuencia de secreción pulsátil de LH, así como sobre la amplitud de los picos. El efecto de la T es frecuentemente mediado a nivel del hipotálamo disminuyendo la frecuencia de los pulsos de GnRH, en contraste, el efecto temprano de E2 sobre la liberación de LH es disminuir la amplitud de los pulsos por una acción directa sobre la hipófisis, no obstante los estrógenos también tienen efecto sobre el hipotálamo inhibiendo la liberación de GnRH. Respecto a la FSH, una vez secretada por la hipófisis en respuesta a la estimulación de GnRH, pasa a la circulación y va al testículo donde se une a receptores específicos sobre la membrana plásmática de las células de Sertoli, estimulando la producción de una variedad de proteínas que son importantes en la espermatogénesis, como la transferrina, la inhibina y la proteína ligadora de andrógenos (ABP), esta última permite mantener una elevada concentración intratubular de testosterona, necesaria también para la producción de espermatozoides. (22)

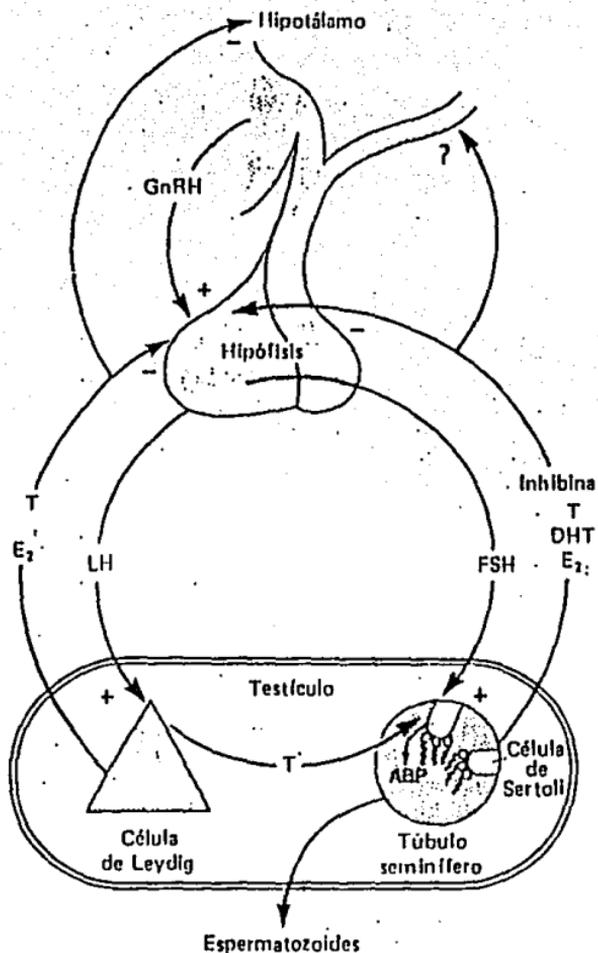


Fig 1Eje hipotálamo-hipófisis-testículos. GnRH = hormona liberadora de gonadotropinas; LH = hormona luteinizante; FSH = hormona estimulante del foliculo; T = testosterona; DHT = dihidrotestosterona; ABP = proteína ligadora de andrógeno; E<sub>2</sub> = estradiol; + = influencia positiva; - = influencia negativa.

La inhibina es una hormona glucoproteica constituida por dos subunidades denominadas alfa y beta ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que se unen entre sí por puentes disulfuro para formar el dímero de la hormona. Es producida por las gónadas y tiene un papel fisiológico importante porque actúa sobre la pituitaria para inhibir la liberación de la FSH.

### HIPOGONADISMO MASCULINO

La evaluación de pacientes con evidencia clínica de hipogonadismo se efectúa en la actualidad mediante la medición sérica de testosterona (T), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) y en ocasiones también de prolactina (PRL), debido a que la hiperprolactinemia modifica la función testicular. Una baja concentración de testosterona es indicativa de hipogonadismo, que se clasifica de acuerdo a las concentraciones de LH y FSH en hipogonadismo hipergonadotrópico, o hipogonadotrópico si FSH y LH se encuentran en bajas concentraciones se encuentran elevadas (hipergonadotropismo) nos indica un desorden testicular primario y falla de los mecanismos de retroalimentación, en tanto que el hipogonadotropismo indica un daño a nivel de la glándula pituitaria. En cuanto a su etiología el hipogonadismo se ha clasificado en tres categorías principales: 1) por defectos hipotálamo-hipofisarios

## CLASIFICACION DEL HIPOGONADISMO

1. Anormalidades en la función hipotálamo-hipófisaria por:
  - a. Panhipopituitarismo (congénito o adquirida)
  - b. Síndromes hipotálamicos (congénitos o adquiridos)
  - c. Deficiencia selectiva de LH y/o FSH (Síndrome de Kallman)
  - d. Hiperprolactinemia (adenoma cromóforo)
  - e. Desnutrición y anorexia nerviosa
  - f. Supresión de LH inducida por fármacos (andrógenos, estrógenos, antidepresivos, antihipertensivos).
2. Anormalidad primaria gonadal
  - a. Adquirida (castración, orquítis, irradiación)
  - b. Cromosomal (Klinefelter y variantes, hermafroditismo)
  - c. Síntesis defectiva de andrógenos.
  - d. Agenesia testicular.
  - e. Enfermedad selectiva de túbulos seminíferos.
  - f. Factores diversos (Síndrome de Noonan, miotonía distrofica, fibrosis cística).
3. Defecto en la acción de andrógenos (Pseudohermafroditismo)
  - a. Insensibilidad completa a andrógenos (testículo feminizante)
  - b. Sensibilidad incompleta a andrógenos. (defecto del receptor de testosterona, deficiencia de 5 alfa reductasa)

Fuente: Moore T., 1990.

(hipogonadismo hipogonadotrópico) 2) defecto gonadal primario (hipogonadismo hipergonadotrópico y 3) por alteración en la acción de los andrógenos, debido a fallas a nivel de receptores.

Cada una de estas categorías comprenden múltiples subcategorías como se describen en el tabla I.

## **EVALUACION DE LA FUNCION GONADAL DEL HOMBRE**

### **EVALUACION CLINICA**

El cuadro clínico de individuos con deficiencia en la producción o en la acción de la testosterona, depende de la edad en la que comienza el padecimiento. La deficiencia de andrógenos durante el segundo o tercer mes del desarrollo fetal, ocasiona grados variables de ambigüedad de los genitales externos y pseudohermafroditismo; en cambio la deficiencia prepuberal de andrógenos ocasiona desarrollo inadecuado de los caracteres sexuales secundarios y proporciones eunucoideas del esqueleto, el pene no se desarrolla normalmente, los testículos permanecen pequeños y el escroto no presenta arrugas características de la pubertad. La voz sigue teniendo tono elevado y la masa muscular no muestra desarrollo completo, con lo cual la potencia y resistencia normal del hombre no se alcanzan en su plenitud. La falta de estimulación adecuada para el

crecimiento del vello "sexual" ocasiona escasez del mismo en axilas y púbis (que reciben estimulación solamente de los andrógenos suprarrenales) y está ausente o escaso en la cara, el torax y la zona superior del abdomen. Aunque no ocurre la fase de aceleración del crecimiento mediada por andrógenos durante la pubertad, las láminas epifisarias de los huesos largos muestran crecimiento por la influencia de las somatomedinas y otros factores de crecimiento. En consecuencia, los huesos largos de las extremidades superiores e inferiores crecerán sin guardar proporción con el esqueleto axil. (23-24)

Si la deficiencia de testosterona se presenta después de la pubertad, el individuo presenta características sexuales normales con disminución de la líbido, impotencia y desgano. Los pacientes con deficiencia parcial de andrógenos o de reciente inicio a veces advierten disminución en el crecimiento del vello facial o corporal.

#### EXAMEN DE LOS GENITALES

En la evaluación clínica del hipogonadismo en el hombre, es esencial el estudio adecuado de los genitales. La exploración debe hacerse en un cuarto cálido para que se relaje el músculo dartos del escroto, es importante examinar el pene en busca de hipospadias, epispadias o pene "chordee" (angulación anormal del pene por una placa fibrótica), que

pueden interferir en la fecundidad. La longitud del pene durante el estado flácido debe medirse en su cara dorsal con elongación completa, desde la unión cutánea del púbis y el miembro hasta el extremo del glande. La circunferencia debe ser medida con el miembro flácido, el volúmen testicular también debe ser medido percatándose de la consistencia. Los testículos pequeños y duros son característicos de hialinización o fibrosis, como puede ocurrir en el síndrome de Klinefelter. En hombres prepuberales, normalmente los testículos son pequeños y de consistencia similar al caucho; en el adulto, estas características denotan estimulación deficiente por gonadotropinas. Los testículos demasiado blandos son característicos de individuos con atrofia testicular pospuberal.

Se debe estudiar también el epidídimo y el conducto deferente, realizando además una evaluación en busca de varicocele (que resulta de la insuficiencia de la vena espermática interna), debido a que representa una causa importante de esterilidad en el hombre, que puede ser corregida.

## PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EVALUAR LA FUNCION TESTICULAR

### ANALISIS DE SEMEN

Por lo general no basta un análisis de semen para realizar el diagnóstico de trastorno de la función testicular, debido a que en hombres normales, se advierten importantes variaciones en algunos de los índices, por lo que es conveniente estudiar cuando menos tres muestras de semen a intervalos de 2 a 3 meses.

El semen debe reunirse por masturbación después de dos a seis días de abstinencia sexual. Si el individuo no se masturba, se puede recurrir a un condón de plástico de diseño especial, para que lo use durante el coito. Si ninguno de los dos métodos es satisfactorio, puede usarse el coito interrumpido siempre y cuando se reúna toda la eyaculación.

Obtenida la muestra, ésta debe ser analizada en un tiempo de dos horas después de su obtención.

## MEDICIONES HORMONALES

### a) ESTEROIDES GONADALES.

Los esteroides gonadales (T, E2) pueden ser medidos por radioinmunoanálisis (RIA) el procedimiento de elección o algún otro inmunoensayo. A pesar de que su cuantificación aislada permite diferenciar entre individuos normales y los que tienen hipogonadismo, frecuentemente no permite identificar pequeñas deficiencias en la producción de andrógenos. En hombres normales, hay pulsos rápidos y frecuentes en la secreción de T sérica durante el día y un incremento mínimo por la noche. Por tal motivo cuando se sospecha ligero hipogonadismo se deben obtener cuando menos tres muestras de sangre a intervalos de 20 a 40 minutos durante la mañana, para medir T. Esta hormona puede medirse en cada una de las muestras, o bien se pueden combinar y mezclar fracciones iguales de cada una de ellas, para medir la hormona.

También es recomendable medir la concentración de estradiol (E2), ya que el incremento de esta hormona puede afectar negativamente el funcionamiento del testículo.

## b) GONADOTROPINAS Y PROLACTINA

Como ya se mencionó la LH y en menor grado la FSH son liberadas en forma pulsátil durante el día, por lo cual debe tomarse la muestra como se indicó para la determinación de testosterona. La finalidad de determinar la concentración basal de estas hormonas es diferenciar el hipogonadismo hipergonadotrópico (falla testicular primaria) del hipogonadismo hipogonadotrópico, en el cual las gonadotropinas están bajas o en límites bajos debido a una falla hipofisaria, que a su vez ocasiona la falla testicular (secundaria) así ambos tipos de hipogonadismo cursan con una baja producción de andrógenos.

La prolactina (PRL) cuando se encuentra en concentración elevada puede inhibir la liberación normal de gonadotropinas hipofisarias y alterar la función testicular, por lo que es necesaria su determinación. Las concentraciones de PRL en suero suelen ser estables durante todo el día, por lo cual basta medir la PRL en una sola muestra, sin embargo el paciente debe tener un ayuno mínimo de seis horas antes de tomar la muestra porque la ingestión de carbohidratos y proteínas puede modificar la secreción de prolactina por la hipófisis, en forma directa e inmediata.

## PRUEBAS DE RESERVA TESTICULAR

### A) PRUEBA DE ESTIMULACION CON GONADOTROPINAS

La gonadotropina corionica humana (HCG) es una hormona glucoprotéica con semejanza estructural y acciones biológicas semejantes a las de la LH. Después de inyectar HCG, esta hormona se une a los receptores de LH en las células de Leydig y estimula la síntesis y secreción de esteroides testiculares; de esta manera es posible valorar de manera directa la funcionalidad de las células de Leydig por inyección intramuscular de 5,000 UI de HCG al día, durante cuatro días. La respuesta normal comprende la duplicación de la concentración de testosterona después de la última inyección. De manera alternativa, puede administrarse una dosis intramuscular única de gonadotropina coriónica (5,000 UI en adultos o 100 UI/Kg en niños), con obtención de muestras de sangre 72 y 96 horas después para la medición de testosterona.

Los pacientes con hipogonadismo primario mostrarán menor respuesta después de la administración de HCG, en tanto que los que presentan insuficiencia de las células de Leydig como consecuencia de una falla hipofisaria o hipotalámica, tendrán una respuesta normal.

**B) PRUEBA DE ESTIMULACION CON CITRATO DE CLOMIFENO.**

El citrato de clomifeno (Clomid) es un compuesto no esteroide con débil actividad esteroideogénica que se une a receptores de estrógenos en diversos tejidos, incluyendo el hipotálamo. Al evitar que el E<sub>2</sub>, el estrógeno más potente, ocupe estos receptores, disminuye el bloqueo que esta hormona ejerce a nivel hipotalámico sobre la secreción de LH-RH, lo que se refleja en un incremento en la liberación de esta hormona y una mayor estimulación del gonadotropo para secretar mayor cantidad de LH y FSH.

La prueba se realiza con la administración de 100 mg de citrato de clomifeno por vía oral, dos veces al día, durante diez días. Un día antes de administrar el fármaco se toman a intervalos de 20 minutos, dos muestras de sangre para evaluar la concentración basal de FSH y LH y posteriormente, en los días octavo y décimo del tratamiento. Los hombres normales muestran un incremento del 50 % a 250 % en LH, y de 30 % a 200 % en FSH y testosterona en el décimo día de la prueba, mientras que los sujetos con enfermedad hipotalámica o hipofisaria no muestran el incremento normal de gonadotropinas.

### C. PRUEBA CON HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS

El decapeptido LH-RH, (GnRH o gonadoliberina) estimula de modo directo los gonadotropos de la adenohipófisis para secretar LH y FSH. Usualmente se administran 100 ug de Gn-RH en una sola inyección intravenosa rápida, tomando una muestra sanguínea 15 minutos antes de su aplicación (-15') otra en el momento mismo de su aplicación (0') y posteriormente a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos, para medir la concentración de LH y FSH. En jóvenes prepuberales normales, la respuesta de las gonadotropinas es baja y la FSH incrementa más que la LH. En el hombre adulto normal se observa un incremento de 2-5 veces la concentración basal de LH, con un incremento 2-3 veces la concentración de FSH. Sin embargo, algunos hombres normales no muestran incremento significativo de FSH después de recibir LH-RH. Los pacientes con enfermedad testicular terciaria (irigen hipotalámico) pueden responder con incrementos muy grandes de LH y FSH (7-10 veces). En los pacientes donde sólo existe lesión de los túbulos seminíferos, puede haber una respuesta anormal de FSH, con una respuesta normal de LH.

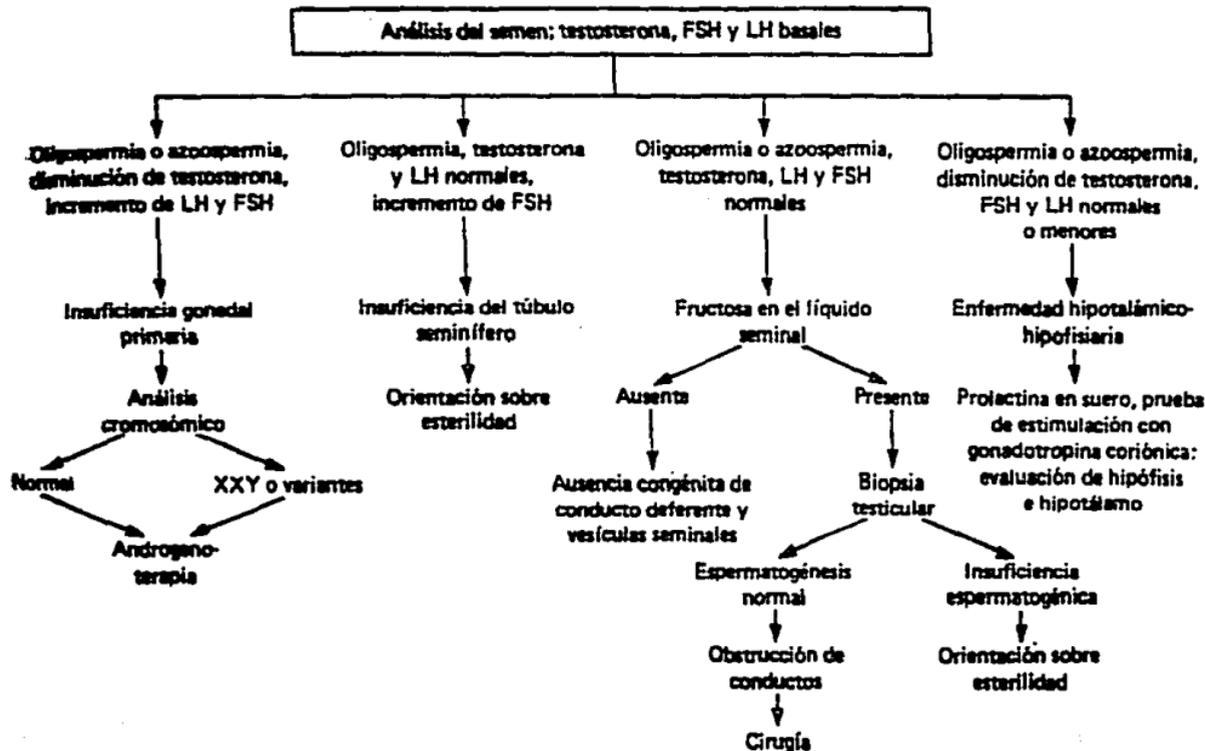
## BIOPSIA DE TESTICULO.

La biopsia testicular, esta indicada en hombres hipogonadales con testículos de tamaño normal y azoospermia, para diferenciar entre insuficiencia espermatogénica y obstrucción de conductos. El estudio del tejido testicular puede identificar en hombres oligospermicos aplasia germinal, hipoplasia, detención de la maduración y otras anomalías de la espermatogénesis.

En la figura 2 se muestra una ruta crítica para el diagnóstico de los trastornos gonadales en el hombre, en donde el análisis del semen y la estimación de las concentraciones basales de testosterona, LH y FSH nos permitirán diferenciar a los pacientes con insuficiencia gonadal primaria de los que presentan insuficiencia gonadal secundaria.

En pacientes con elevación de gonadotropinas como consecuencia de enfermedad testicular primaria, el análisis cromosómico permitirá diferenciar entre anomalías genéticas y los defectos testiculares adquiridos. Sin embargo no existe tratamiento que restaure la espermatogénesis en una persona con lesión testicular, siendo el tratamiento orientado solamente a la reposición de andrógenos. Los pacientes con insuficiencia aislada de los túbulos seminíferos, pueden tener concentraciones elevadas de FSH con cifras normales de LH y testosterona, y por lo

regular marcada oligospermia. Los hombres azoospermicos necesitan ser evaluados respecto a la posibilidad de obstrucción de conductos, debido a que esta alteración puede ser corregida por medios quirúrgicos. Pacientes con alteraciones o un defecto del eje hipotálamo hipofisario son los candidatos idóneos para realizar las pruebas de estimulación hipofisaria ya mencionadas así como estudios neuro-radiológicos y neuro-oftalmológicos.



Esquema para evaluación del hipogonadismo clínico.

Fig. 2

### OBJETIVOS

- Determinar el perfil cromatográfico de las formas moleculares de FSH y LH en el suero de varones con función testicular normal y caracterizar las isohormonas presentes.
- Determinar el perfil cromatográfico de las formas moleculares de FSH y LH en el suero de varones con hipogonadismo hipergonadotrópico y caracterizar las isohormonas presentes.
- Comparar el perfil cromatográfico en ambos grupos de estudio para averiguar si existen diferencias cualitativas o cuantitativas entre ellos.
- Medir el contenido de ácido siálico en las diferentes fracciones cromatográficas y relacionar su concentración con la inmunorreactividad de LH y FSH.
- Establecer una correlación entre la concentración de ácido siálico, el peso molecular de las isohormonas, y la inmunorreactividad de LH y FSH.
- Relacionar el porcentaje de cada una de las formas moleculares de LH y FSH con la concentración de esteroides gonadales (T y E2).

### METAS

- Identificar y caracterizar las isohormonas de FSH y LH presentes en el suero del hombre, en condiciones normales.
- Determinar si existen modificaciones cualitativas o cuantitativas en la proporción de las isohormonas en los pacientes con hipogonadismo.
- Determinar el grado de glicosilación de las diferentes moléculas de FSH y LH mediante la determinación de su contenido de ácido siálico.
- Determinar si la testosterona o el estradiol influyen en el grado de glicosilación de las moléculas de FSH y LH.
- Determinar el significado biológico de la heterogeneidad molecular de la LH y FSH.

## HIPOTESIS

El contenido de ácido siálico en FSH y LH puede modificarse por la concentración de los esteroides gonadales (estrógenos y testosterona) que se piensa regulan el grado de glicosilación de las moléculas, determinando así las isoformas presentes y el comportamiento cromatográfico de las gonadotropinas. Por lo tanto, los pacientes con hipergonadotropismo y bajos niveles de testosterona, pueden presentar alteraciones en las isohormonas y un perfil cromatográfico de gonadotropinas diferente de aquel que se encuentra en el suero de varones con una función testicular normal.

## TIPO DE ESTUDIO

Se llevó a cabo un estudio de tipo observacional, prospectivo, transversal y comparativo (25), realizado en el laboratorio de hormonas de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Endócrinas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional del IMSS.

## POBLACION

Se manejó una población de 17 pacientes de sexo masculino, 7 de los cuales presentaban hipogonadismo hipergonadotrópico y 10 con función testicular normal (grupo normal) bajo los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

## CRITERIOS DE INCLUSION

Grupo normal:

- a) Edad entre 20 y 70 años.
- b) De sexo masculino clínicamente normales y con paternidad comprobada.
- c) Con niveles hormonales basales, dentro de límites normales: testosterona de 3-10 ng/ml, estradiol menor de 20 pg/ml, FSH y LH menor de 25 y 20 mUI/ml respectivamente.
- d) Sin alteraciones a nivel hepático, tiroideo o del metabolismo de lípidos.
- e) Sin tratamiento hormonal previo

## PACIENTES CON HIPOGONADISMO HIPERGONADOTROPICO

- a) Entre 20 y 40 años de edad
- b) De sexo masculino, con datos clínicos de hipogonadismo.
- c) Con niveles hormonales indicativos de hipogonadismo hipergonadotrópico (LH y FSH mayor de 25 y 20 mUI/ml respectivamente, T menor de 4 ng/ml).
- e) Sin tratamiento hormonal previo.

**CRITERIOS DE EXCLUSION**

- a) Pacientes con las características anteriores que no deseen participar en el estudio.
- b) Pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico.
- c) Pacientes con hipogonadismo hipergonadotrópico sujetos a tratamiento.
- d) Pacientes con hipogonadismo asociado a hipotiroidismo, alteraciones hepáticas o dislipidémias.

**VARIABLES DEPENDIENTES**

- Concentraciones hormonales de LH, FSH, T y estradiol.
- El perfil cromatográfico inmunorreactivo de LH y FSH del suero de los pacientes.
- La concentración de ácido siálico en el suero y en las fracciones cromatográficas.
- Los cambios en la estructura de las isohormonas de LH y FSH.
- Correlación de los esteroides gonadales con cada una de isohormonas de LH y FSH.

**VARIABLES INDEPENDIENTES**

- Sexo y edad de los pacientes.
- El diagnóstico de hipogonadismo.

## M A T E R I A L

## MATERIAL DE VIDRIO

## ESPECIFICACIONES

Pipetas Pasteur	
Vasos de precipitados	100, 250 y 500 ml
Tubos de ensaye	18 x 150 mm
Pipetas serológicas	2, 5, y 10 ml.
Matraces erlenmeyer	500 y 2,000 ml
Matraces aforados	500, 250, 100 y 50 ml
Microjeringa	Hamilton de 500 ul
Columna de cromatografía	0.8 cm diámetro y 70 cm de longitud.

## MATERIAL DIVERSO

Micropipetas	50, 100, 200 y 1,000 ul
Tubos de plástico para RIA con tapón	12 x 75 mm
Térmometro	-10 a 200 °C
Tubos de plástico	13 x 100 mm
celdas de plástico	3 ml
Celdas espectrofotométricas de cuarzo	3 ml
Puntas para micropipetas	
Guantes de cirujano	
Baño María	
Papel absorbente	
Gradillas metálicas	
Gradillas de plástico	
Jeringas estériles	
Fibra de vidrio	
Crónometro	
Pinzas de tres dedos	
Soporte universal	

## EQUIPO

## ESPECIFICACIONES

Calculadora científica	Texas instruments
Colector de fracciones	Gilson
Potenciómetro	Beckman
Espectrofotómetro	Perkin-Elmer Lambda 4
A Detector de radiaciones gamma	Packard modelo Cobra
Balanza analítica	Chyo Jupiter C3-200
Refrigerador	Kelvinator
Balanza granataria	Ohaus
Baño de incubación	Precision scientific
Centrífuga con refrigeración	Sorvall RC-3
Congelador (-20 °C)	American
Agitador vortex	Lab-line instruments
Parrilla de calentamiento con agitación	Sybron/thermolyne
Computadora	Olivetti PCS 286

## REACTIVOS

Cloruro de sodio	Merck
Sephadex G-100	Pharmacia
Azul dextran	Sigma
Azida de sodio	Sigma
Fosfato ácido de sodio anhídrido	Merck
Fosfato di ácido de sodio	Merck
Albúmina Bóvina	Sigma
Acido sulfúrico	J. T. Baker
Periodato de sodio	Merck
Acido fosfórico	Merck
Meta arsenito de soo	Allied Chemical
Sulfato de sodio anhídrido	J. T. Baker
Acido 2-tiobarbitúrico	SICOBI
Acido clorhídrico	J. T. Baker
Etanol absoluto	Merck
Agua destilada	
Estándares de peso molecular conocido para cromatografía Sigma	
Estuches comerciales de Radioinmunoanálisis (RIA) para LH y FSH	
de la casa comercial Clinical Assays.	

## DILUCIONES

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 adicionado de NaCl 0.15 M. (PBS).

Soluciones estándar para ajustar pH a 4, 7 y 10

Acido sulfúrico 0.1 N

Peryodato de sodio 0.2 M en ácido fosfórico 9 M

Arsenito de sodio al 10 ‰ en sulfato de sodio 0.5 M

Sulfato de sodio 0.5 M en ácido sulfúrico 0.1 N

Ac. 2-tiobarbitúrico 0.6 ‰ en sulfato de sodio 0.5 M

Acido Clorhídrico al 5 ‰ en etanol absoluto

Albúmina Bóvina al 2.5 ‰

## T E C N I C A S

### TOMA DE MUESTRA

A cada uno de los pacientes se tomó una muestra de sangre venosa, bajo ayuno de 12 hrs, entre las 7:00 y 8:00 a.m. La sangre se dejó coagular separando el suero en varios tubos de plástico para congelarlos inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser procesados para determinar la concentración basal de E2, T, FSH, LH y Prolactina (PRL) por radioinmunoanálisis.

Además de las determinaciones anteriores, a todos los pacientes se les realizó un perfil de lípidos (colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL), pruebas de funcionamiento hepático (bilirrubinas directa e indirectas, proteínas totales, albúmina, globulina, relación A/G, aspartato amino transferasa, y alanino amino transferasa) y un perfil tiroideo (triyodotironina, tiroxina, tiroxina libre y hormona estimulante del tiroides) (26).

### CROMATOGRAFIA

Se preparó una columna cromatográfica de 0.8 cm de diámetro por 70 cm de longitud empacada con Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals), previamente hinchado en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4 durante 24 hrs (27). Para estandarizar las condiciones de la cromatografía, ésta se realizó en el cuarto frío, a una temperatura entre 4 y 8  $^{\circ}\text{C}$ , manteniendo durante todo el corrimiento cromatográfico una velocidad de flujo de una gota cada 20 segundos recolectando fracciones de 1 ml.

El volúmen vacío ( $V_0$ ) de la columna se determinó empleando azul dextran, compuesto que por su peso molecular (2,000 000) se elimina de la columna en los primeros mililitros o volúmen de exclusión del sistema. Para determinar el volúmen total ( $V_t$ ) se empleó una molécula pequeña como el 125-I. Enseguida se procedió a calibrar la columna con marcadores de peso molecular tales como: alcohol deshidrogenasa (DA) de 150,000 kDa, albúmina bovina (BSA) de 65,000 kDa, anhidrasa carbónica (CA)

de 29,000 kDa, citocromo C (CC) de 14,400 kDa y los estándares de FSH y LH marcados con  $^{125}\text{I}$ . Una vez cromatografiados todos los marcadores, se puede obtener la curva de calibración de pesos moleculares graficando el volumen de elución ( $V_e$ ) de cada uno de ellos o la relación  $V_e/V_o$  contra su peso molecular (PM). Esta curva de calibración nos permite conocer el PM de cada una de las isohormonas separadas en la cromatografía mediante la interpolación de su respectivo  $V_e/V_o$  en la curva.

Una vez realizado lo anterior se procedió a eluir los sueros de los sujetos del grupo control (4ml) y de los sueros de pacientes con hipogonadismo (1 ml).

Los eluatos se recolectaron en tubos de plástico de 13 x 75 mm conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de albúmina bovina al 2.5 %. Las fracciones obtenidas se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser sometidas al radioinmunoanálisis (RIA).

## RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

La cuantificación de las hormonas se realizó, tanto en los sueros, como en cada una de las fracciones de la cromatografía por duplicado, usando estuches comerciales de los laboratorios CIS-Internacional, para E2, PRL y T, y de Clinical Assays para las gonadotropinas FSH y LH). En el caso de estas últimas, los protocolos de RIA que se utilizaron se presentan en las tablas II y III.

Una vez obtenida la concentración hormonal de cada una de las fracciones cromatográficas, se graficó el volumen de elución de cada fracción contra su respectiva concentración de LH o FSH en mUI/ml, para así obtener el perfil cromatográfico de las isohormonas, en el suero de cada uno de los pacientes. Posteriormente se obtuvo la constante de partición (Kav) de cada picoimmunorreactivo observado, mediante la siguiente fórmula (28):

$$Kav = \frac{Ve - Vt}{Vt - Vo}$$

Donde: Ve es el volumen de elución, Vt es el volumen total y Vo es el volumen vacío de la columna.

En estas condiciones, cada una de las isohormonas presentes en el cromatograma pueden identificarse: 1) mediante su volumen de elución (Ve), 2) por su coeficiente de partición (Kav) y 3) por su peso molecular (PM), calculado sobre la curva de calibración elaborada con los marcadores de peso molecular.

## PROTOCOLO DEL RADIOINMUNOANALISIS (RIA) PARA LH

Tabla II

	Nº tubo	Sts (UI)	Muestras ó controles (UI)	Ab (UI)		*LH (UI)		React pp (ml)		
CT	1,2	----	----	----	I	100	I	----	<b>C O N T A R R</b>  <b>R A D I A C I O N E S</b>	
BK	3,4	300	----	----	N	100	C	1		Agitar
Bc	5,6	200	----	100	U	100	B	1		Incubar 15 min (T. amb)
Sts	7 a 16	200	----	100	B	100	A	1		
Sc bajo	17-18	----	200	100	A	100	R	1		Centri- fugar 30' 3,500rpm
Sc medio	19-20	----	200	100	R	100		1		
Sc alto	21-22	----	200	100	1 hr	100	20 hr	1		Decantar sobrenan- dante
Muestras	23 ....	----	200	100	Tem Amb	100	4-6 °C	1		

SI = estándar Ab = Anticuerpo \*LH = hormona marcada React pp = reactivo precipitante UI = microlitros  
 CT = Cuentas totales BK = Blanco Bc = Buffer control Sc = suero control

## PROTOCOLO DEL RADIOINMUNOANALISIS (RIA) PARA FSH

Tabla III

	Nº tubo	Sts (UI)	Muestras ó controles (UI)	Ab (UI)	*FSH (UI)			React pp (ml)		
CT	1,2	----	----	----	100	M		----	<b>C O N T A R R</b>  <b>R A D I A C I O N E S</b>	
BK	3,4	300	----	----	100	E		1		Agitar
Bc	5,6	200	----	100	100	L		1		Incubar 15 min (T. amb)
Sts	7 a 16	200	----	100	100	A		1		
Sc bajo	17-18	----	200	100	100	R		1		Centri- fugar 30' 3,500rpm
Sc medio	19-20	----	200	100	100	I		1		
Sc alto	21-22	----	200	100	100	N		1		Decantar sobrenan- dante
Muestras	23 ....	----	200	100	100	C	20 hrs 4 °C	1		

SI = estándar Ab = Anticuerpo \*FSH = hormona marcada React pp = reactivo precipitante UI = microlitros  
 CT = Cuentas totales BK = Blanco Bc = Buffer control Sc = suero control

## DETERMINACION DE ACIDO SIALICO

El termino "ácidos siálicos" es el nombre de un grupo de ácidos nonalosaminicos acilados, que se encuentran distribuidos en la naturaleza. Su estructura básica no sustituirá es común para todos y la mayoría son N-acilados y parte de ello además son ortosustituídos ( 29)

El ácido siálico se encuentra ampliamente distribuidos en los mamíferos y usualmente se encuentran como componente terminal de la porción no reductora de las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos, el más comunmente encontrado es el ácido N-acetilneuramínico (NANA). Los niveles elevados de NANA sérico total han sido asociados con tumores, especialmente en casos de enfermedad avanzada(30), sin embargo, se ha demostrado que la extensión del tumor puede no estar reflejada en los niveles séricos totales de NANA (31-32). Incrementos significativos han sido también asociados con desordenes neoplásicos, infecciones bacterianas y artritis reumatoide.

El ácido siálico fue cuantificado primeramente por Warren (34) por medio de una reacción colorimétrica posteriormente se implementaron otras reacciones colorimétricas, tales como: método del orcinol, resorcinol, difenil amina, método directo de Erlich y por el método del ácido tiobarbitúrico (34); en la actualidad el ácido siálico puede ser determinado por cromatografía de alta resolución (35-36), análisis fluorométricos (37) y ensayos enzimáticos.

En el presente estudio la cuantificación del ácido siálico en las fracciones de la cromatografía se llevó a cabo de acuerdo al método del ácido tiobarbitúrico modificado (38) el cual requiere de dos pasos fundamentales:

A) Hidrólisis de los sueros o de las fracciones cromatográficas.

- Tomar 0.2 ml de la muestra por determinar y añadir 0.05 ml de ácido sulfúrico 1 N.
- Ebullición por 1 hr y enfriar al chorro de agua.

B) Método colorimétrico.

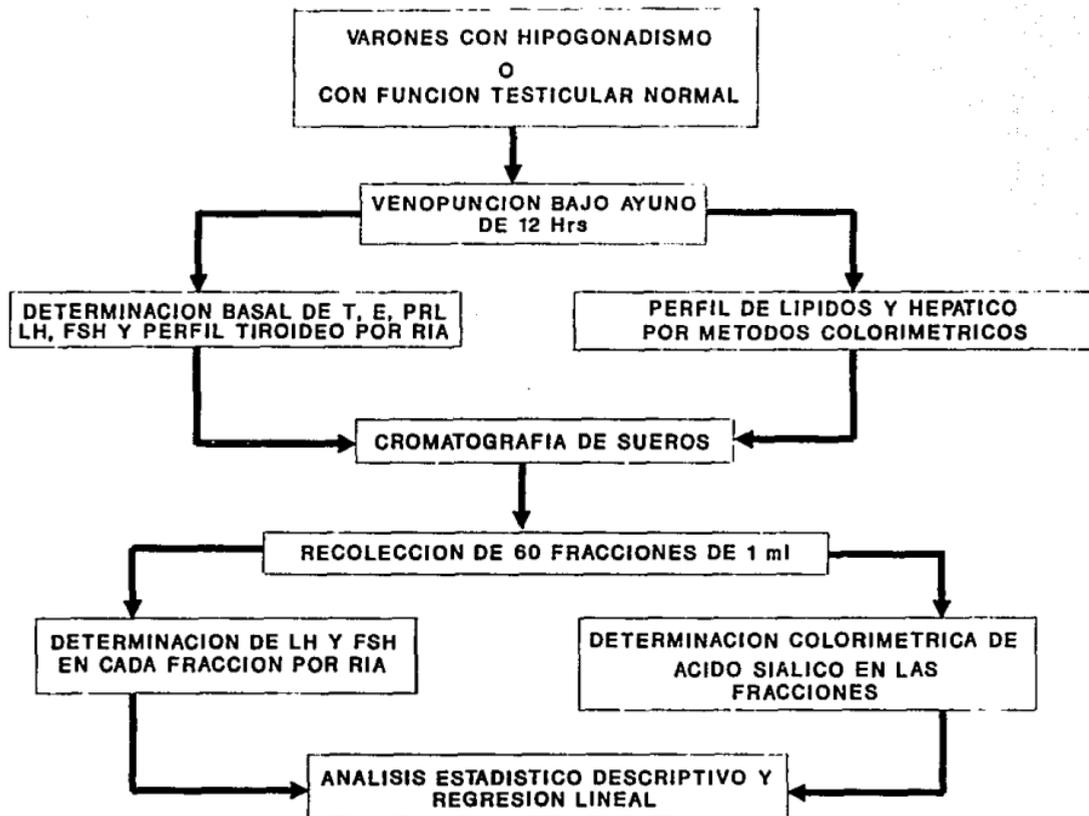
- Tomar 0.2 ml de la muestra hidrolizada + 0.05 ml de periodato de sodio 0.2 M.
- Mezclar y reposar 20 minutos
- Agitar y adicionar 0.5 ml de arsenito de sodio al 10 % en sulfato de sodio 0.5 M ácido sulfúrico 0.1 N

- Agitar vigorosamente, reposar 2 minutos y agitar
- Adicionar 1.5 ml de ácido 2-tiobarbitúrico al 0.6 % en sulfato de sodio 0.5 M
- Mezclar por inversión
- Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 1 hr
- Enfriar los tubos al chorro de agua fría
- Adicionar 2 ml de ácido clorhídrico al 5 % en etanol
- Colocar los tubos en un baño de incubación a 37 °C por 15 minutos
- Agitar vigorosamente
- Centrifugar a 3,500 rpm durante 15 minutos.
- Decantar y leer a 550 nm.

#### DISEÑO ESTADISTICO.

Debido a que se manejarán pocos pacientes se realizará un análisis estadístico descriptivo (media, desviación estándar y varianza) para comparar ambos grupos.

# DIAGRAMA DE BLOQUES



# RESULTADOS

**CONCENTRACION DE T, E2 Y RELACION E2/T  
EN HOMBRES NORMALES.**

Las concentraciones hormonales de los hombres que se estudiaron como controles normales, se reportan en la tabla 1.

Como se puede apreciar todos caen dentro de los valores de referencia establecidos para su sexo (LH < de 20 mUI/ml. FSH < de 25 mUI/ml, prolactina < de 15 ng/ml, estradiol < de 20 pg/ml y testosterona de 4 - 10 ng/ml. Sin embargo es importante mencionar que cuando se agrupan los pacientes por décadas (tabla 2) se observó que en los hombres mayores de 60 años la concentración de testosterona disminuyó en forma importante, mientras que la relación E2/T se incrementó significativamente.

## CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES DE HOMBRES NORMALES

PA- CIENTE	EDAD (AÑOS)	LH mUI/ml	FSH mUI/ml	PRL ng/ml	E2 pg/ml	T ng/ml	E2/T
1	24	16.7	7.9	9.2	23.0	10.1	2.28
2	26	23.0	6.0	4.9	21.3	6.0	3.35
3	33	18.6	14.0	1.7	20.4	7.2	2.83
4	38	12.7	15.6	13.0	29.9	6.3	4.75
5	44	20.3	10.0	4.8	13.5	5.9	2.29
6	49	11.5	12.3	11.7	16.0	4.0	4.0
7	53	12.7	12.6	11.5	23.7	7.1	3.34
8	53	22.8	18.5	4.2	21.2	4.2	5.04
9	62	24.5	10.0	4.8	12.5	2.3	5.43
10	62	13.83	20.8	3.1	20.0	5.4	3.70
<b>M ± DE</b>	<b>44.5 ± 13</b>	<b>17.6 ± 4.6</b>	<b>12.7 ± 4.3</b>	<b>6.8 ± 3.8</b>	<b>20.1 ± 4.8</b>	<b>5.8 ± 2.0</b>	<b>3.72 ± 1.0</b>

LH = Hormona luteinizante, FSH = Hormona folículo estimulante, PRL = Prolactina, E2 = Estradiol,  
T = Testosterona, E2/T = Relación estradiol-testosterona.

Tabla 1

**CONCENTRACION PROMEDIO DE T, E2 Y RELACION E2 /T  
EN HOMBRES NORMALES**

<b>E D A D (AÑOS)</b>	<b>TESTOSTERONA (ng/ml)</b>	<b>ESTRADIOL (pg/ml)</b>	<b>RELACION E<sub>2</sub>/T</b>
20 - 30	8.05	22.15	2.81
31 - 40	6.75	25.15	3.79
41 - 50	4.95	14.75	3.14
51 - 60	5.65	22.45	4.19
61 - 70	3.85	16.25	4.56

Tabla 2

**CONCENTRACION PROMEDIO DE T, E2 Y RELACION  
E2/T EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO.**

El grupo de pacientes con hipogonadismo presentó como puede observarse en la tabla 3 una concentración basal media de testosterona (T) menor de 4 ng/ml y en donde llama la atención el valor tan elevado de la relación E2/T, en cambio su concentración basal de gonadotropinas (LH y FSH) fué elevada (tabla 4) lo cual confirma el diagnóstico de hipogonadismo hipergonadotrópico. Estos valores se comparan con los de los hombres normales de acuerdo a su edad por décadas en la tabla 5 en donde se puede observar que existe una marcada diferencia entre los valores hormonales de los dos grupos, la testosterona es muy baja y la relación E2/T muy elevada en los hombres con hipogonadismo. Por otra parte, es importante mencionar que los pacientes fueron valorados clínicamente por el servicio de Andrología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, encontrando manifestaciones propias de falla testicular, lo que está de acuerdo con los resultados del estudio hormonal.

**CONCENTRACION PROMEDIO DE T, E<sub>2</sub> Y RELACION E<sub>2</sub>/T  
EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO**

<b>E D A D (AÑOS)</b>	<b>TESTOSTERONA ng/ml</b>	<b>ESTRADIOL pg/ml</b>	<b>RELACION E<sub>2</sub>/T</b>
<b>20 - 30</b>	<b>3.74</b>	<b>41.72</b>	<b>12.58</b>
<b>31 - 40</b>	<b>1.04</b>	<b>18.43</b>	<b>17.72</b>

Tabla 3

## CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES DE HOMBRES CON HIPOGONADISMO

GRUPO	EDAD (AÑOS)	LH mUI/ml	FSH mUI/ml	PRL ng/ml	E2 pg/ml	T ng/ml	E2/T
Hip.	23	39.00	80.73	7.20	< 5.00	0.38	12.89
	25	36.10	45.10	9.70	70.50	3.30	21.36
Hiperg.	36	129.90	162.80	3.02	9.90	2.30	4.30
	38	32.90	54.00	2.90	36.40	0.71	51.26
Est. Primaria	27	31.90	38.60	13.50	38.00	5.30	7.17
	30	23.40	42.70	7.30	53.50	6.00	8.92
	38	50.00	74.00	1.80	25.80	2.60	9.92
Herm. verd.	34	144.40	159.00	5.10	9.00	0.12	75.00
Ca. Test.	27	96.20	74.00	7.00	52.86	5.10	10.36

Tabla 4

**CONCENTRACION HORMONAL PROMEDIO DE TESTOSTERONA,  
ESTRADIOL Y RELACION E2/T EN HOMBRES CON  
HIPOGONADISMO EN COMPARACION CON LOS NORMALES**

<b>E D A D (AÑOS)</b>	<b>GRUPO DE PACIENTES</b>	<b>T (ng/ml)</b>	<b>E2 (pg/ml)</b>	<b>RELACION E2/T</b>
<b>20 - 30</b>	<b>NORMAL</b>	<b>8.05</b>	<b>22.15</b>	<b>2.81</b>
	<b>HIPOG</b>	<b>3.74</b>	<b>41.72</b>	<b>12.58</b>
<b>31 - 40</b>	<b>NORMAL</b>	<b>6.75</b>	<b>25.15</b>	<b>3.79</b>
	<b>HIPOG</b>	<b>1.04</b>	<b>18.47</b>	<b>17.72</b>

**HIPOG = GRUPO CON HIPOGONADISMO**

Tabla 5

**CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE LOS ESTEROIDES GONADALES  
CON LA EDAD DE LOS PACIENTES.**

En las figuras 1 y 2 apoyando lo observado en las tablas anteriores se muestra el comportamiento de la testosterona en función de la edad, observándose como disminuye su concentración conforme aumenta la edad. En el grupo control por arriba de los 60 años se tienen niveles bajos, indicativos de un hipogonadismo fisiológico. En ambos grupos, normal y patológico el coeficiente de correlación es muy semejante lo cual indica el grado de asociación entre las variables en los dos grupos estudiados ( $r = -0.698$  y  $-0.611$  respectivamente).

## CORRELACION DE LA TESTOSTERONA CON LA EDAD.

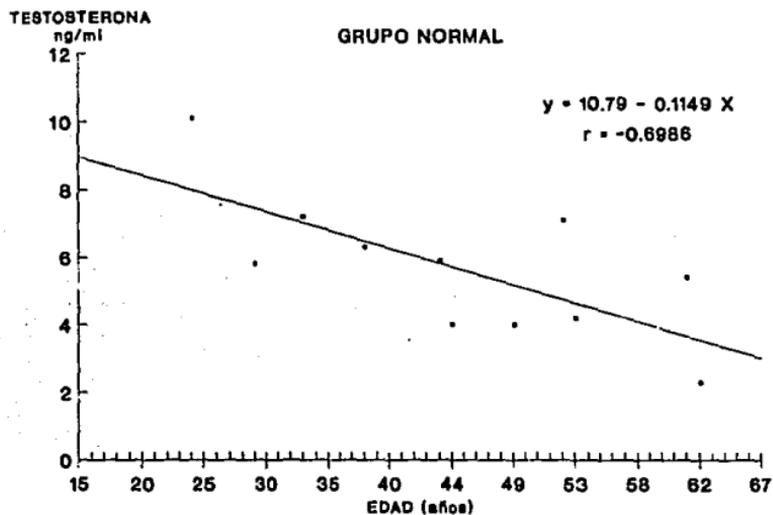


Fig. 1

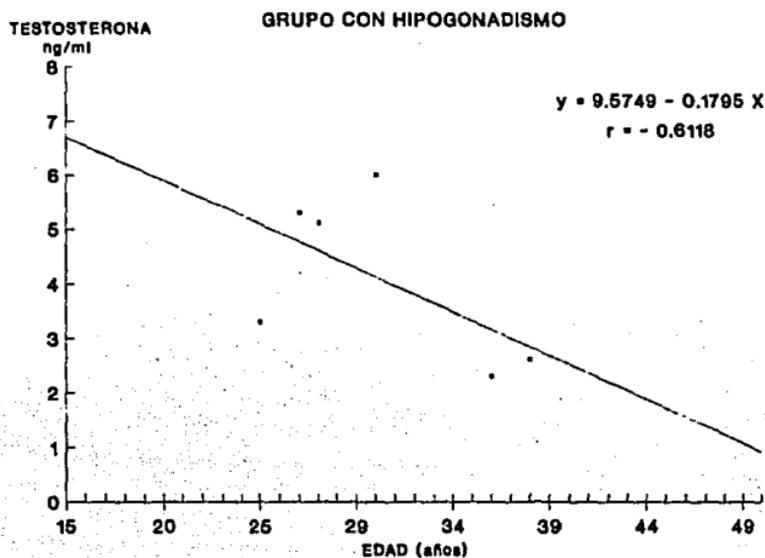


Fig. 2

**CORRELACION DE LOS NIVELES DE E2 CON LA EDAD DE LOS  
PACIENTES.**

En las figura 3 y 4 observamos como los niveles de estrógenos se mantienen, pero disminuyen ligeramente en el grupo control, conservándose en un rango de 30 a 15 ng/ml con un coeficiente de correlación de -0.417, en tanto que en el grupo con hipogonadismo el E2 disminuye su concentración con la edad, razón por la cual el coeficiente de correlación se incrementa ( $r = -0.8365$ ).

### CORRELACION DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL CON LA EDAD

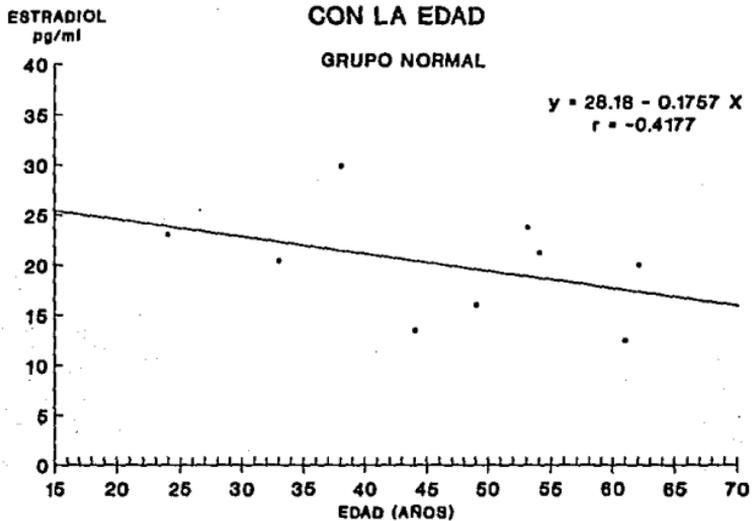


Fig. 3

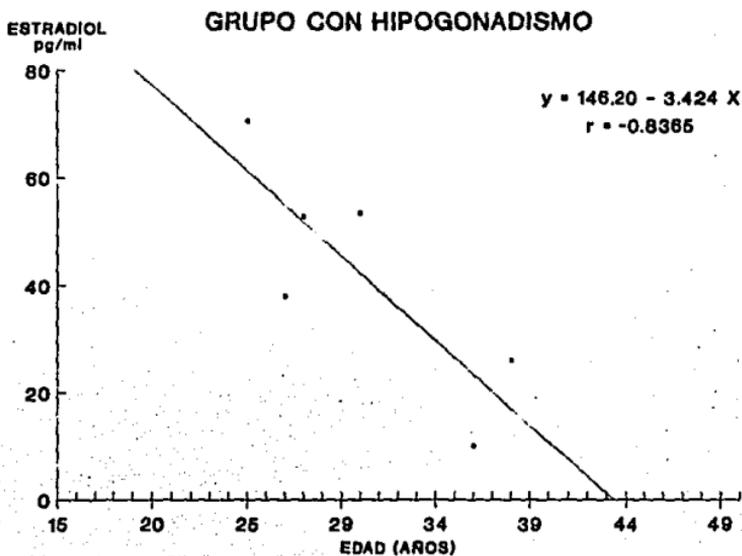


Fig. 4

**RELACION E2/T EN FUNCION DE LA EDAD DE LOS PACIENTES.**

Como una consecuencia lógica de las diferencias encontradas en la concentración de los esteroides gonadales, en el grupo normal (fig. 5) observamos como la relación E2/T se ve afectada aumentando con la edad, debido a la disminución de latestosterona, de ahí que la correlación sea positiva. En el grupo con hipogonadismo (fig. 6) se tiene una correlación muy similar en cuanto a valor numérico, pero con pendiente diferente, indicando una relación contraria.

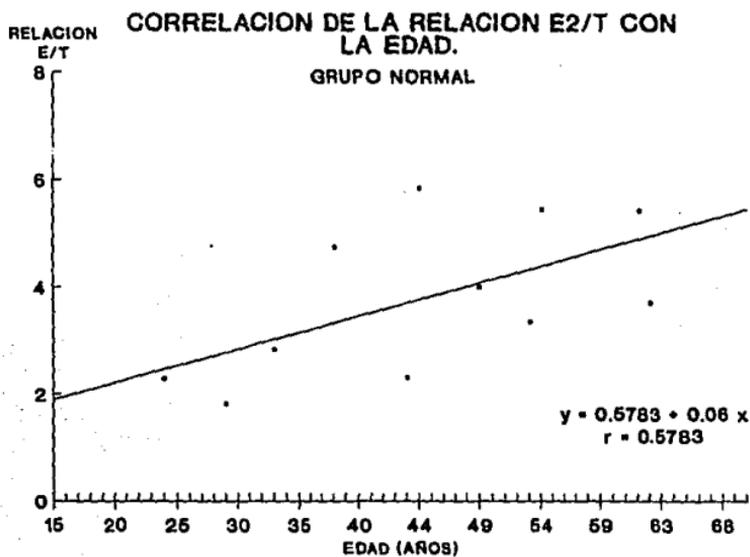


Fig. 5

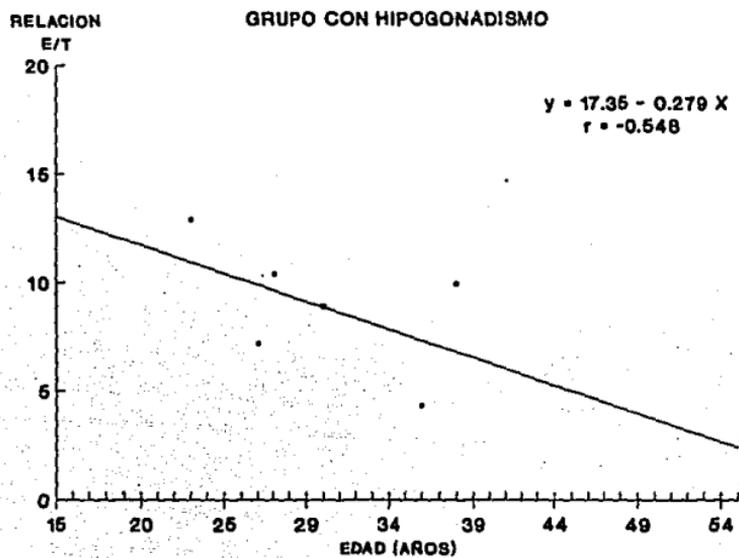


Fig. 6

**PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE FSH Y LH****- Identificación de las formas moleculares .**

La identificación de las isohormonas de FSH y LH en los cromatogramas, evaluada, evaluada mediante la inmunorreactividad de las hormonas en cada una de las fracciones de la cromatografía, permitió obtener los perfiles cromatográficos, al graficar en las ordenadas la inmunorreactividad de LH o FSH (mUI/ml) y en las abscisas su respectivo volumen de elución.

Así la figura 7 es un ejemplo representativo del comportamiento cromatográfico del suero de un hombre normal y representa un perfil de elución.

En la parte superior de la figura se indica con flechas el volumen de elución de los diferentes marcadores de peso molecular (PM) utilizados en la calibración de la columna los cuales se toman de punto de referencia para la identificación de las moléculas.

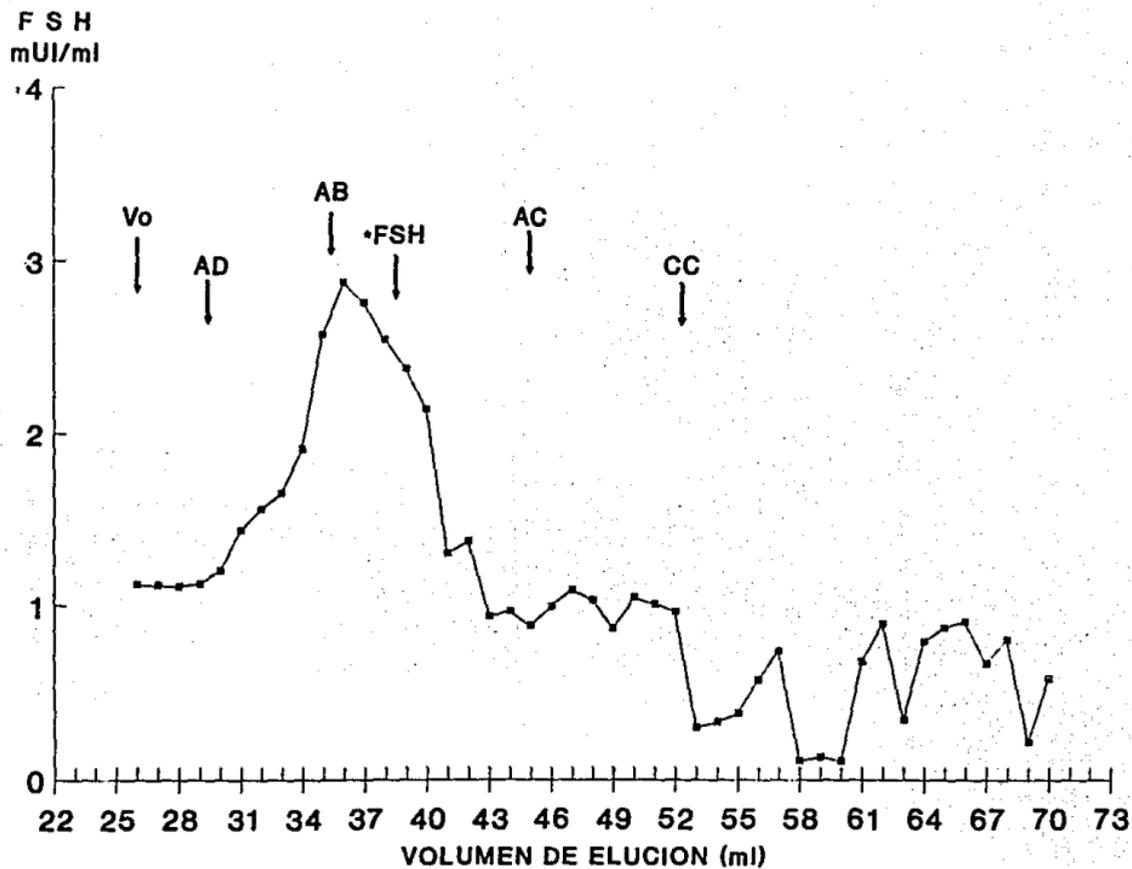


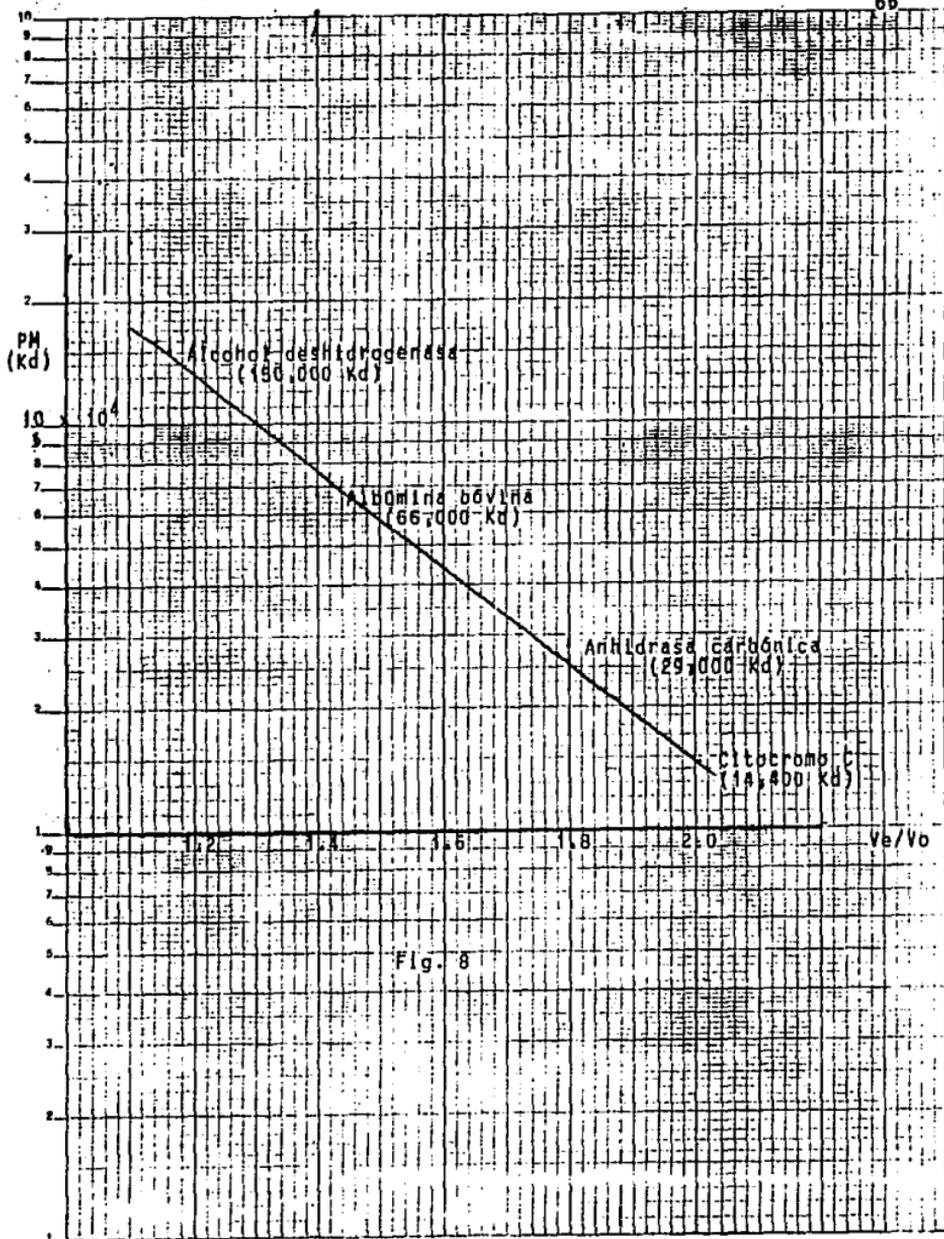
Fig. 7

- Caracterización de las diferentes formas moleculares.

Cada una de las moléculas identificadas en las diferentes cromatografías fueron caracterizadas por:

- 1) Su volúmen de elución.
- 2) Su constante de partición ( $K_{av}$ )
- 3) Su peso molecular, calculado en la curva de calibración de pesos moleculares (Fig 8) elaborada de acuerdo al corrimiento de los marcadores.

Tomando en cuenta estos criterios se pudieron detectar 6 diferentes variantes moleculares o isoformas de FSH (tabla 6) y otras tantas de LH (tabla 7).



## CARACTERIZACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH Y LH EN EL HOMBRE

MOLECULAS DE FSH	1	2	3	4	5	6
Ve (ml)	31	37	40	45	51	57
Kav	0.1348	0.2696	0.3370	0.4494	0.5848	0.7191
PM (Kd)	100-66	60	45	32-30	17-15	< 15

Tabla 6

MOLECULAS DE LH	1	2	3	4	5	6
Ve (ml)	31	37	40	45	51	57
Kav	0.093	0.2325	0.3025	0.4186	0.5581	0.6967
PM (Kd)	100-66	60	45	34	21-15	< 15

Tabla 7

PERFILES CROMATOGRAFICOS DE FSH Y LH EN EL GRUPO  
NORMAL.

En las figuras 9 a 14 se presentan los perfiles cromatográficos de la FSH en el hombre normal en las diferentes edades, mientras que las figuras 15 a 20 muestran los perfiles correspondientes a la LH en los mismos pacientes. En el caso de la FSH se observa en el hombre joven (figs. 9-11) un predominio de formas grandes (100-66 Kd) las cuales eluyen entre el azul dextran (AD) y la albúmina bovina (AB), presentándose también la molécula de 60 Kd que eluye con el estándar de la hormona marcada (\*FSH) y después la de 45 Kd en tanto que la forma molecular de 32-30 Kd que eluye poco antes de la anhidrasa carbónica (AC) se encuentran en menor proporción.

Llama la atención la presencia de subunidades libres (17-15 Kd) y fragmentos de bajo peso molecular (<15 Kd) en una proporción relativamente elevada, eluidos poco antes del citocromo C (CC) y después de este respectivamente.

Después de los 40 años (gráficas 12-14) el perfil cromatográfico de la FSH cambia, notándose un corrimiento paulatino del perfil hacia la derecha, es decir las formas grandes (100-66 Kd) disminuyen, incrementando su proporción la molécula que eluye con el estándar hormonal (60 Kd) y la molécula de 45 Kd eluida después de este y antes de la anhidrasa carbónica (AC). Se observa también la presencia de formas pequeñas (subunidades libres y fragmentos).

Este desplazamiento del perfil cromatográfico de FSH hacia la derecha, es aún más marcado después de los 50 años (figs. 13 y 14) edad en la que predomina la molécula que eluye con el estándar de \*FSH y la molécula de 45 Kd, con baja proporción de las formas grandes.

En el caso de la LH, los perfiles cromatográficos obtenidos en el suero de los hombres normales (figs. 15-20) muestran una tendencia similar a lo que ocurre con FSH, es decir un predominio de moléculas grandes (100-66 Kd) en los hombres jóvenes, (figs.15 y 16) con la actividad en el lado izquierdo del cromatograma, en moléculas que eluyen entre el Vo del sistema y la albúmina bódvina (AB), mientras que las moléculas que eluyen con la AB y el estándar hormonal de 45 Kd (\*LH) se encuentran solo en muy baja proporción al igual que las subunidades (eluidas después de la AC) y los fragmentos de degradación eluidos con el CC y después de éste. Conforme avanza la edad (figs. 17 y 18) las formas grandes eluidas antes de AB disminuyen, aumentando la proporción de la forma molecular de 60-66 Kd (AB) y la isoforma de 34 Kd, que eluye después del estándar. A partir de los 50 años (figs. 19 y 20) la disminución de las formas grandes es más marcada, llegando a predominar la molécula de 34 Kd que eluye después del estándar de \*LH y poco antes de la anhidrasa carbónica (AC).

### PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE FSH EN HOMBRES NORMALES

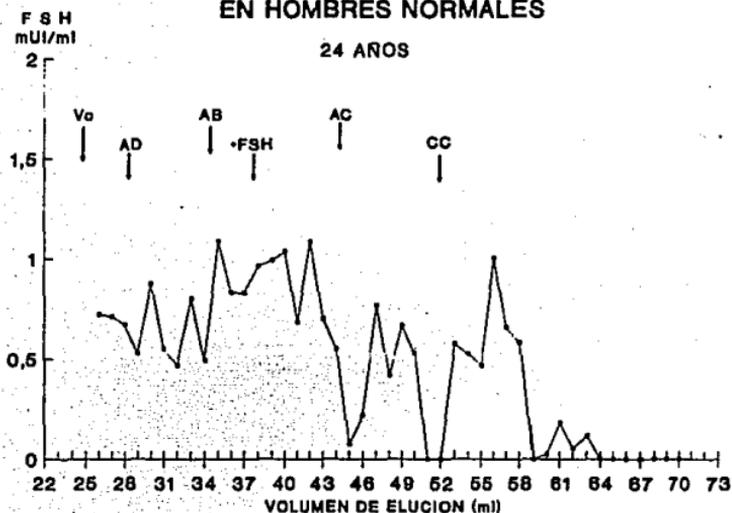


Fig. 9

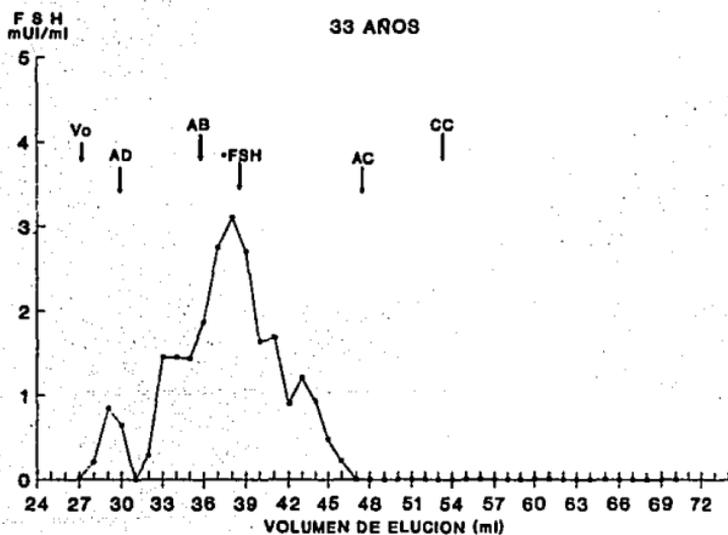


Fig. 10

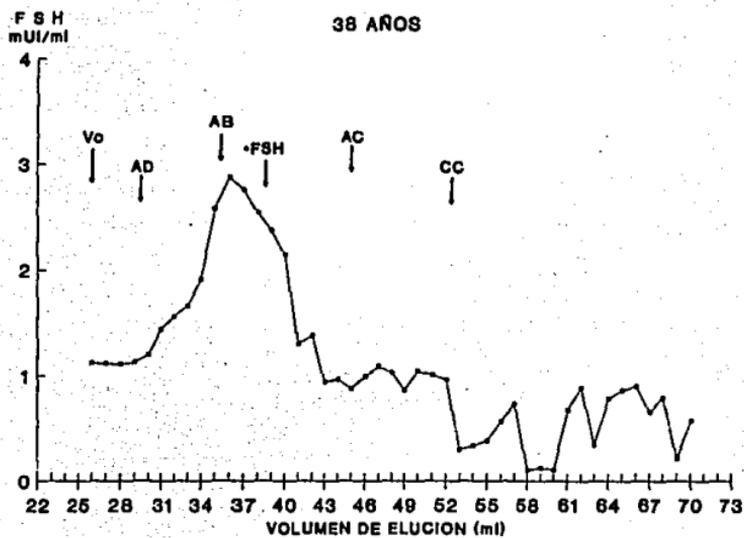


Fig. 11

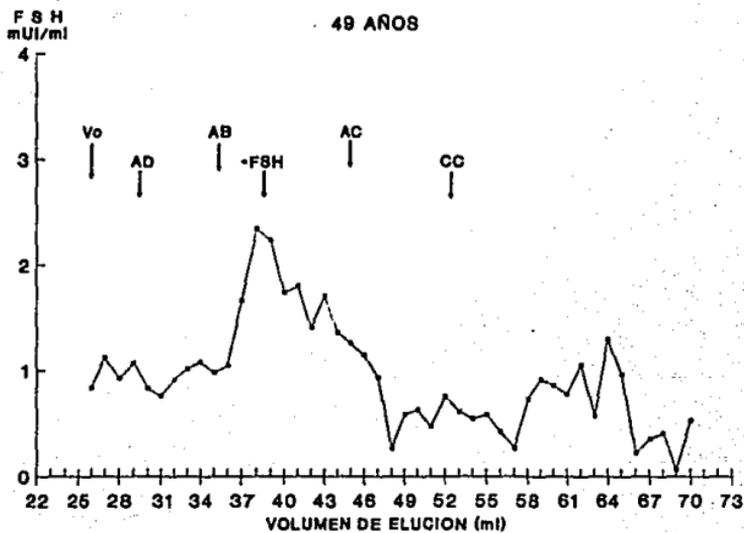


Fig. 12

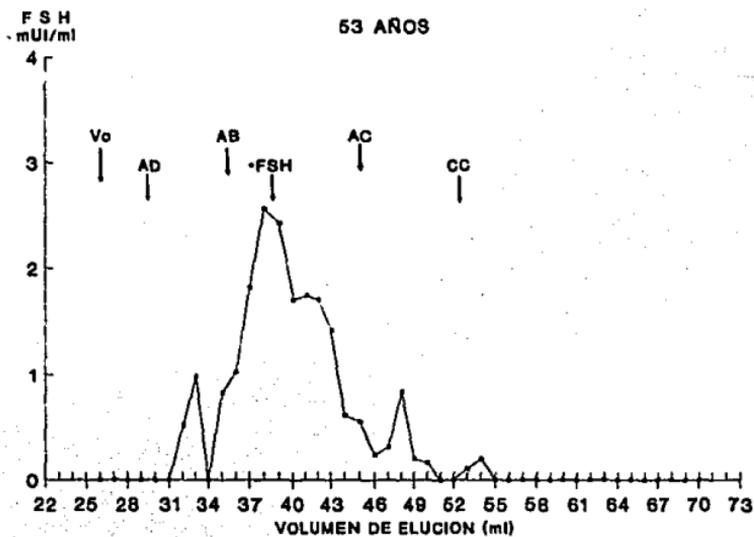


Fig. 13

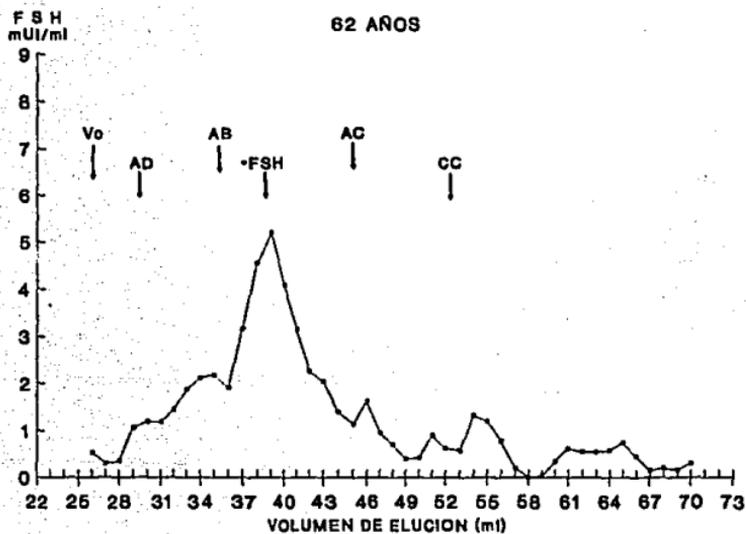


Fig. 14

PERFILES CROMATOGRAFICOS DE LH  
EN HOMBRES NORMALES.

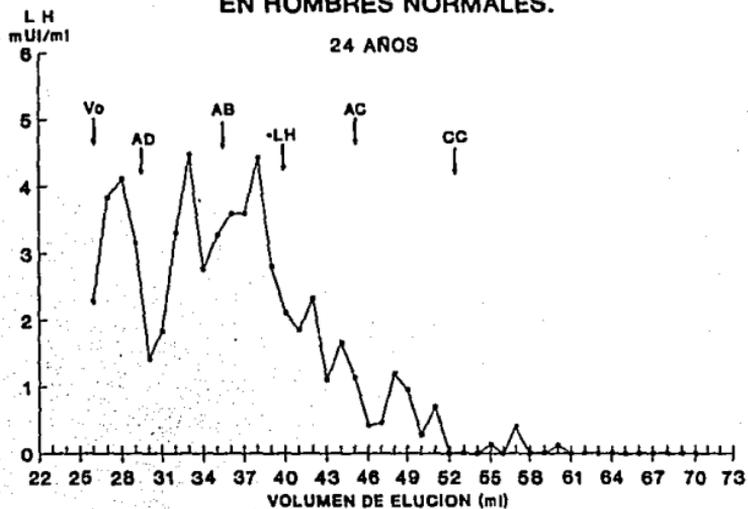


Fig. 15

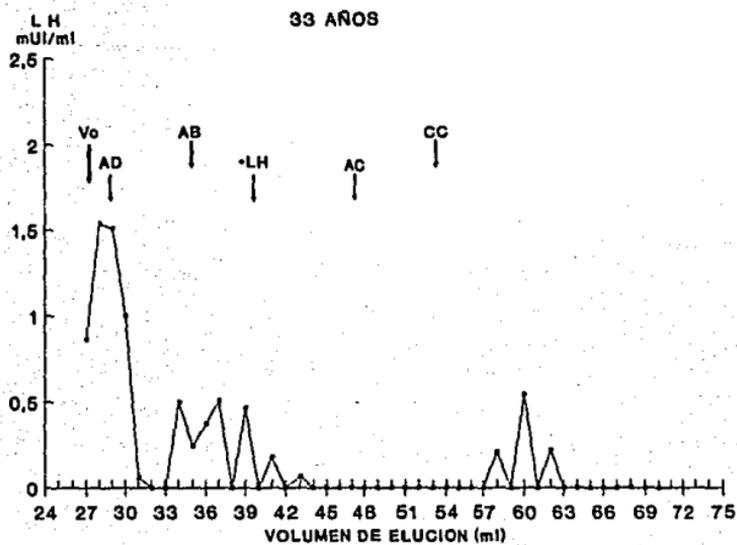


Fig. 16

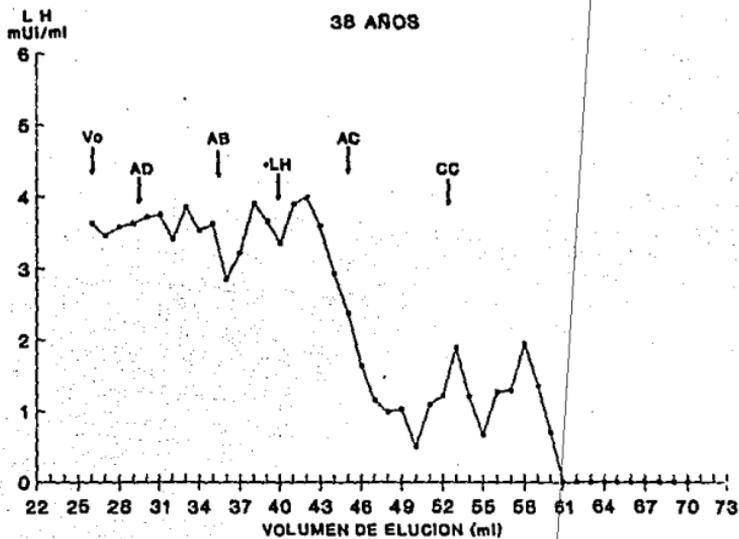


Fig. 17

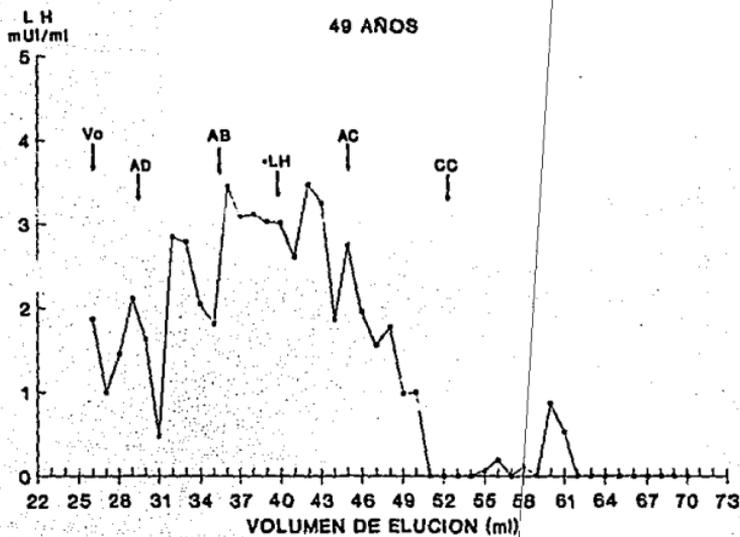


Fig. 18

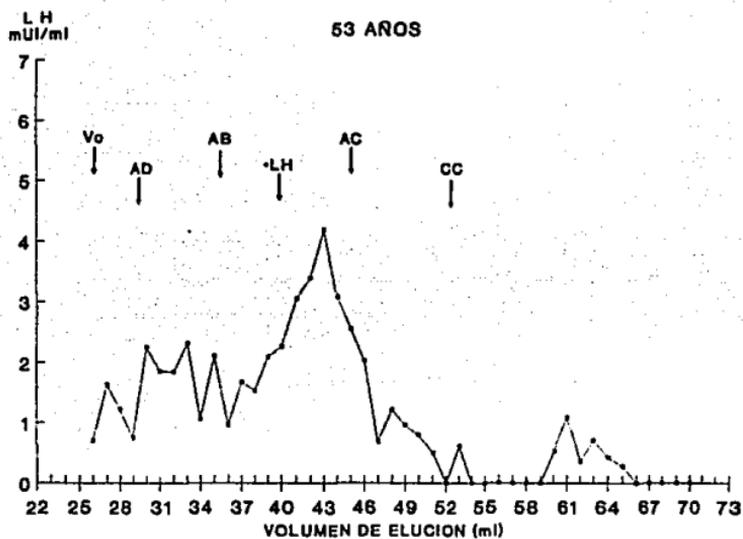


Fig. 19

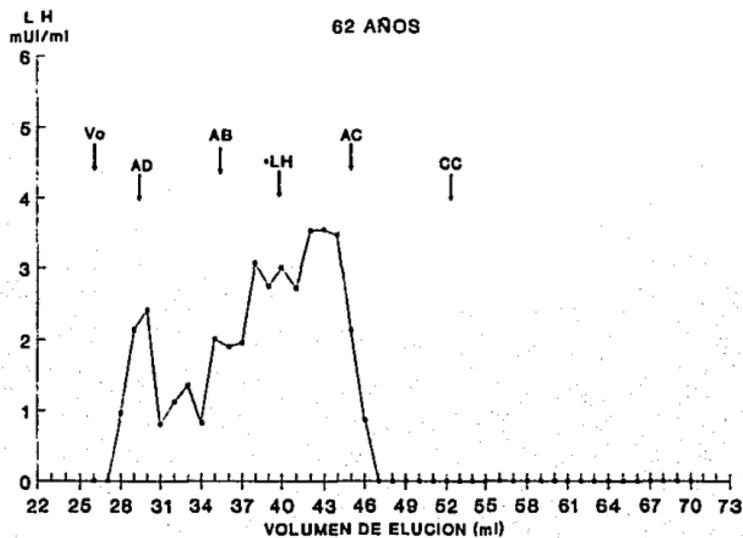


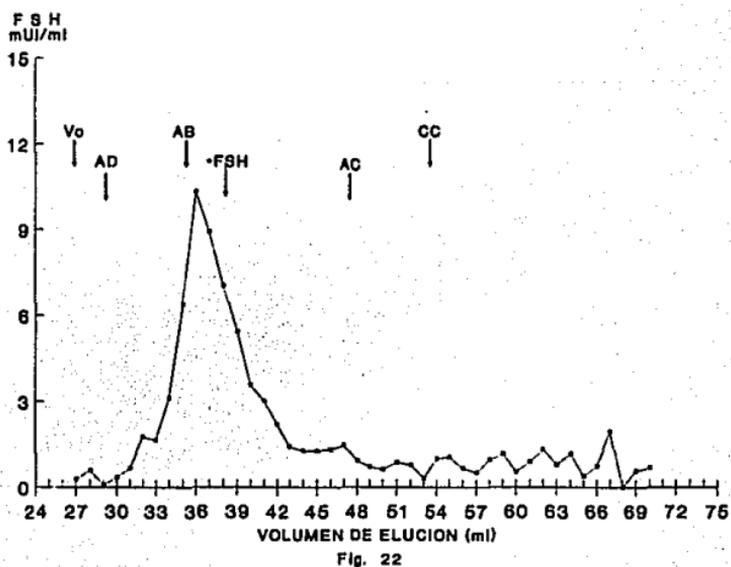
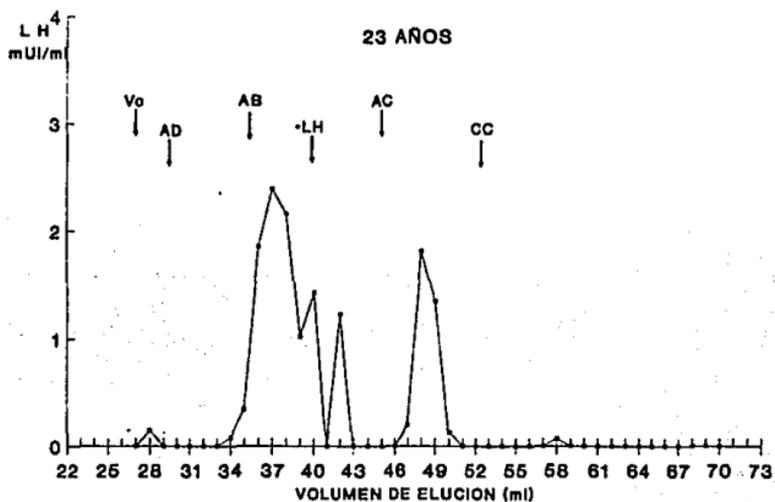
Fig. 20

PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LH Y FSH EN  
HOMBRES CON HIPOGONADISMO.

I) HIPOGONADISMO HIPERGNADOTRÓPICO.

Las figura 21 a 28 muestran los cromatogramas obtenidos del suero de hombres con hipogonadismo hipergonadotrópico (falla testicular primaria), presentándose en la parte superior de cada página el perfil cromatográfico de la LH y en la parte inferior el de la FSH. Destaca en estos casos para ambas hormonas, la baja proporción de formas grandes que son las que predominan en el suero de los hombres normales jóvenes (figs. 7-13). En algunos sueros de los hombres con hipogonadismo éstas moléculas están prácticamente ausentes (Figs. 21-26) o muy disminuidas (figs. 27 y 28) con un predominio franco de las moléculas que eluyen con la AB (60 kd) y con el estándar hormonal de \*LH o \*FSH, con muy baja proporción de la molécula de 34 Kd (AC) y de las subunidades libres (CC) y los fragmentos de degradación.

PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LH Y FSH EN HOMBRES  
CON HIPOGONADISMO HIPERGONADOTRÓPICO.



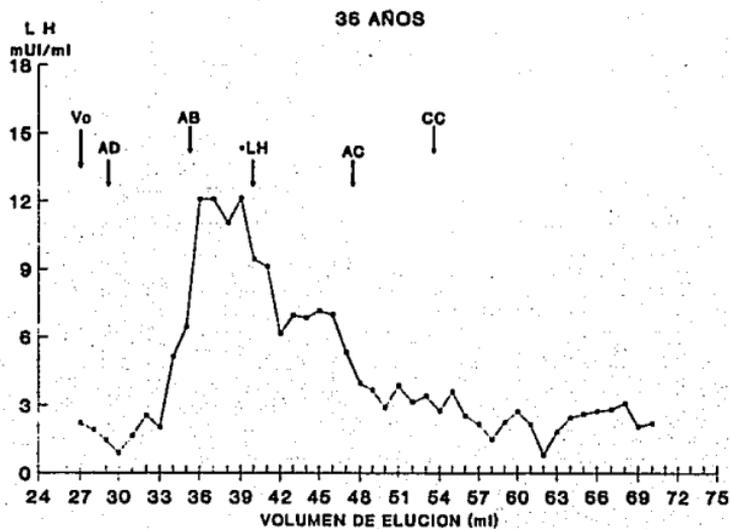


Fig. 23

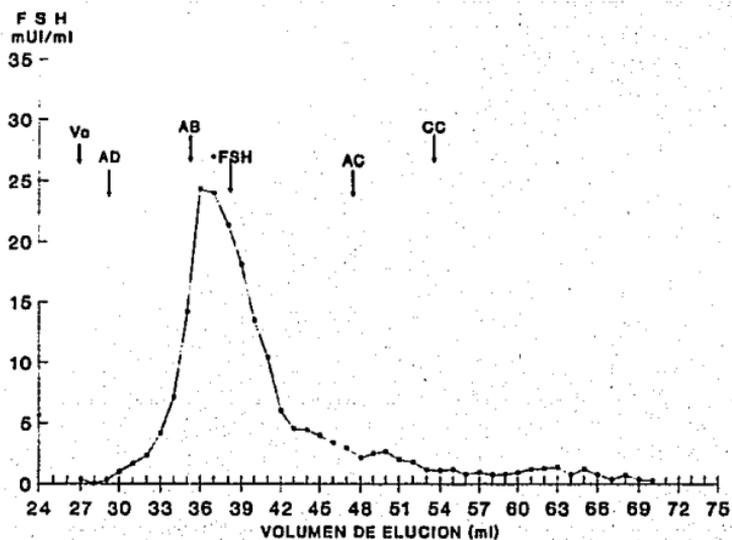


Fig. 24

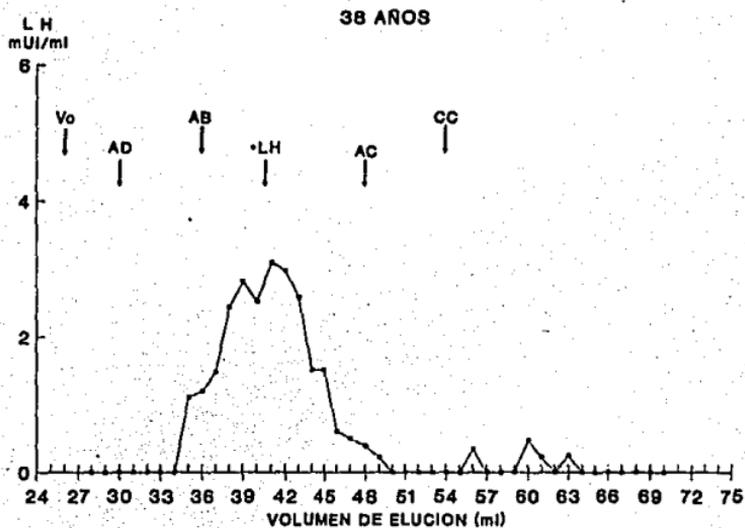


Fig. 25

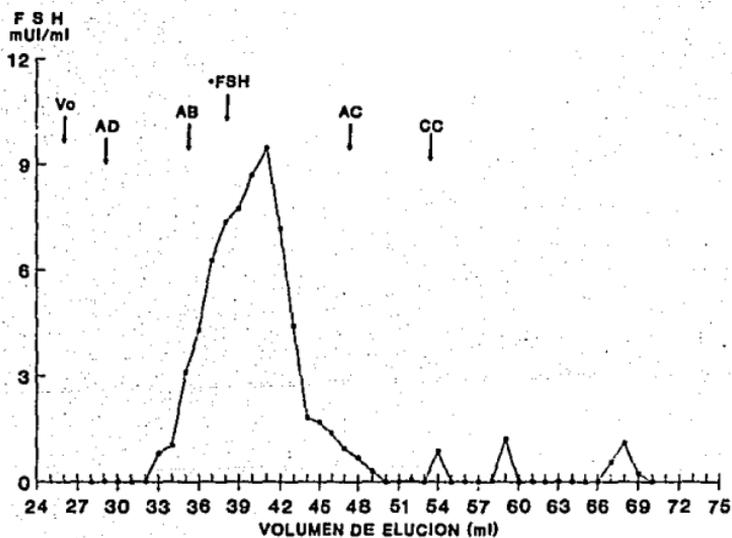


Fig. 28

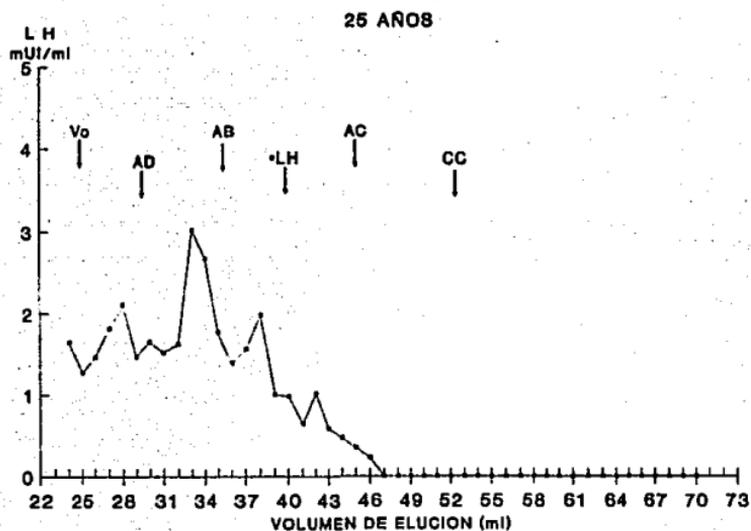


Fig. 27

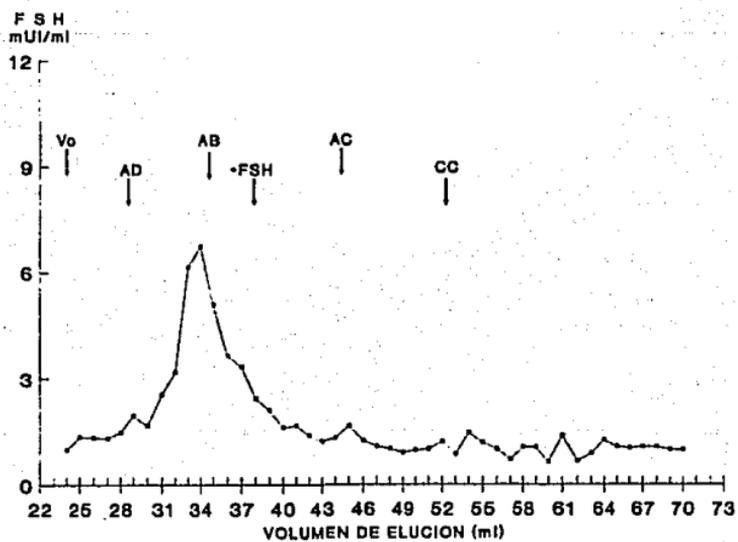


Fig. 28

## II) ESTERILIDAD PRIMARIA.

En dos casos de hipogonadismo y esterilidad primaria (figs. 29-32) los perfiles cromatográficos de LH y FSH fueron diferentes a los de los hombres con hipogonadismo hipogonadotrópico. En el caso de LH (figs. 29 y 31) puede observarse las moléculas grandes de (100-66 Kd) aunque su proporción está disminuida. Como en los casos de hipogonadotropismo, también predomina la actividad hormonal en la parte central de los cromatogramas en las moléculas de 60 y 45 Kd eluidas con la AB y el estándar hormonal (\*LH) respectivamente. Las subunidades libres y los fragmentos de degradación, no se observan en ninguno de los dos pacientes. En el caso de la FSH la forma molecular grande de 100-66 Kd se encontró disminuida considerablemente en uno de los casos (fig. 30) predominando la forma que eluye con el estándar (\*FSH), encontrándose ausente la forma molecular de 45 Kd y en muy baja proporción la de 32-30 (AC), las subunidades libres (17-15) y los fragmentos (< 15 Kd). En contraste el segundo paciente con esterilidad (fig. 32) presentó elevada proporción de formas grandes de FSH (100-66 Kd) aunque predominó la molécula que eluye con el estándar (\*FSH) después de la AB.

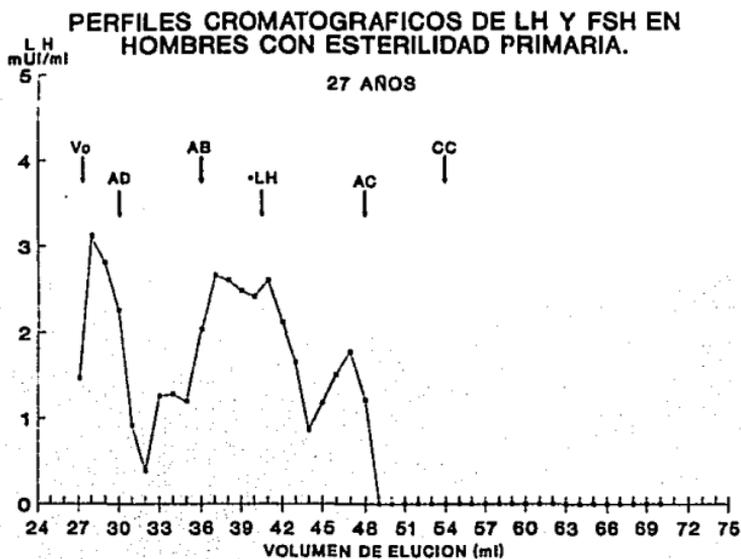


Fig. 29

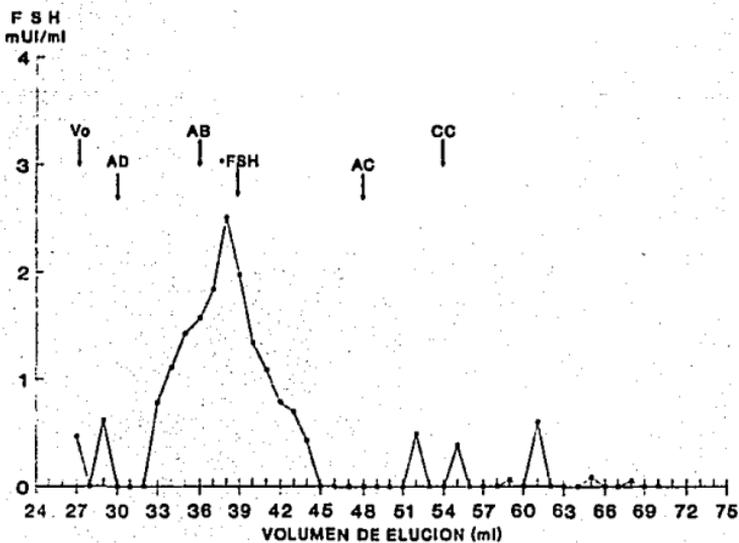
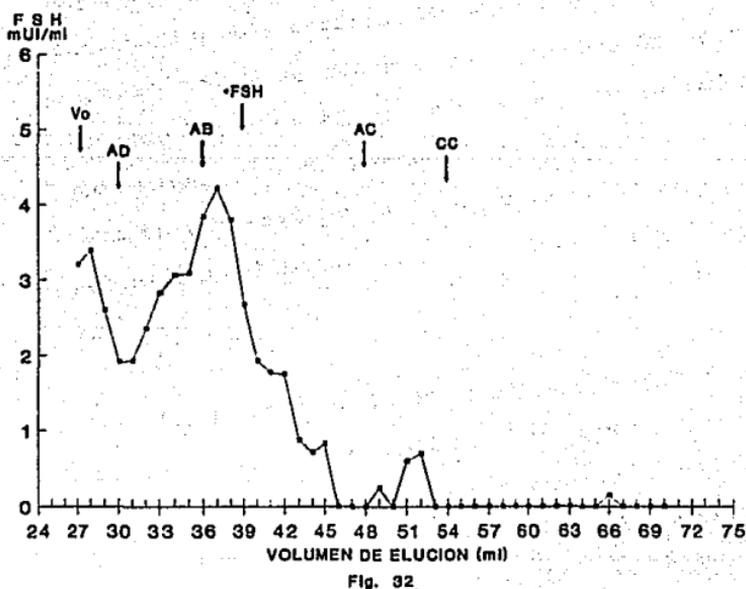
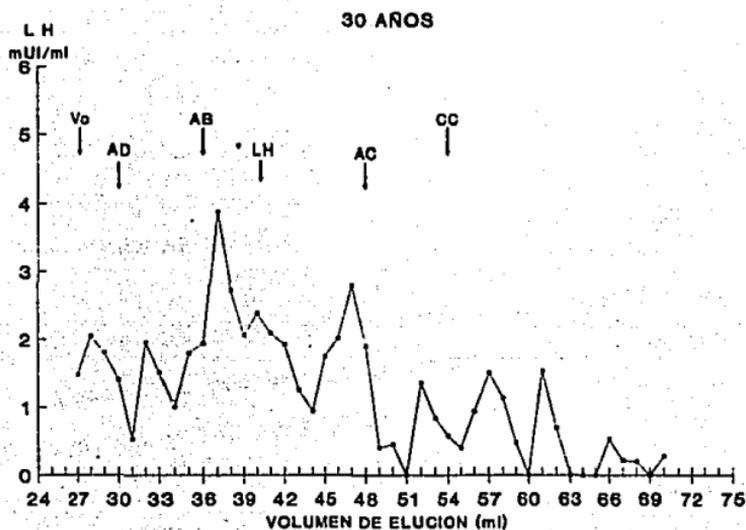


Fig. 30



### III) HERMAFRODITISMO VERDADERO.

El resultado del estudio cromatográfico de un paciente hipogonadal con hermafroditismo verdadero se presenta en las figs. 33 y 34, la primera corresponde a LH y la segunda a la FSH.

Llama la atención la presencia de perfiles hormonales muy homogéneos que no tienen la heterogeneidad que caracteriza los perfiles de LH y FSH en el hombre normal. En el caso de LH se observa baja proporción de formas grandes eluidas antes de AB con predominio de la molécula de 45 Kd que eluye con el estándar de la hormona (\*LH) así como también una baja proporción de la molécula de 34 Kd y de las subunidades libres; y no se observan los fragmentos < de 15 Kd.

En el caso de la FSH (fig 34) ocurre algo similar, solo se observan las moléculas que eluyen con la AB y con el estándar hormonal las isoformas de 32-30 Kd eluidas poco antes de AC, las subunidades así como los fragmentos libres se encuentran en muy baja proporción, prácticamente ausentes.

PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LH Y FSH EN UN HOMBRE  
CON HERMAFRODITISMO VERDADERO.

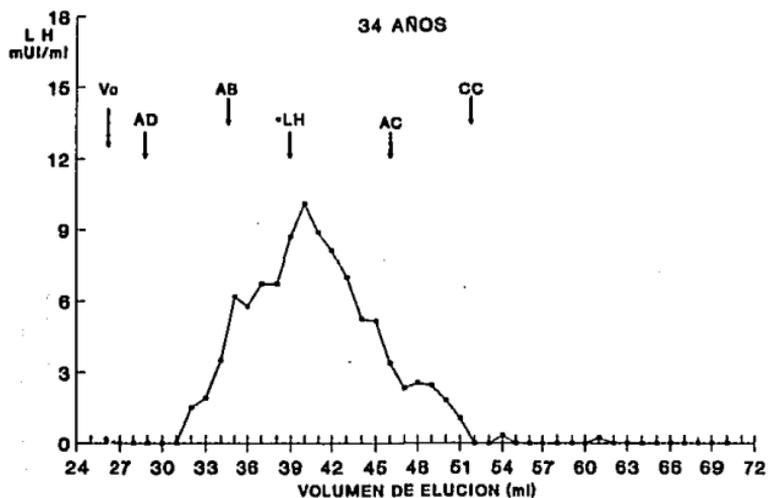


Fig. 33

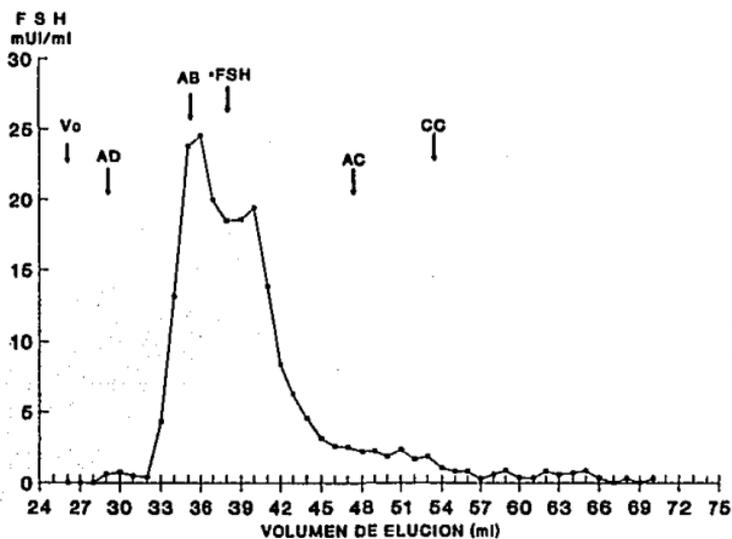


Fig. 34

#### IV) CANCER TESTICULAR.

Al igual que en el caso de hermafroditismo los perfiles de FSH y LH en un paciente con cáncer testicular (figs. 35 y 36) se caracterizaron por la pérdida de la heterogeneidad molecular. Se obtuvo un perfil cromatográfico de LH en el que predomina la moléculas de 45 Kd eluida entre AB y el estándar de la hormona, con una considerable disminución de la proporción de formas grandes y una falta total de inmunorreactividad en la isoforma de 34 Kd, así como ende la región de las subunidades (CC). El perfil de FSH también fué muy homogéneo destacando el pico de la forma molecular de 60 Kd y la ausencia total de formas grandes, la molécula de 45 Kd y las isoformas de menor peso molecular.

PERFILES CROMATOGRAFICOS DE LH Y FSH EN UN HOMBRE CON CANCER TESTICULAR.

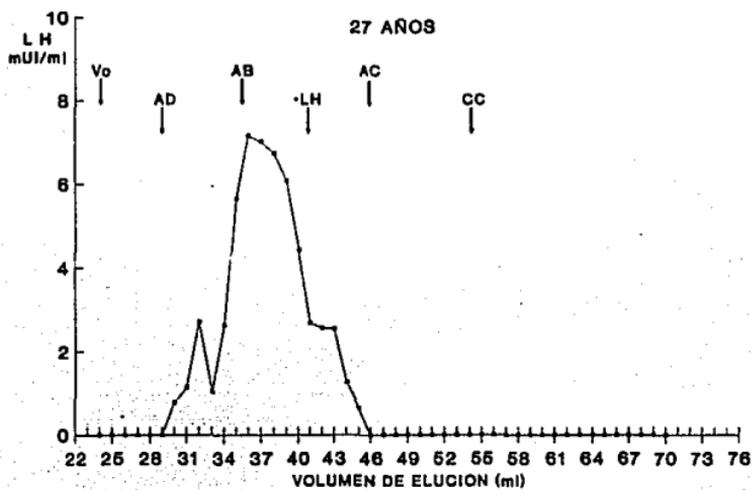


Fig. 35

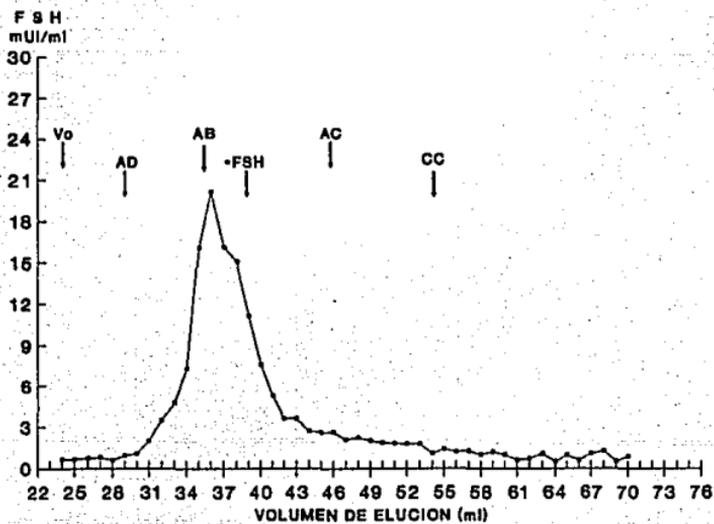


Fig. 36

**INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LH EN  
PACIENTES NORMALES Y CON HIPOGONADISMO.**

En la tabla 8 se representa el porcentaje de inmunorreactividad de las diferentes isoformas de LH en los hombres normales (n=10) agrupados en función de su edad, mientras que en la tabla 9 se muestran los porcentajes correspondientes a los pacientes con hipogonadismo, clasificados también en función de la edad y su diagnóstico clínico. Como se puede apreciar en la fig 37 y 38, en los hombres normales las moléculas de 100-66, 60 y 45 Kd tienden a disminuir conforme se incrementa la edad, no así la isoforma de 34 Kd que se incrementa notablemente después de los 50 años de tal manera que es una de las isohormonas que predomina en los hombres grandes (mayores de 60 años). Las subunidades libres (21-15 Kd) y los fragmentos < 15 Kd también tienden a disminuir.

En los casos de hipogonadismo (Tabla 9) las formas grandes (100-66 Kd) disminuyen considerablemente en relación a su proporción en los hombres normales, incrementándose el porcentaje de las moléculas de 60 y 45 Kd, sobre todo esta última que en los casos hermafroditismo y cáncer testicular en los que fué la molécula cuantitativamente más importante.

La comparación de la inmunorreactividad de las moléculas de LH en los hombres con hipogonadismo en relación a los porcentajes normales se muestra en las figuras 39 a 43 destacando en ellas la notable disminución de la molécula de 100-66 Kd y la marcada elevación de las isoformas de 60 y 45 Kd. En los casos de esterilidad primaria y de hermafroditismo no pudo detectarse la molécula de 34 Kd y se encontró elevada la proporción de las subunidades libres. En el caso de cáncer testicular solo se encontraron las formas grandes (100-66 Kd) y la isoforma de 45 Kd que es la variedad predominante.

## INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES (%)

GRUPO NORMAL	EDAD (AÑOS)	100-66 Kd	60 Kd	45 Kd (*LH)	34 Kd	21-15 Kd	< 15 Kd
n = 2	20 - 30	40.86	0	44.8	6.5	6.75	1.09
n = 2	31 - 40	49.58	10.87	26.21	0	0	13.33
n = 2	41 - 50	50.58	4.65	33.07	8.39	1.74	1.56
n = 2	51 - 60	20.01	5.73	12.57	51.9	4.07	5.7
n = 2	61 - 70	43.01	8.55	28.39	40.01	0	0

Tabla 8

COMPORTAMIENTO DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES EN FUNCION DE LA EDAD.

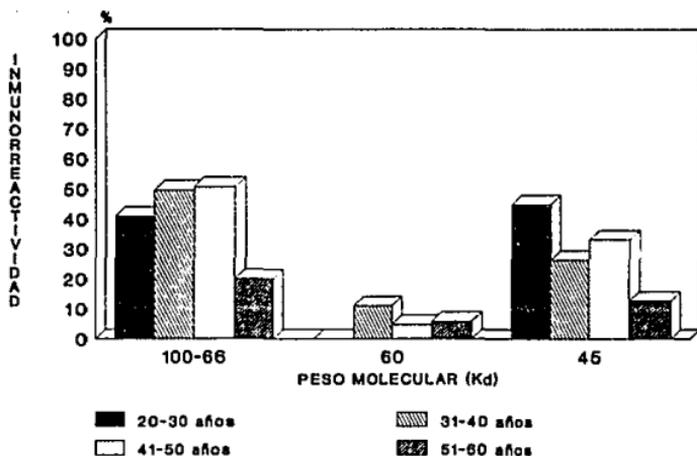


Fig. 37

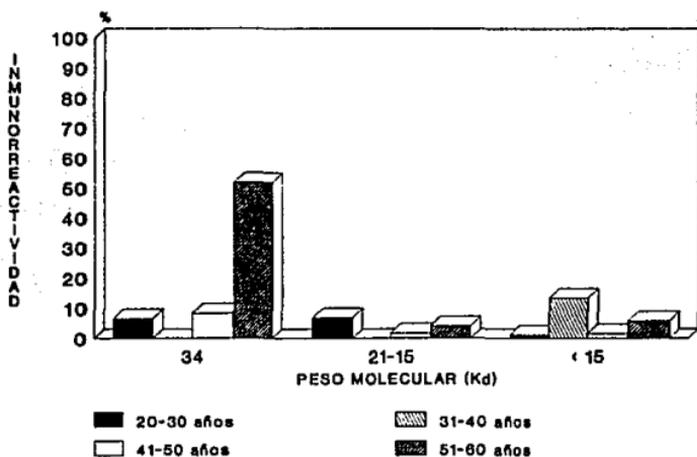


Fig. 38

## INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO (%)

GRUPO	EDAD (AÑOS)	100-66 Kd	60 Kd	45 Kd (*LH)	34 Kd	21-15 Kd	< 15 Kd
Hip.	20 - 30	18.20	40.47	23.64	5.14	12.27	0.25
Hiperg.	31 - 40	2.79	9.9	61.89	8.9	3.47	13.04
Est. Primaria	20 - 30	27.12	24.53	20.25	0	20.56	7.53
Herm. verd.	34	0.14	13.14	75.95	0	10.21	0.56
Ca. Test.	27	8.36	0	91.64	0	0	0

Tabla 9

FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES EN  
COMPARACION CON HOMBRES CON HIPOGONADISMO  
HIPERGONADOTROPICO

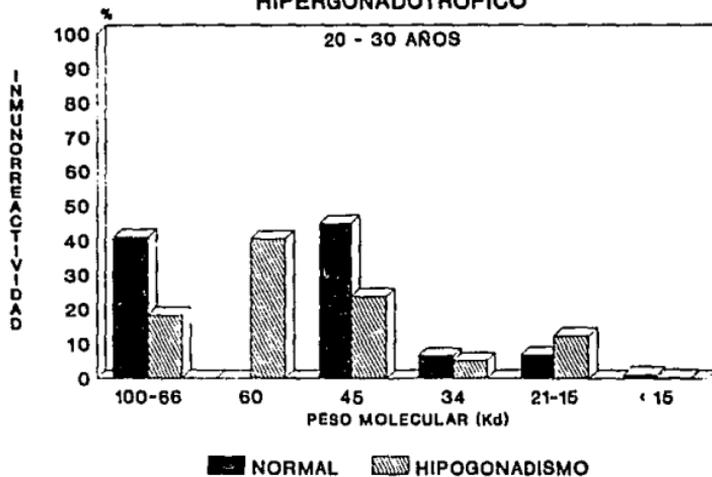


Fig. 39

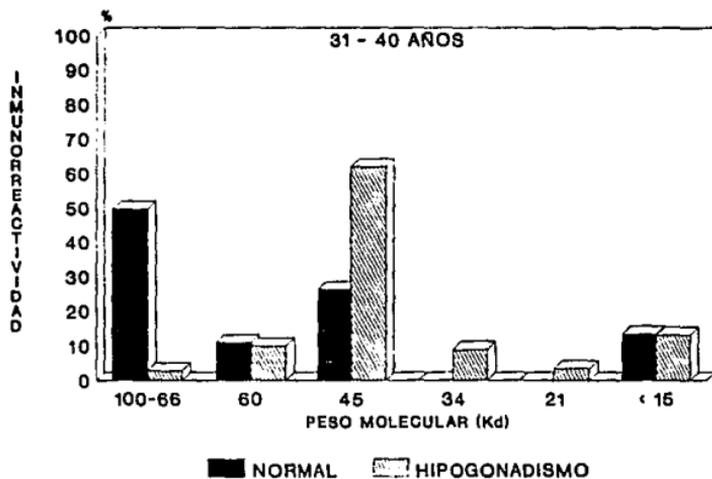


Fig. 40

**FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON HOMBRES CON ESTERILIDAD PRIMARIA**

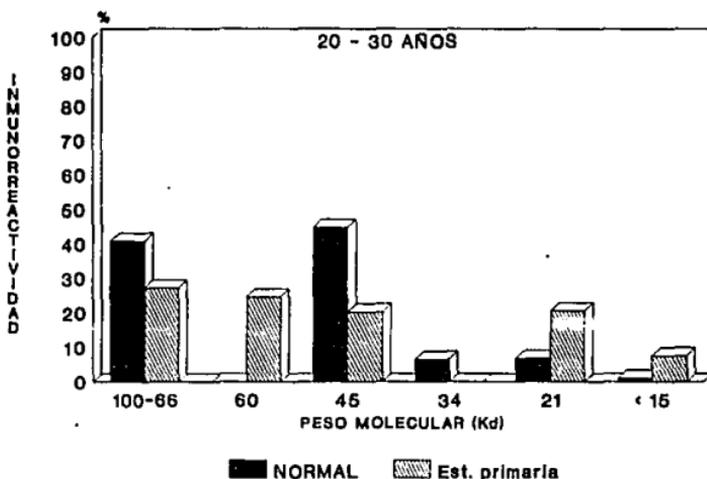


Fig. 41

**FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON EL DE UN HOMBRE CON HERMAFRODITISMO VERDADERO**

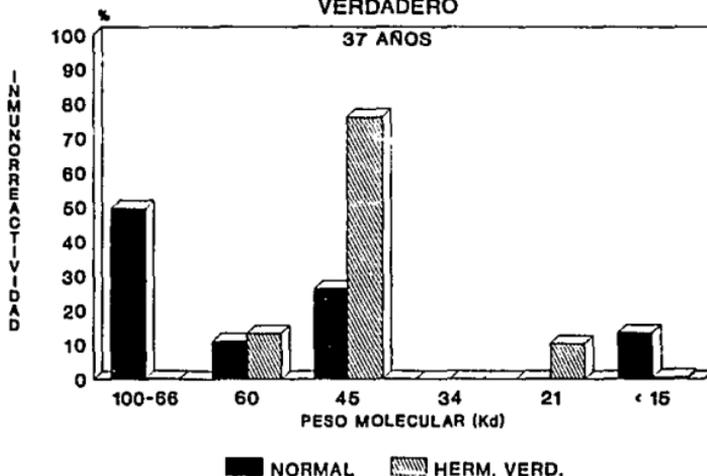


Fig. 42

# FORMAS MOLECULARES DE LH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON UN HOMBRE CON Ca. TESTICULAR

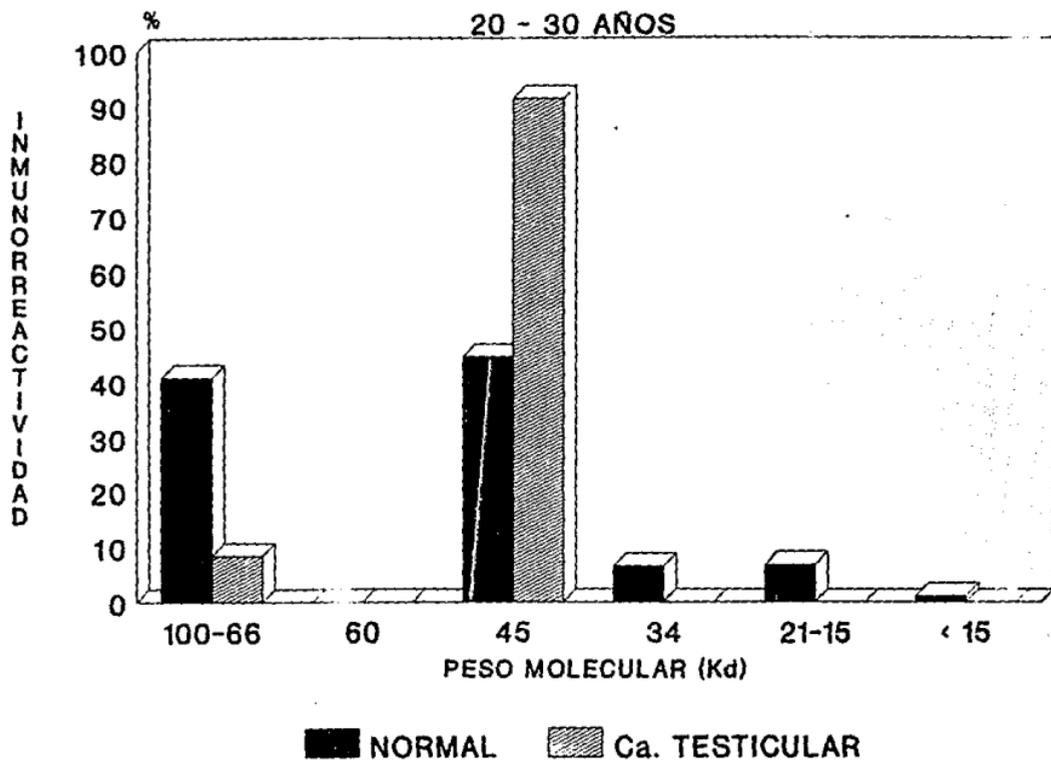


Fig. 43

**INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH**

Los porcentajes de inmunorreactividad de FSH en los hombres normales se presentan en la tabla 10 agrupados en función de la edad. Puede verse que las moléculas grandes de FSH (100-66 Kd) tienen un comportamiento similar al de las formas grandes de LH, es decir disminuyen considerablemente con la edad, mientras que las variantes de 60 y 45 Kd tienden a incrementarse al igual que la de 30-32 Kd que fué la que presentó una proporción más baja.

Las subunidades libres (17-15 Kd) y fragmentos (< 15 Kd) se encontraron en una proporción importante (7 - 15 %) y no sufrieron modificaciones en función de la edad. La representación gráfica de estos resultados se encuentra en las figuras 44 y 45.

En los hombres con hipogonadismo (tabla 11), la isoforma de 100-66 Kd por lo general se encuentra aumentada contrario a lo que ocurre a la molécula de LH (con excepción del caso con cáncer testicular) alcanzando valores muy elevados en los pacientes con esterilidad primaria. La molécula de 60 Kd se encontró prácticamente ausente en todos los casos, con excepción del paciente con cáncer testicular, en el cual esta isoforma fué la variedad predominante. La molécula de 45 Kd se observa aumentada en los casos de hipogonadismo hipergonadotrópico y en el hermafroditismo.

verdadero y no pudo detectarse en la esterilidad primaria y en el caso con cáncer de testículo. Las formas moleculares de 32-30 Kd, 17-15 Kd y los fragmentos (<15 Kd) están disminuídos en relación con los porcentajes encontrados en los hombres normales.

Las diferencias mencionadas en la inmunorreactividad de las moléculas de FSH entre el grupo normal y los pacientes con hipogonadismo pueden verse claramente en las gráficas 46 a 50.

## INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES (%)

GRUPO NORMAL	EDAD (AÑOS)	100-66 Kd	60 Kd (+FSH)	45 Kd	32-30 Kd	17-15 Kd	< 15 Kd
n = 2	20 - 30	36.95	0	32.66	5.04	12.94	12.41
n = 2	31 - 40	38.19	24.88	17.52	5.99	7.87	9.47
n = 2	41 - 50	21.59	15.61	26.98	7.75	12.39	15.67
n = 2	51 - 60	8.16	21.7	43.03	4.40	8.36	14.35
n = 2	61 - 70	9.14	37.85	17.45	9.37	11.9	16.53

Tabla 10

COMPORTAMIENTO DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES EN FUNCION DE LA EDAD

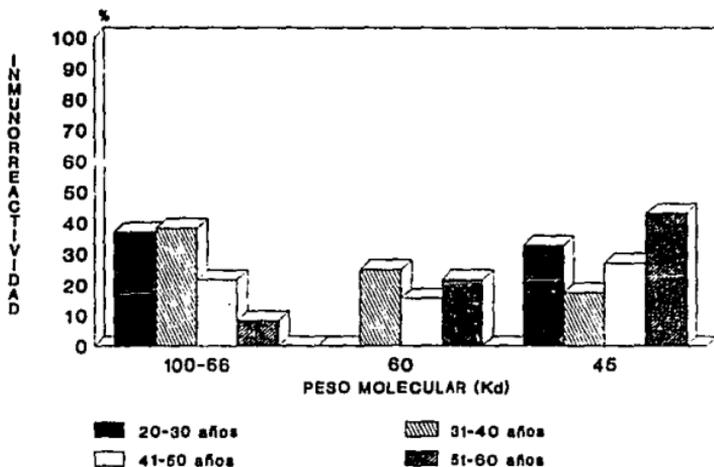


Fig. 44

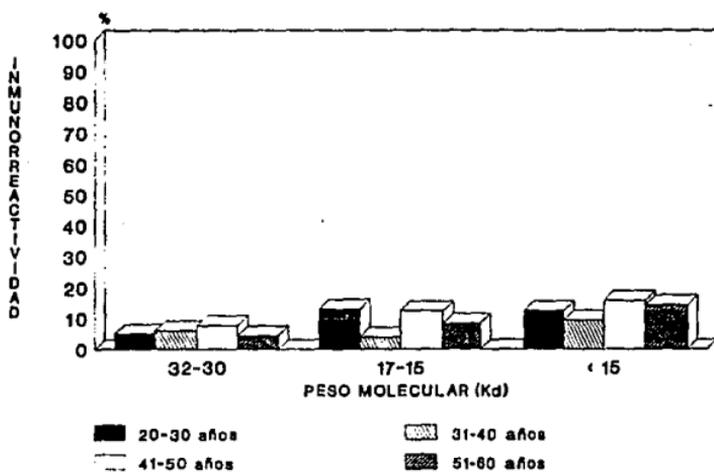


Fig. 45

## INMUNORREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO (%)

GRUPO	EDAD (AÑOS)	100-66 Kd	60 Kd (+FSH)	45 Kd	32-30 Kd	17-15 Kd	< 15 Kd
Hip.	20 - 30	64.35	0	2.92	8.24	5.83	18.65
Hiperg.	31 - 40	43.06	0	47.18	0	4.36	5.39
Est. Primaria	20 - 30	92.32	0	0	1.82	3.61	2.24
Herm. verd.	34	51.98	0	39.95	0	4.96	3.11
Ca. Test.	27	1.83	76.09	0	3.27	8.52	10.29

Tabla 11

**FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON HOMBRES CON HIPOGONADISMO HIPERGONADOTROPICO**

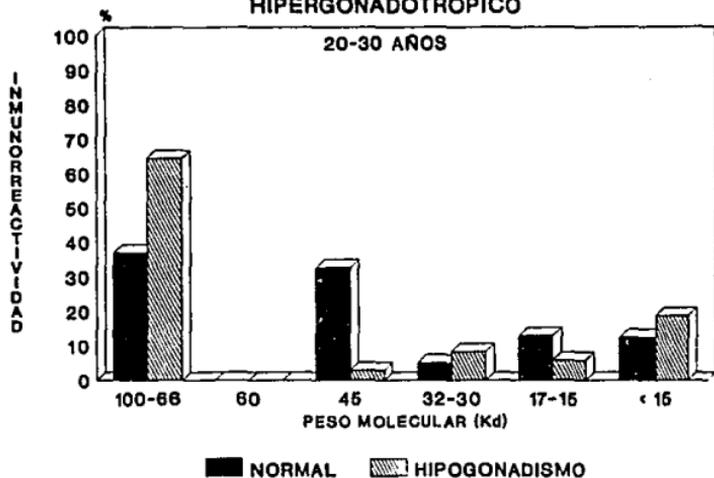


Fig. 46

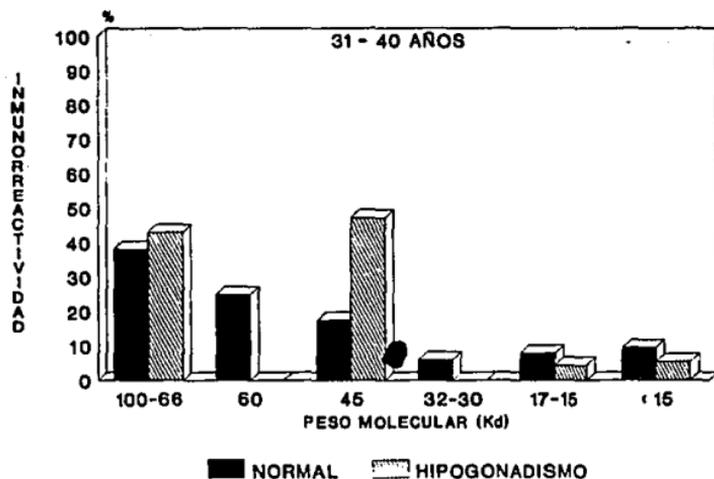


Fig. 47

**FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON EL DE HOMBRES CON ESTERILIDAD PRIMARIA**

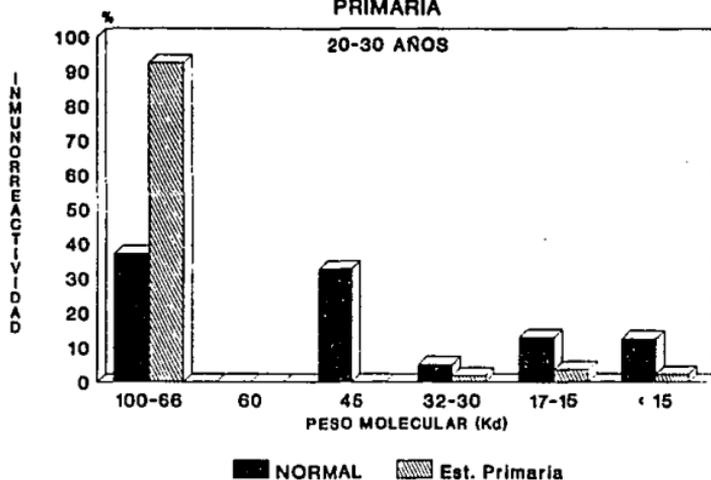


Fig. 48

**FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES EN COMPARACION CON EL DE UN HOMBRE CON HERMAFRODITISMO VERDADERO**

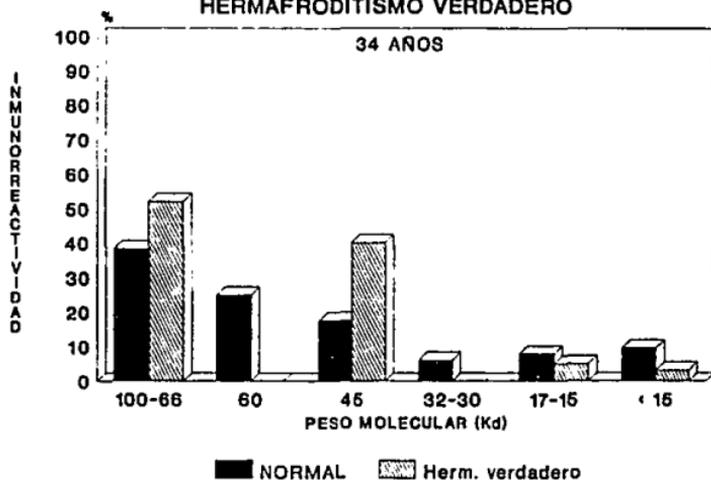


Fig. 49

FORMAS MOLECULARES DE FSH EN HOMBRES NORMALES EN  
 COMPARACION CON EL DE UN HOMBRE CON  
 Ca. TESTICULAR

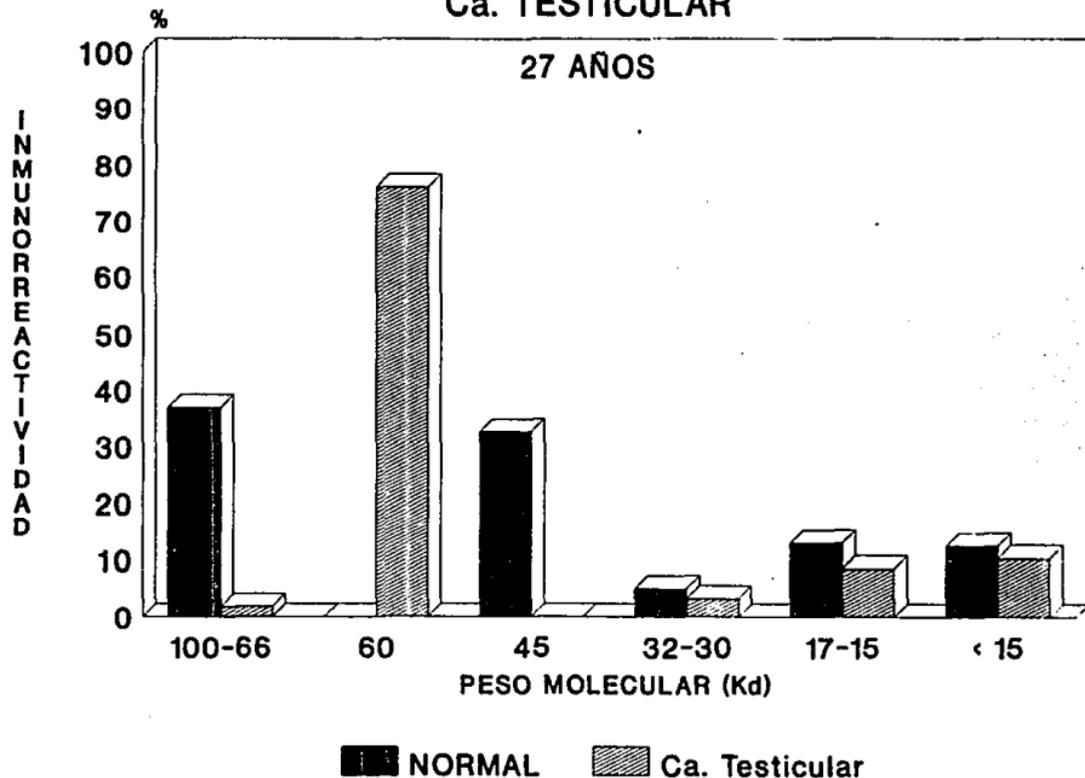


Fig. 50

**CORRELACION DELASFORMAS MOLECULARES DE LH CON LA  
CONCENTRACION DE ESTEROIDES GONADALES.**

Tratando de averiguar si los esteroides gonadales (T y E2) influyen de alguna manera, en la proporción de las formas moleculares de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH) se hizo un estudio de correlación entre la proporción de las isoformas presentes en el cromatograma y la concentración de testosterona y estradiol en el suero de los pacientes.

Los resultados muestran (Figs. 51 - 54) que las moléculas grandes de LH (100-66 y 60 Kd) tienen una relación lineal positiva con la concentración de T, mientras que esta relación fué inversa a la concentración de E2, es decir su proporción es mayor a mayor concentración de T, mientras que su proporción disminuye conforme aumenta el nivel de E2; esto mismo ocurrió con respecto a la relación E2/T (Figs. 55 y 56) que también tuvo un efecto negativo sobre la proporción de las formas grandes. La molécula de 45 Kd en cambio (Figs. 57 y 58) tuvo una correlación positiva con ambos esteroides con un coeficiente de correlación muy semejante, no así con la molécula de 34 Kd (Figs. 59 y 60) que presentó dimorfismo en su respuesta a los esteroides gonadales, con una relación lineal negativa muy marcada respecto a la concentración de testosterona, mientras que su relación fué lineal positiva con

E2 en ambos casos con coeficientes de correlación muy elevados. También presentó correlación lineal positiva con la relación E2/T (fig 61).

Como se puede ver en las figuras 62 las formas moleculares pequeñas (menores de 15 Kd) mostraron una relación lineal positiva con los niveles de T.

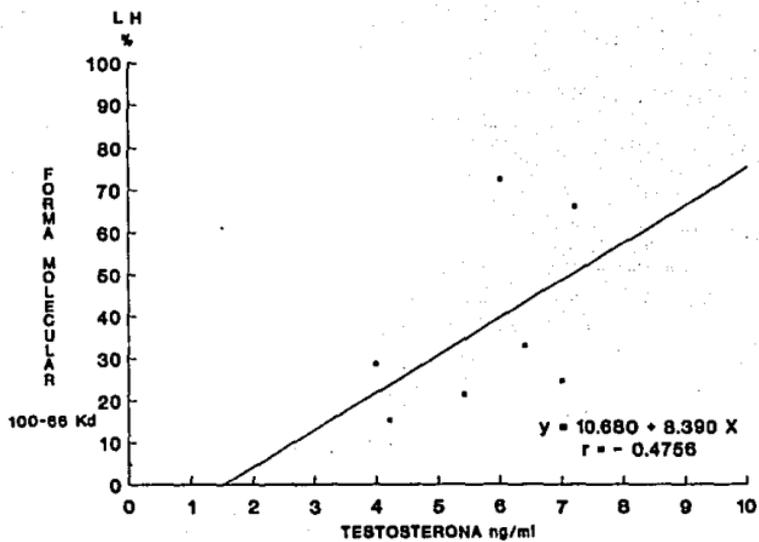


Fig. 51

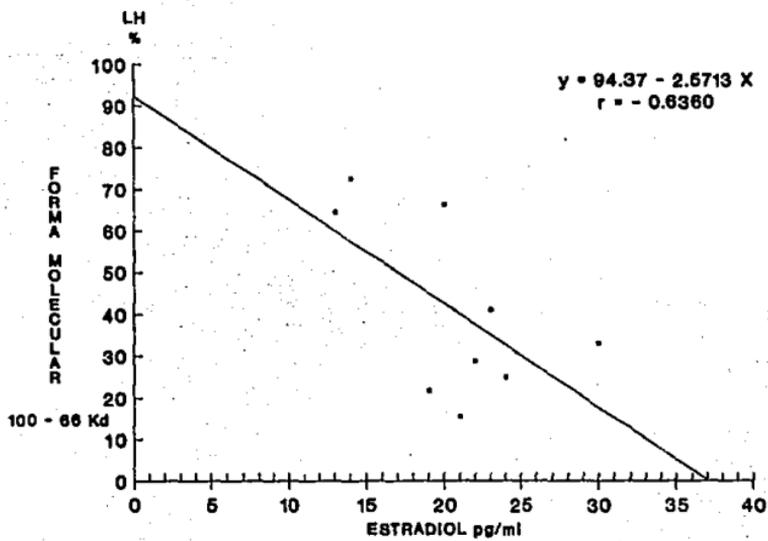
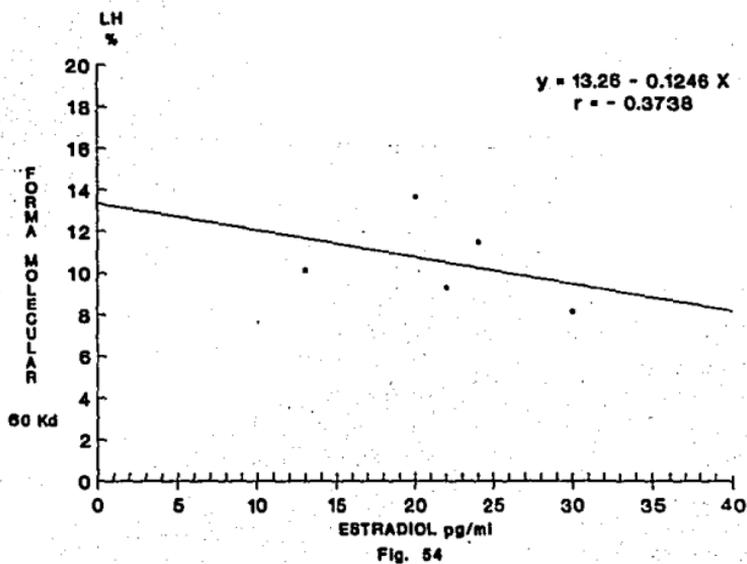
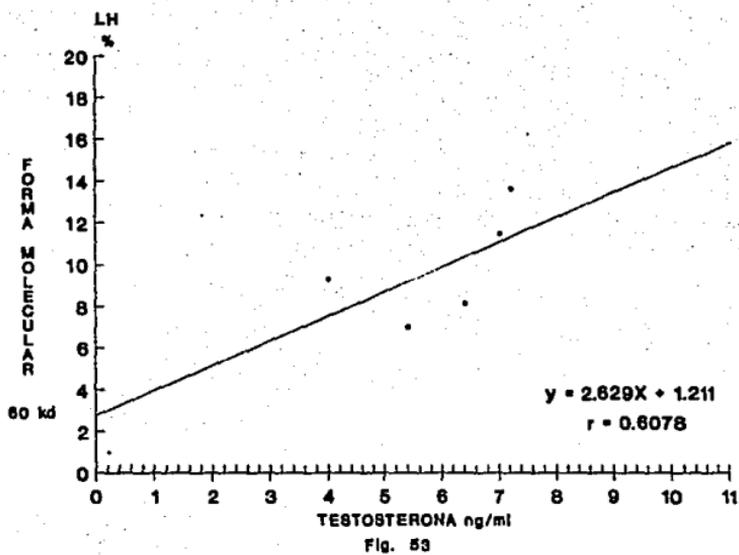


Fig. 52



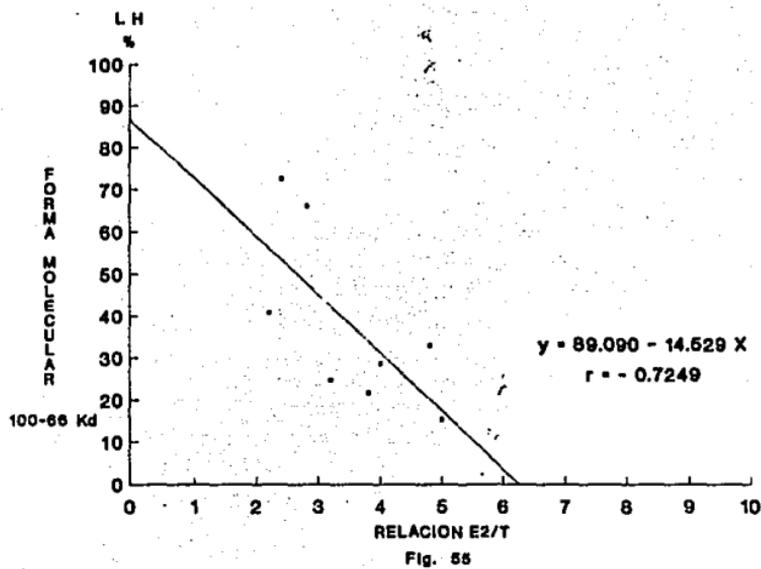


Fig. 55

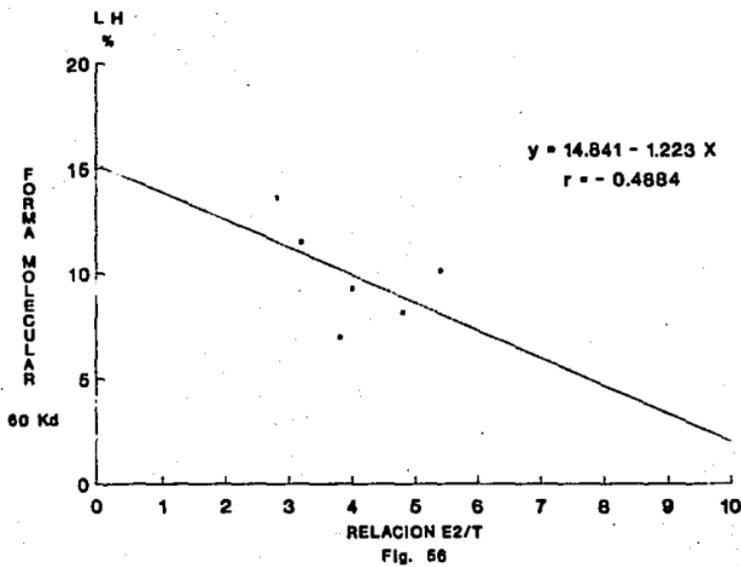


Fig. 56

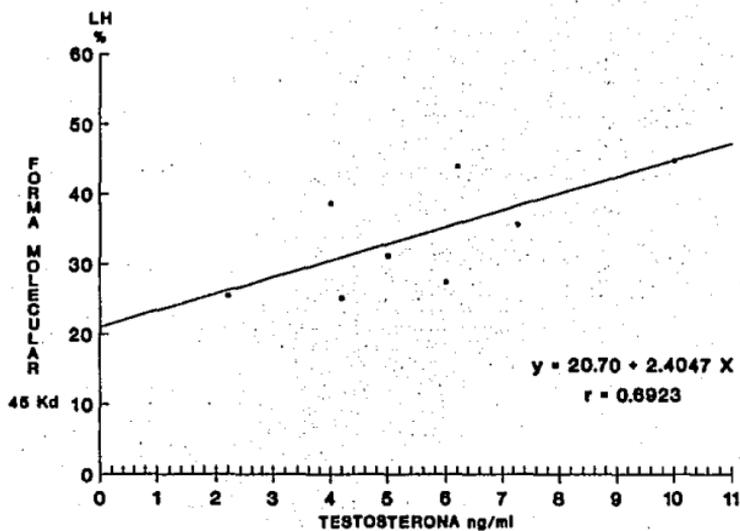


Fig. 57

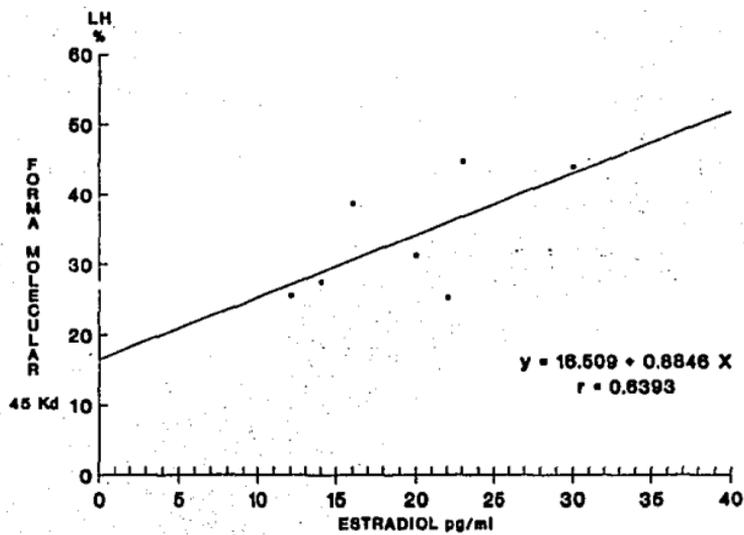


Fig. 58

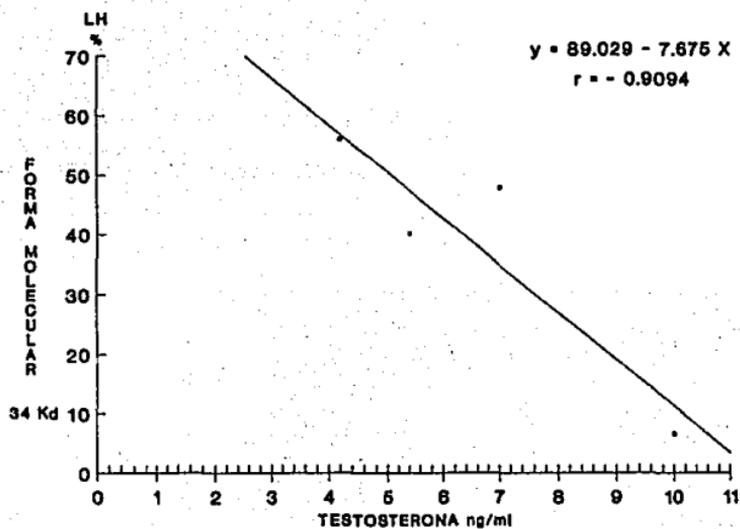


Fig. 59

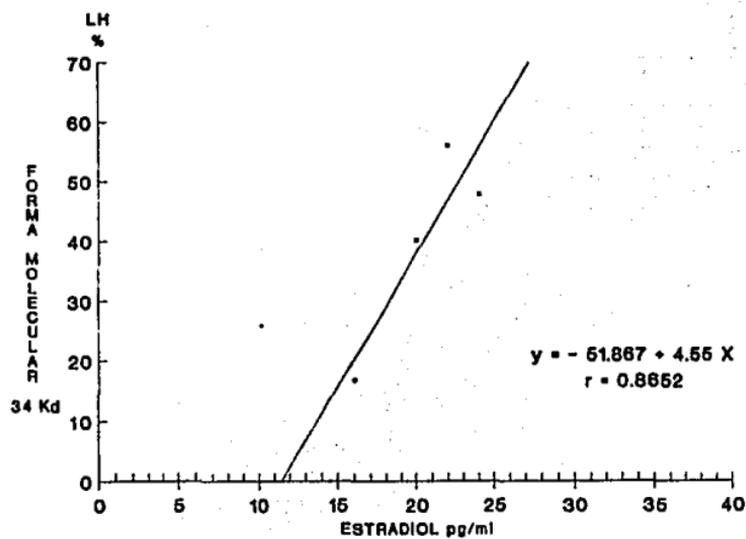


Fig. 60

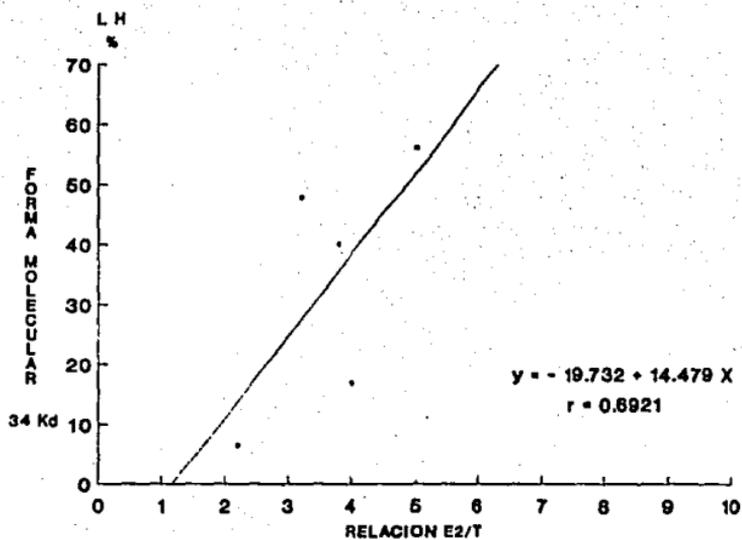


Fig. 61

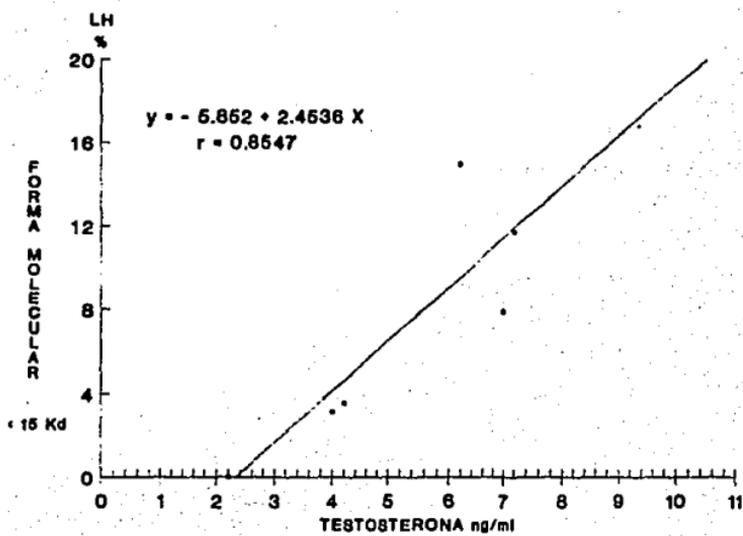


Fig. 62

**CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE FSH CON  
LA CONCENTRACION DE ESTEROIDES GONADALES.**

Las formas grandes de FSH (100-66 y 60 Kd) al igual que la isoforma de 45 Kd presentaron relación lineal positiva (figs. 63-68) con la concentración de ambos esteroides (testosterona y estradiol) con un coeficiente de correlación más elevado y mayor pendiente en el caso de E2, sin embargo la correlación fué negativa con la relación E2/T (Figs. 69 y 70). La molécula de 32-30 Kd en cambio mostró una relación inversa tanto con T como con E2 (Figs. 71 y 72) sobre todo con la testosterona ( $r=0.7$ ), de igual manera las formas pequeñas de 17-15 Kd y < 15 Kd se relacionaron negativamente con los esteroides gonadales, la primera (subunidades libres) solo con E2 (Figs. 73 y 74) y la última (fragmentos) solo con la testosterona (Figs. 75 y 76).

Estas dos formas pequeñas presentaron una respuesta opuesta a la relación E2/T negativa con las moléculas de 17-15 Kd y positiva con las isoformas menores de 15 Kd (Figs. 77 y 78).

El resumen de los coeficientes de correlación encontrados entre la proporción de formas moleculares de LH y FSH y la concentración de esteroides gonadales se presenta en la tabla 12.

CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE  
FSH CON LA CONCENTRACION DE ESTEROIDES

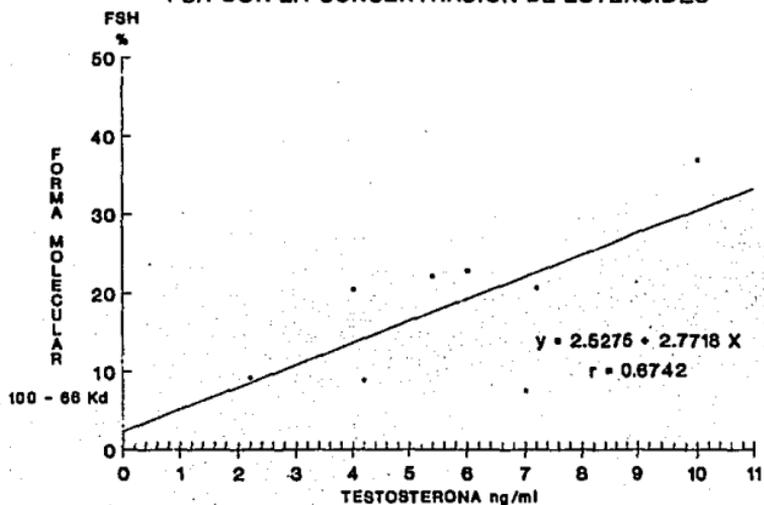


Fig. 63

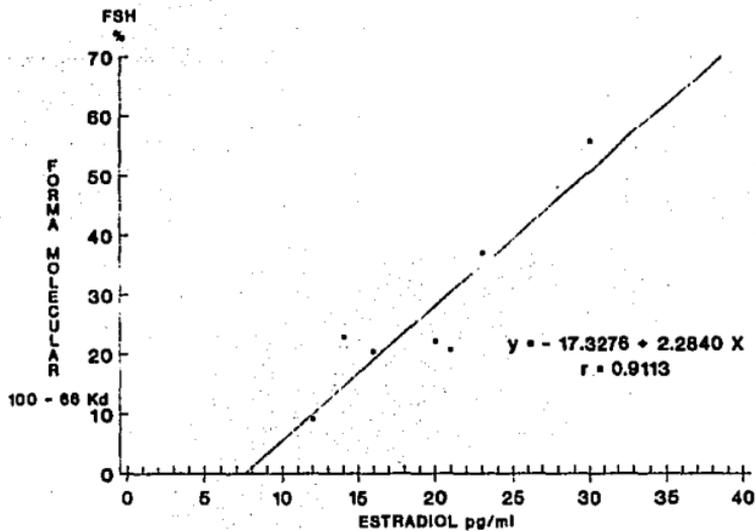


Fig. 64

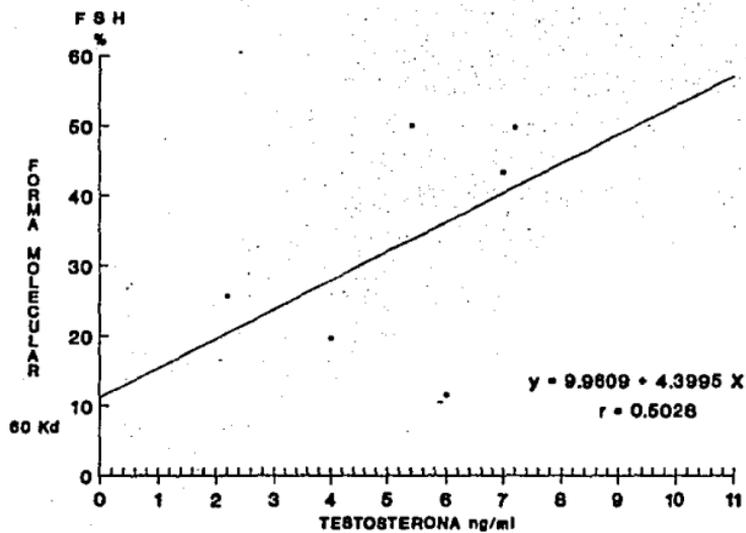


Fig. 65

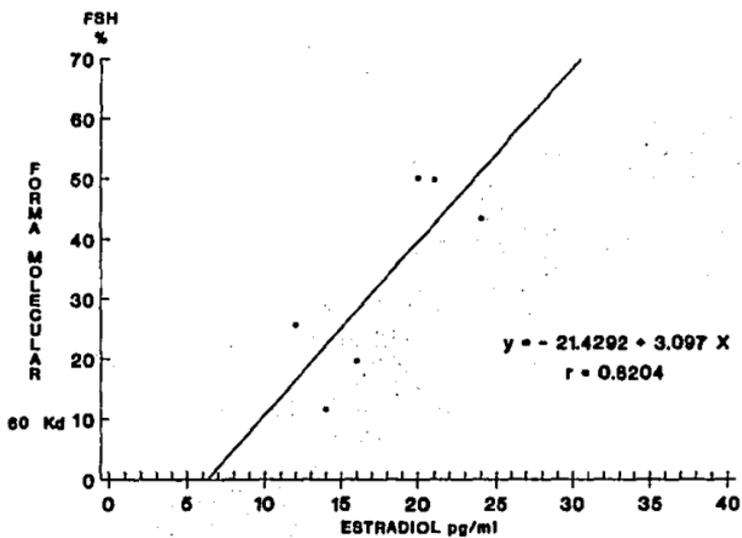


Fig. 66

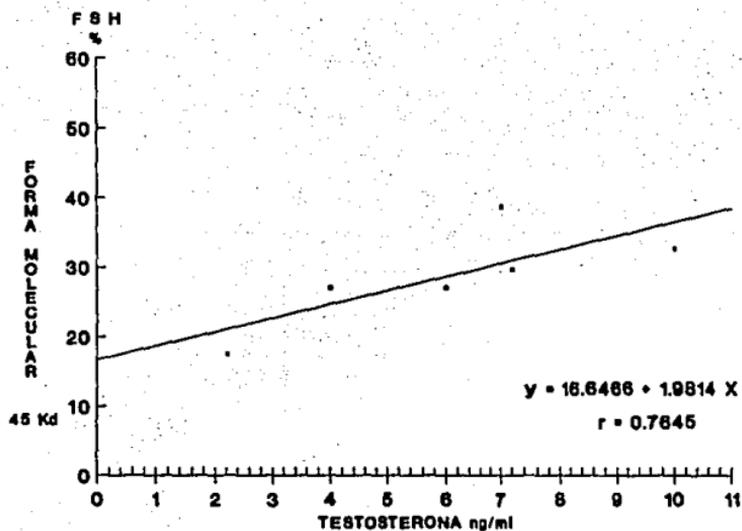


Fig. 67

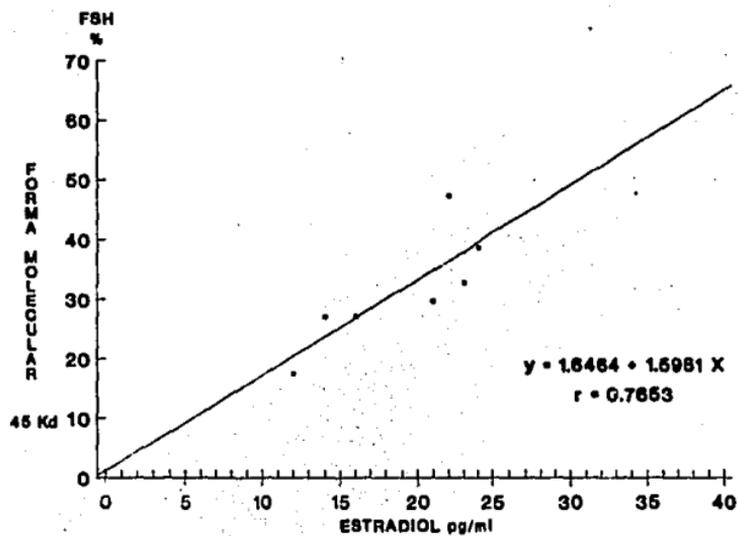
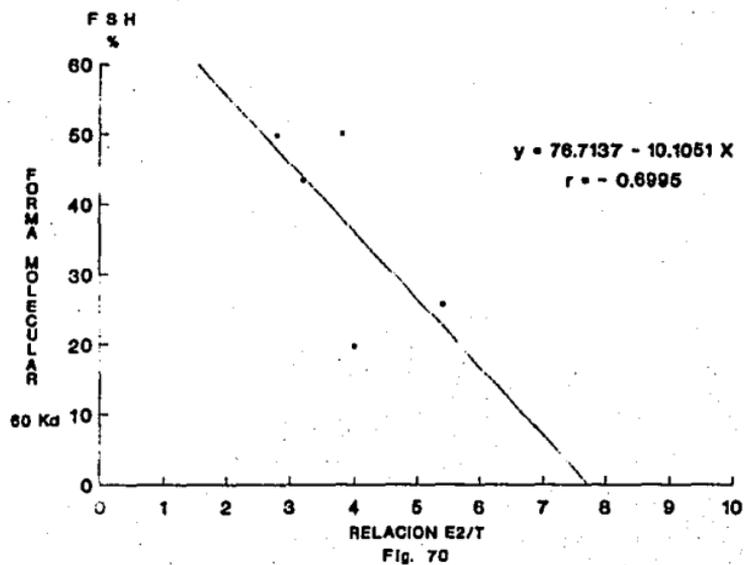
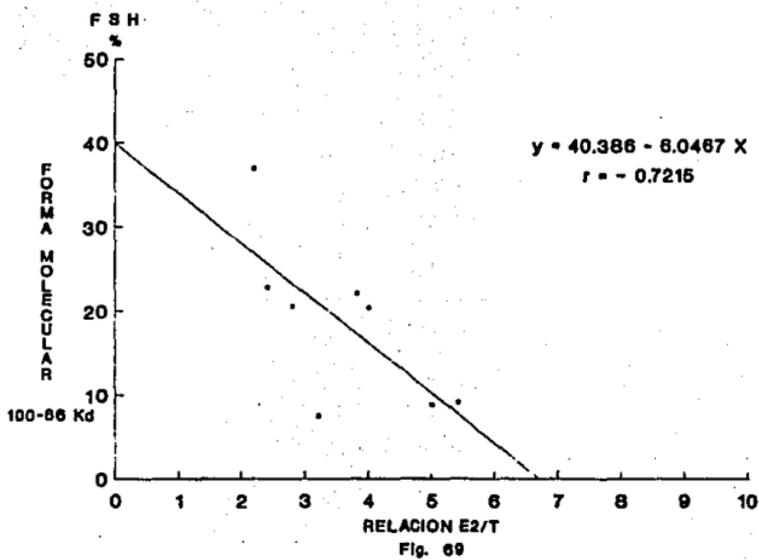


Fig. 68



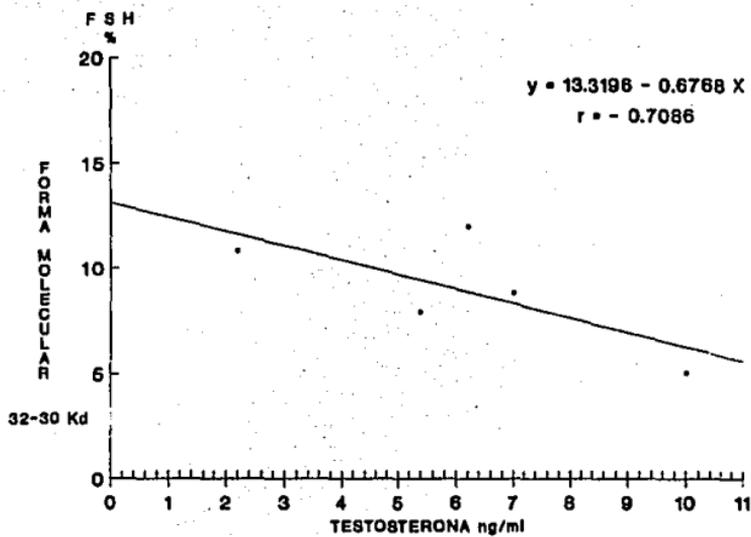


Fig. 71

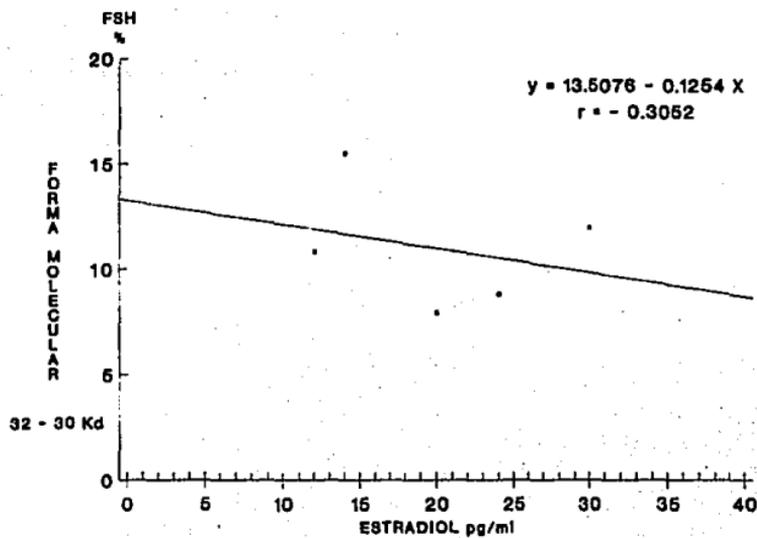
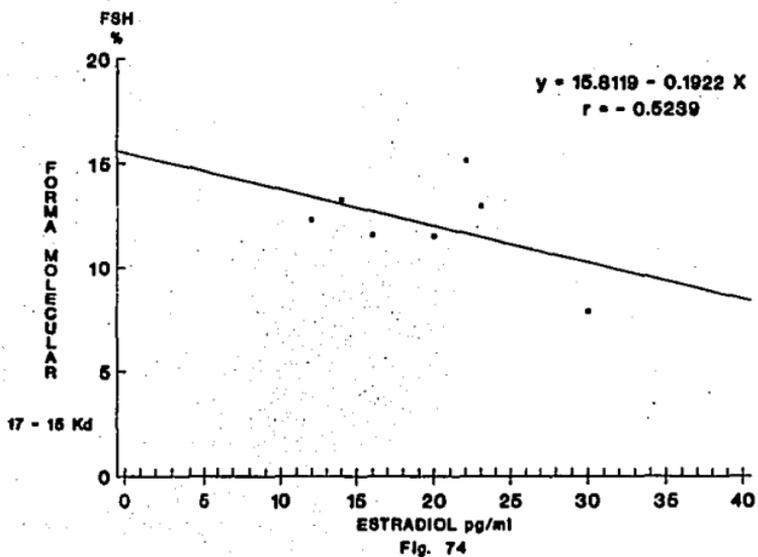
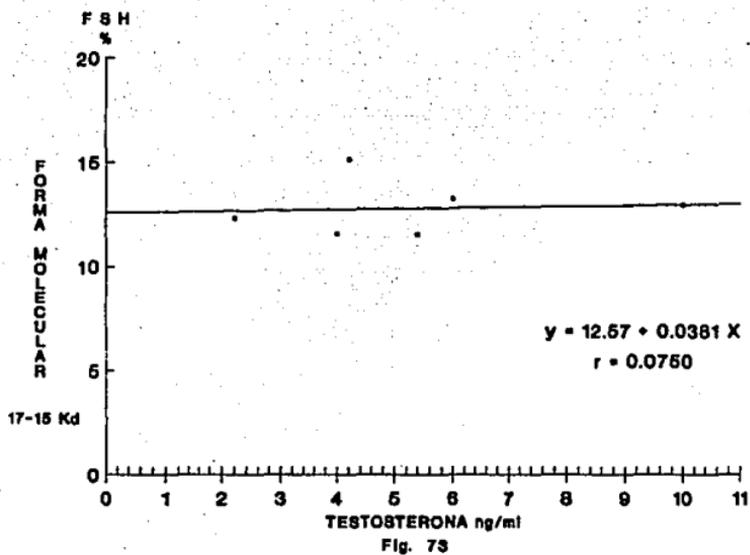
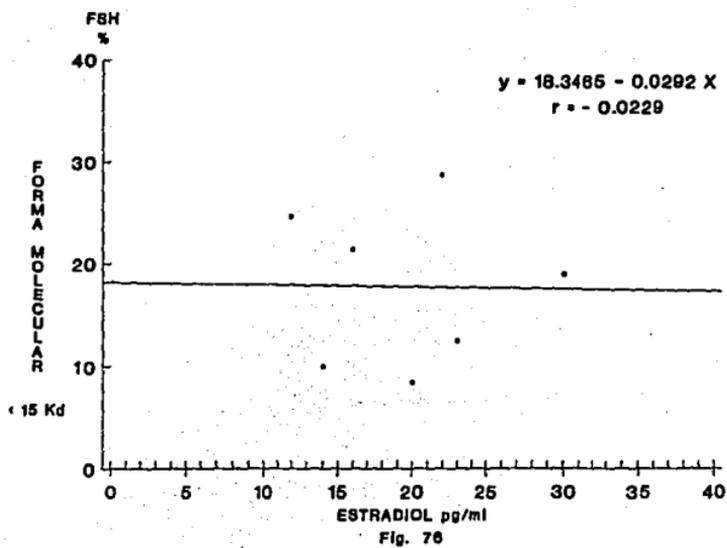
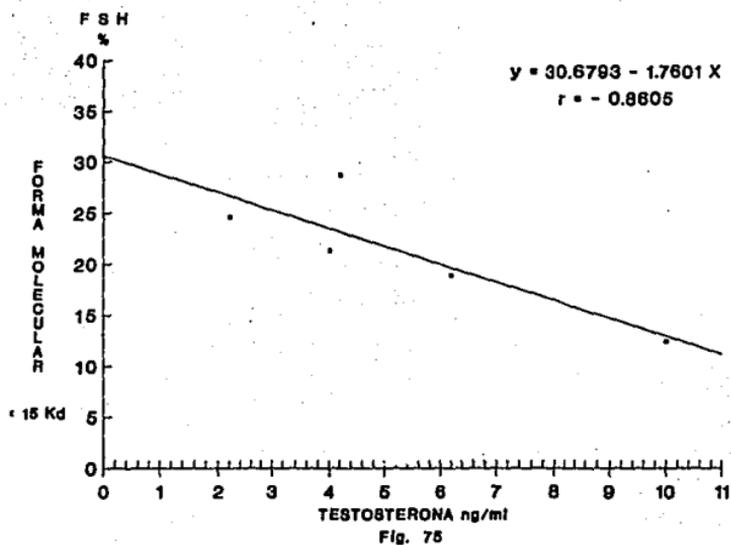
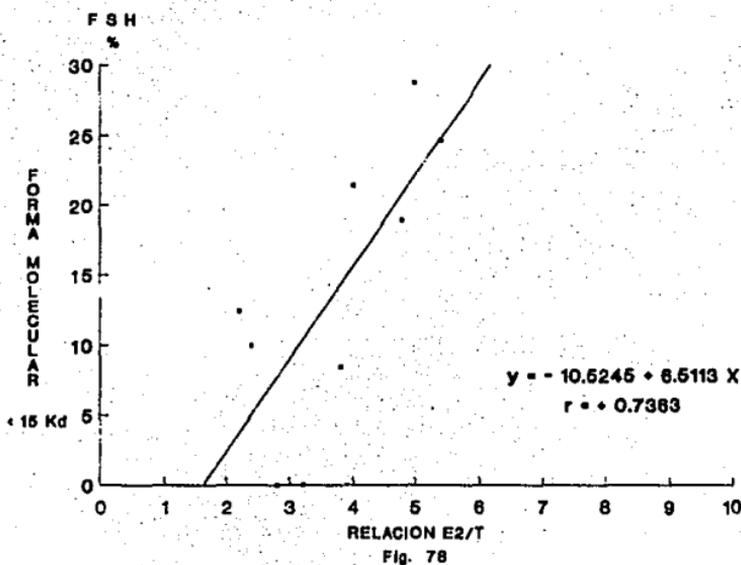
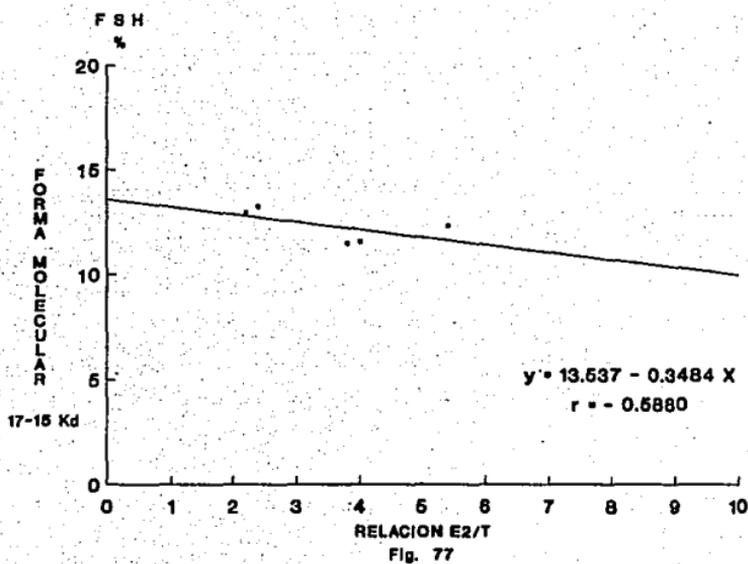


Fig. 72







**CORRELACION ENTRE LAS FORMAS MOLECULARES  
DE FSH Y LH (%) Y LA CONCENTRACION DE  
ESTEROIDES**

<b>F S H</b>	<b>ESTE- ROIDE</b>	<b>100-66 Kd</b>	<b>60 Kd</b>	<b>45 Kd</b>	<b>32-30 Kd</b>	<b>17-15 Kd</b>	<b>&lt; 15 Kd</b>
	<b>T</b>	<b>+ 0.674</b>	<b>+ 0.502</b>	<b>+ 0.764</b>	<b>- 0.708</b>	<b>-----</b>	<b>- 0.860</b>
	<b>E2</b>	<b>+ 0.913</b>	<b>+ 0.820</b>	<b>+ 0.765</b>	<b>- 0.305</b>	<b>- 0.523</b>	<b>-----</b>
<hr/>							
<b>L H</b>		<b>100-66 Kd</b>	<b>60 Kd</b>	<b>45 Kd</b>	<b>34 Kd</b>	<b>21-15</b>	<b>&lt; 15 Kd</b>
	<b>T</b>	<b>+ 0.47</b>	<b>+ 0.607</b>	<b>+ 0.692</b>	<b>- 0.909</b>	<b>+ 0.688</b>	<b>+ 0.854</b>
	<b>E2</b>			<b>+ 0.639</b>	<b>+ 0.865</b>	<b>+ 0.977</b>	<b>+ 0.886</b>

**HIPOG - GRUPO CON HIPOGONADISMO T - TESTOSTERONA E2 - ESTRADIOL**

Tabla 12

**PERFIL DE ELUCION DEL ACIDO SIALICO.**

En cada una de las fracciones separadas en la cromatografía de los sueros de los hombres normales y con hipogonadismo, se determinó la concentración de ácido siálico (ug/ml) por el método indicado anteriormente, con objeto de obtener su perfil de elución, el cual se relacionó posteriormente a los perfiles de elución de FSH y LH para saber si las moléculas estaban o no glicosiladas y conocer además su grado de glicosilación, para lo cual se calculó la actividad específica de ác. siálico en cada una de las formas moleculares (mg de ác. siálico/ mg de FSH ó LH).

Los resultados mostraron en el grupo normal, perfiles de elución de ácido siálico caracterizados por presentar mayor contenido de ácido siálico (ug/ml) en la región de las moléculas grandes de FSH y LH mientras que su contenido fue más bajo en la región donde eluyen los estándares de \*FSH (60 Kd) y \*LH (45 Kd) y sobre todo en la región de las moléculas más pequeñas (32-30 Kd, 17-15 y < 15 Kd). Las figuras 79 y 80 son ejemplos representativos de dichos perfiles. En el suero de los hombres con hipogonadismo, los perfiles obtenidos fueron diferentes, más heterogéneos y por lo general con menor contenido de ác. siálico que en los hombres normales (Figs. 81-83).

La diferencia de concentración de ác. siálico en los cromatogramas de los hombres normales y en aquellos con hipogonadismo, se presentan de manera comparativa y en hombres de igual edad en las figuras 84-86 en donde puede observarse que la concentración de ác. siálico fué menor en los hombres con hipogonadismo. Posteriormente conociendo la concentración de ác. siálico y la concentración de gonadotropinas (FSH y LH) en cada fracción cromatográfica, se calculó la actividad específica de ác. siálico para cada una de ellas, para así tener los perfiles de actividad específica (mg de Ac. Siálico/ mg de FSH o LH). Las figuras 87 y 88 representan el perfil de elución de ác. siálico obtenido al graficar la media de la actividad específica de ác. siálico de todo el grupo normal (X) para FSH (fig. 87) y para LH (fig. 88) contra el volúmen de elución. LLama la atención que para FSH solo se obtuvieron tres picos de glicosilación específica, uno en la región de las forma moléculas grande (100-66 Kd) otro más pequeño en la zona de 60 Kd y el último de actividad específica importante en la región de las subunidades. En cambio el perfil de la actividad del ácido siálico para LH muestra cinco picos de glicosilación específica en la región de la isohormona de 100-66 Kd, 60 Kd, 32-30 Kd y las dos últimas en la región de las moléculas pequeñas (17-15 Kd y < 15 Kd) con la mayor actividad específica en las subunidades (15 Kd). No obstante,

la actividad específica de ácido siálico en estas moléculas de LH es menor que la que se encontró en los picos de actividad específica de FSH. Finalmente al analizar los perfiles de la actividad específica de FSH y LH en los pacientes con hipogonadismo (Figs. 89-91) se pudo observar que son muy diferentes a los perfiles característicos del grupo normal, presentados anteriormente en las Figs. 87 y 88, observándose una diversidad de picos, algunos correspondientes a las moléculas grandes pero sobre todo en la región de las moléculas pequeñas que parecen estar más glicosiladas.

PERFIL DE ELUCION DEL ACIDO SIALICO  
EN EL GRUPO NORMAL

Ac. siálico  
ug/ml

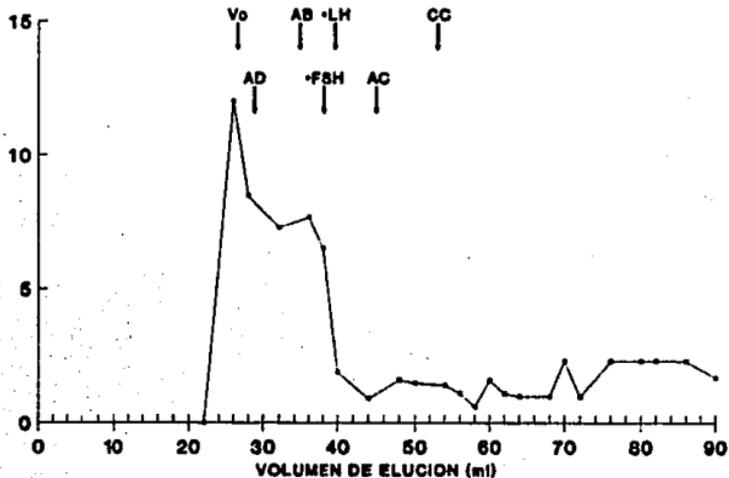


Fig. 78

Ac. siálico  
ug/ml

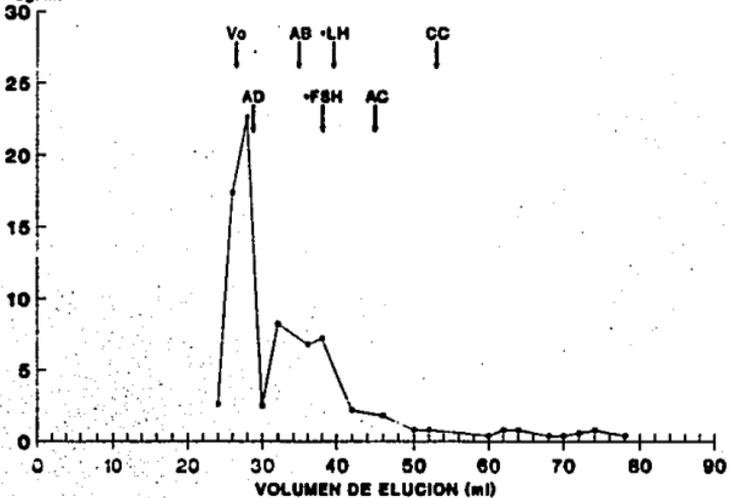


Fig. 80

### PERFIL DE ELUCION DEL ACIDO SIALICO EN EL GRUPO CON HIPOGONADISMO

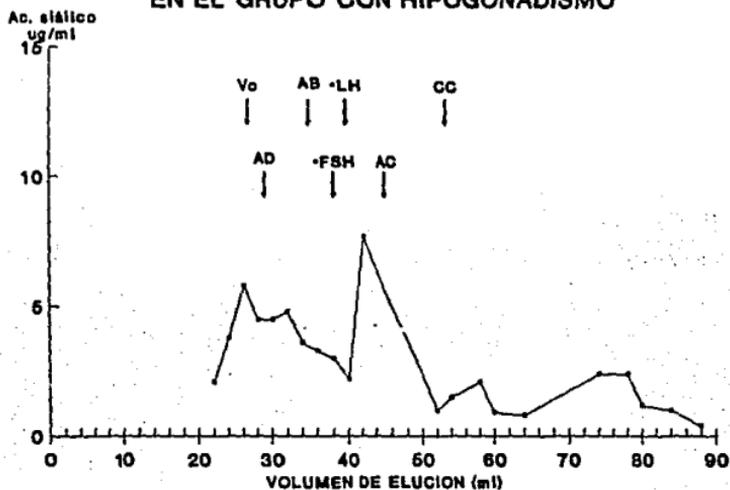


Fig. 81

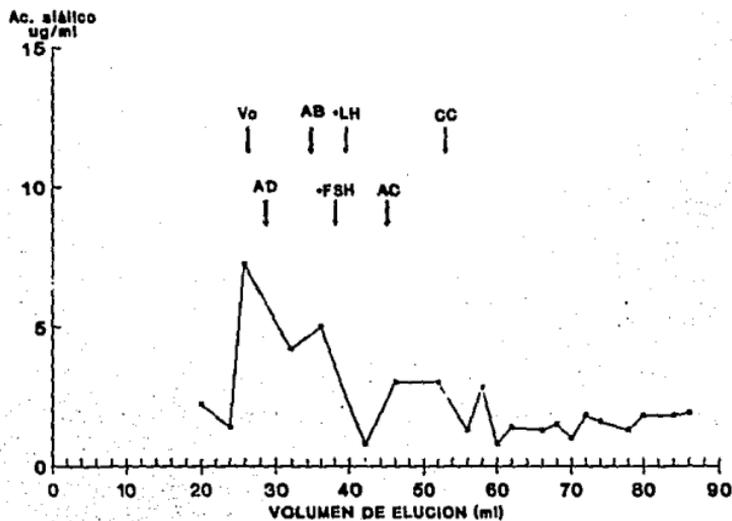


Fig. 82

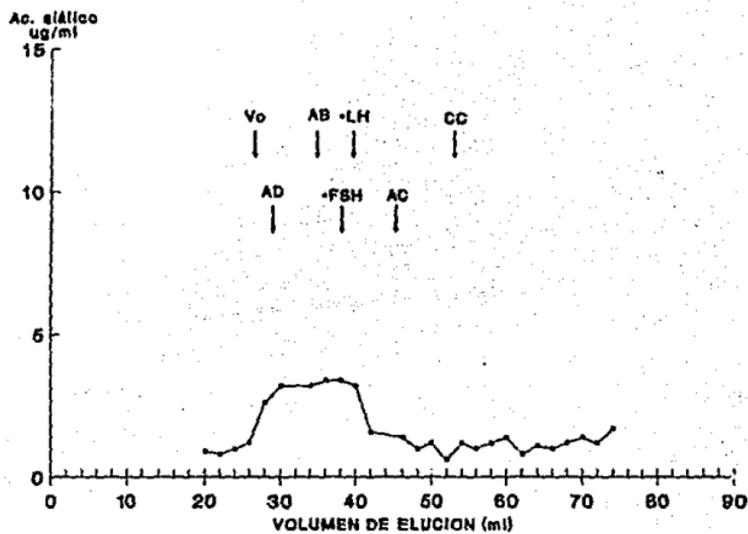
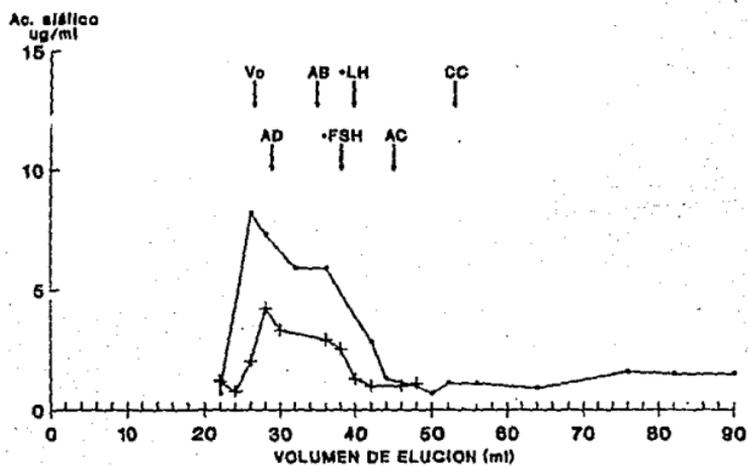


Fig. 83



— NORMAL 24 AÑOS    + HIPOGONADISMO 23 AÑOS

Fig. 84

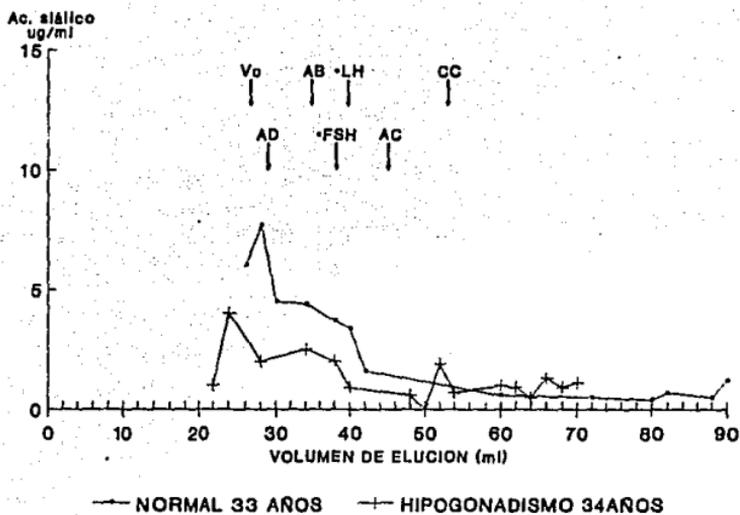


Fig. 85

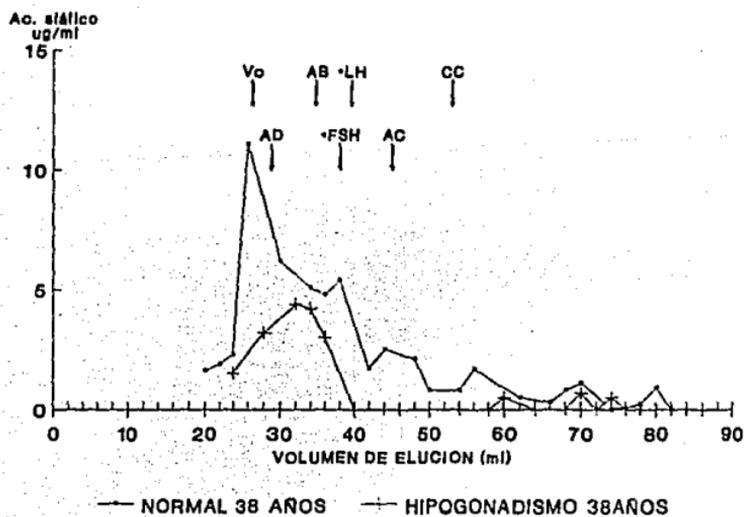


Fig. 86

### PERFIL DE GLICOSILACION DE FSH EN HOMBRES NORMALES

mg ác. siálico/mg FSH

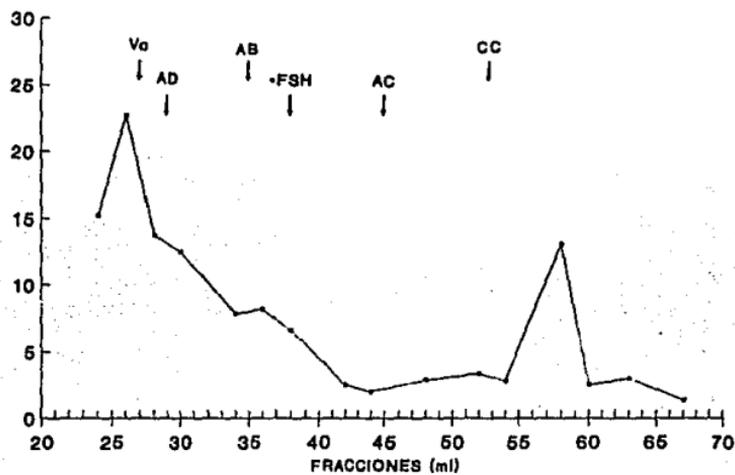


Fig. 87

### PERFIL DE GLICOSILACION DE LH EN HOMBRES NORMALES

mg ác. siálico/mg FSH

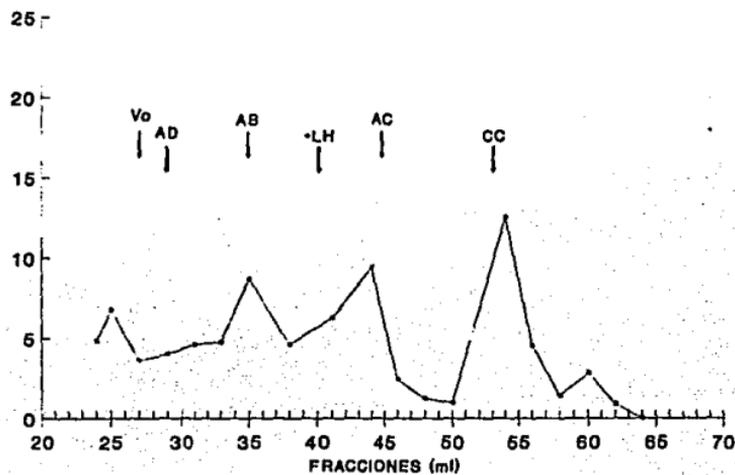


Fig. 88

## PERFIL DE GLICOSILACION DE LH Y FSH EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO

mg ác. siálico/mg hormona

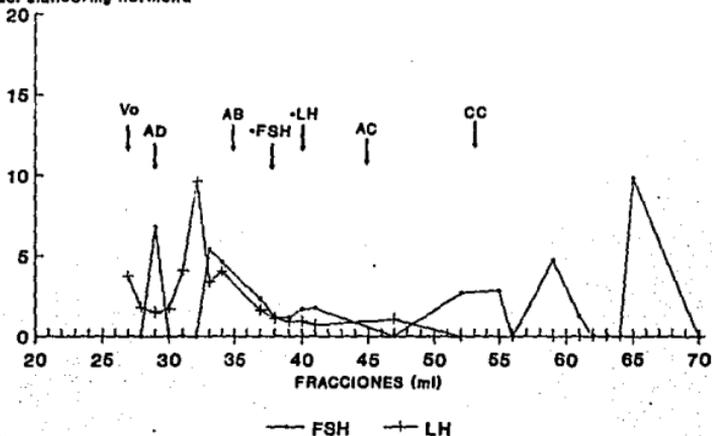


Fig. 89

mg ác. siálico/mg hormona

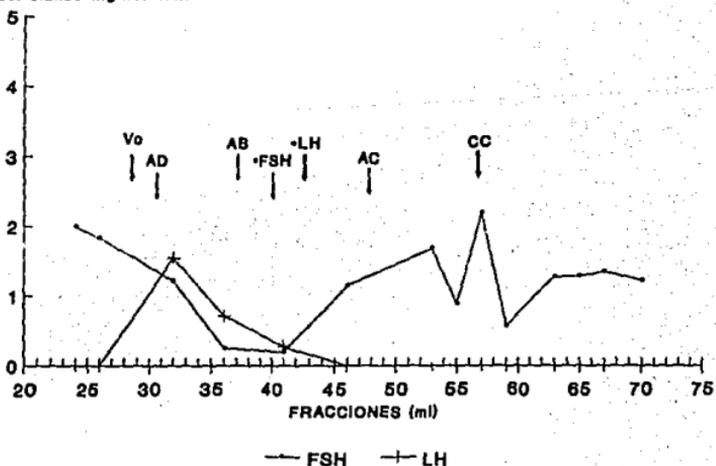


Fig. 90

mg ác. siálico/mg hormona

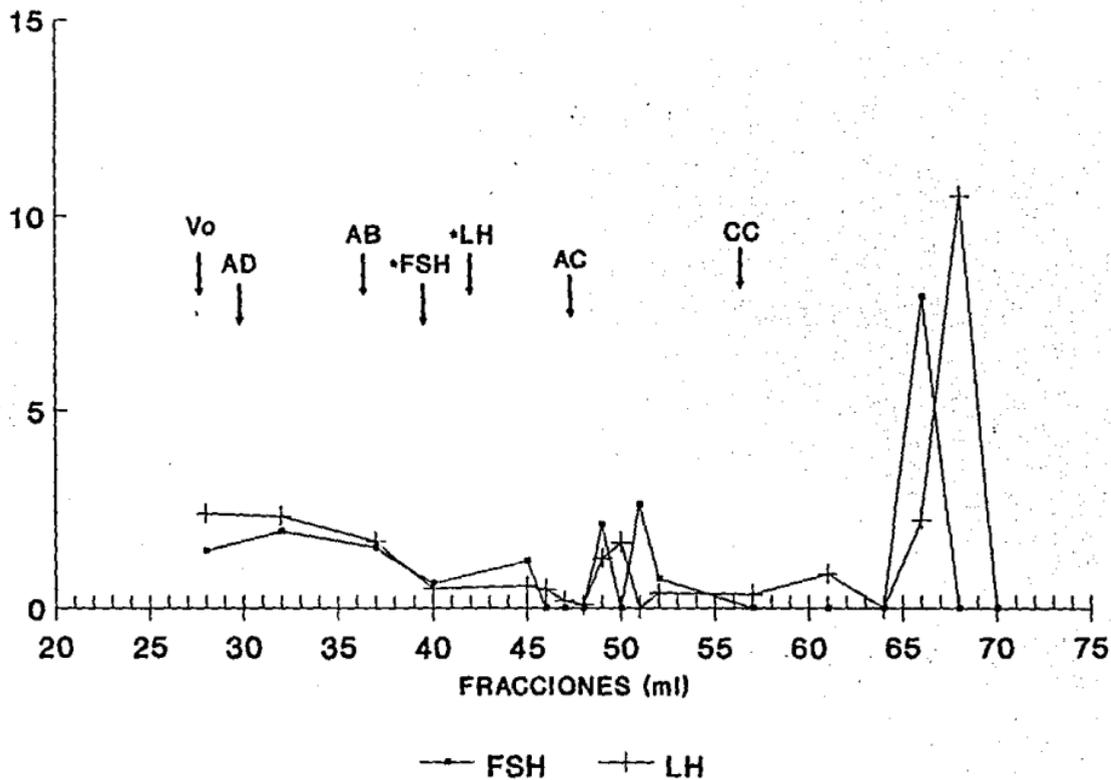


Fig. 91

## DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados del estudio efectuado, ponen de manifiesto que de acuerdo a lo que ya ha sido informado en investigaciones previas, los niveles de testosterona (T) en el hombre sufren una disminución progresiva con la edad, más significativa a partir de los 50 años, mientras que la concentración de estradiol (E2), hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina (PRL) no se modifican en forma importante, pero si la relación E2/T que está aumentada.

En el hombre con hipogonadismo la disminución de testosterona es aún más importante, sobre todo si se considera que la mayoría de ellos son individuos muy jóvenes y que esta disminución se encuentra asociada a un incremento de la concentración de E2 y sobre todo de la relación E2/T que alcanza valores muy elevados.

Por otra parte el estudio cromatográfico mostró la presencia de sus diferentes formas moleculares de LH y FSH que fueron caracterizadas por: su volúmen de elución, su coeficiente de partición ( $K_{av}$ ) y su peso molecular (PM). Para ambas hormonas se encontraron practicamente las mismas isohormonas, con pequeñas diferencias en cuanto a su PM, siendo las isohormonas de LH de 100-66, 60, 45, 34, 21-15 y < 15 Kd, y para FSH de 100-66, 60, 45, 32-30, 17-15 y < 15

kd las cuales se encontraron en proporciones variables tanto en condiciones normales como patológicas. Algunas de ellas no pudieron detectarse o estuvieron ausentes en los casos de hipogonadismo como ocurrió con la molécula de 34 Kd de LH y la de 60 Kd de FSH que no se encontraron en la mayoría de los hombres con hipogonadismo. Esto es importante porque podría indicar su posible papel en la etiología del hipogonadismo, aunque no puede excluirse que en el caso de LH esto pudiera estar condicionado por la notable disminución de las formas grandes, no así en el caso de la FSH que mostró un aumento de la proporción de la isoforma de 100-66 Kd. Sin embargo en los individuos normales jóvenes predominaron las formas moleculares grandes (100-66 KD de LH) y la molécula de 45 Kd, mientras que la de 60 Kd, la de 34 Kd y otras de PM se encuentran en menor proporción, pero conforme aumenta la edad las moléculas grandes tienden a disminuir, aumentando la proporción de las isoformas de 60 Kd y sobre todo la de 34 Kd que se incrementa notablemente debido probablemente a un mecanismo de compensación para tratar de incrementar la actividad del testículo; esto partiendo de la hipótesis de que esta isoforma tiene un papel importante en la regulación de la función testicular lo cual esta apoyado por los resultados experimentales.

En apoyo a lo anterior, debe recordarse que la molécula de 34 Kd no se detectó en los casos de esterilidad primaria, hermafroditismo verdadero y cáncer testicular, mientras que la isoforma de 60 Kd y las subunidades libres (17-15 Kd) se encontraron aumentadas. Esto también es significativo si se considera la isohormona de 34 Kd es la hormona nativa, es decir el dímero formado por la unión de las dos subunidades ( y ) las cuales de acuerdo al estudio del ácido siálico, parecen estar alteradas (más glicosiladas). Los cambios en las formas moleculares pueden explicarse en función de la relación encontrada entre la proporción de formas moleculares y la concentración de esteroides gonadales, pues como se demostró, las formas grandes sobre todo de LH tienen una relación lineal y parecen ser estimuladas por la concentración de testosterona que disminuye con la edad lo que a su vez determina la disminución de las variantes de 100-66 Kd. Por el contrario estas isoformas presentan relación negativa con la concentración de E2 y con la relación E2/T; esta última se incrementa en los hombres de edad avanzada y más aún en el hipogonadismo, por lo que unido a la disminución de testosterona también determinaría la notable disminución de

las formas grandes que se observa tanto en los hombres de edad avanzada, como en los hombres con hipogonadismo. El incremento de la isoforma de 34 Kd de LH puede explicarse porque como se demostró en el estudio de correlación esta molécula es fuertemente inhibida por la T ( $r=-0.90$  por lo cual al disminuir esta hormona, se incrementa su proporción. Respecto a las formas moleculares de FSH, como se observó en el hombre normal de edad avanzada, existe una marcada disminución de las formas grandes (100-66 Kd) en condiciones normales, lo que podría deberse a que estas moléculas tienen una relación lineal positiva y parecen ser estimuladas por el incremento en la concentración de T, de ahí que sea lógico que al disminuir la concentración de esta hormona con la edad, también disminuya su proporción. Las formas de 60 Kd y 45 Kd tienden a aumentar con la edad, al igual que las moléculas de muy bajo peso molecular (< 15 Kd). En el caso de las moléculas de 60 y 45 Kd esto puede explicarse, por la relación positiva encontrada entre la relación E2/T y estas formas moleculares, ya que dicha relación se incrementa con la edad. El incremento de las moléculas de 32-30 Kd puede deberse a que la T controla negativamente la proporción de esta isohormona y al disminuir permite que la molécula incremente su concentración; lo mismo podría decirse respecto a las moléculas de menos de 15 Kd, que también son suprimidas por la testosterona.

En los hombres con hipogonadismo las moléculas grandes (100-66 Kd) incrementaron su proporción en forma importante en la mayoría de las patologías estudiadas lo que parece una paradoja a lo que ocurre en los hombres grandes (mayores de 60 años), sin embargo esto puede deberse al fuerte efecto inductor de los estrógenos ( $r=0.91$ ) y de la relación E2/T que se incrementa notablemente en los hombres con hipogonadismo, ya que ambas estimulan la producción de esta molécula predominando su efecto sobre la testosterona. Llama la atención la virtual deficiencia, o la ausencia de la molécula de 60 Kd y la baja proporción de la molécula de 45 Kd en hombres con hipogonadismo, lo cual no puede ser explicado por el efecto de los cambios en la concentración de esteroides ya que tanto E2 como la relación E2/T (que está muy elevada en el hipogonadismo) estimulan su producción pareciendo que se tratara de una alteración genética o una incapacidad bioquímica para sintetizarlas, probablemente por alteraciones durante la síntesis o procesamiento de las hormonas.

En resumen podría decirse que la proporción de las formas moleculares de FSH y LH parecen ser moduladas en condiciones normales y en diversas condiciones clínicas como las estudiadas, por la concentración de los esteroides gonadales, que dependiendo de su concentración estimulan o inhiben la producción de las diferentes isohormonas.

Es importante mencionar que algunas de ellas parecen ser más susceptibles de regulación que otros como la de 100-66 Kd de LH que es estimulada por T e inhibida por E2 de ahí que su proporción es dependiente de la concentración de estos esteroides, por el contrario la forma molecular de 30-34 Kd es inhibida por T y estimulada por el E2 y la relación E2/T por lo que se incrementa en las hombres grandes (mayores de 60 años).

Este efecto se refleja y es congruente con los perfiles cromatográficos que muestran el predominio de formas grandes de LH en sujetos jóvenes y su disminución en el hipogonadismo, simultáneamente con la elevación de la molécula de 34 Kd por lo que los perfiles cromatográficos se cargan hacia la derecha.

Respecto a FSH la deficiencia de testosterona también origina disminución de las formas grandes en los hombres grandes, sin embargo esto no ocurre con el hipogonadismo como ya se mencionó debido probablemente al incremento de E2 y la relación E2/T que tiene un efecto inductor sobre las formas grandes, lo que determina que sean estas las formas moleculares predominantes.

En la literatura se ha mencionado que las diferentes isohormonas de LH y FSH están determinadas por el grado de glicosilación de las moléculas lo que determina su carga eléctrica su comportamiento electroforético y cromatográfico y su peso molecular. A este respecto los resultados del

estudio del ácido siálico muestran perfiles que indican que el mayor contenido de ácido siálico se localizó en la región de las formas grandes (100-66 Kd) con menor concentración en la zona donde eluyen los estándares hormonales (\*FSH y \*LH) y en el área de las subunidades libres y además, FSH está 2 a 3 veces más glicosilada que la LH. Así pues las formas grandes, sobre todo de FSH son las más glicosiladas.

Por otra parte los resultados de este estudio, también indican que en condiciones normales la concentración de testosterona también tiene un papel importante en la glicosilación de las moléculas, pues como se demostró también la concentración de ácido siálico fué mayor en los hombres normales que en aquellos con hipogonadismo, en los que además se encontraron perfiles de glicosilación aberrantes.

El E2 a su vez parece tener un efecto contrario sobre la glicosilación favoreciendo la síntesis de moléculas de menor peso molecular probablemente no glicosiladas o menos glicosiladas como son las que eluyen en la zona intermedia del cromatograma donde el contenido de ácido siálico es menor y donde eluyen las moléculas de 45 y 30-34 Kd, que como se demostró son estimuladas por estrógenos. Estos resultados son congruentes con estudios previos en los que se ha demostrado que las moléculas de FSH y LH durante el ciclo menstrual tienen menor peso molecular y están menos glicosiladas.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados anteriores se podría concluir que los esteroides gonadales; testosterona (T) y estradiol (E2) tienen un papel importante no solo en los mecanismos que controlan la secreción de gonadotropinas hipofisarias mediante el mecanismo clásico de retroalimentación (Feed back negativo) sino que además influyen de manera considerable sobre el perfil molecular de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) ya que modulan y controlan la proporción de las formas moleculares de ambas hormonas, siendo dependientes de la concentración a la cual se encuentren dichos esteroides, por lo que la edad en los hombres normales también juega un papel decisivo para el predominio de determinadas formas moleculares debido a los cambios hormonales que se presentan al avanzar la edad. Esta regulación se ejerce probablemente através de la glicosilación de las moléculas de las gonadotropinas; como se observó, están más sializadas las moléculas grandes que dependen de T y es mayor el contenido de ácido siálico en los hombres normales, por lo que podría decirse que en los hombres con hipogonadismo la glicosilación deficiente o alterada de FSH y LH y la ausencia de algunas isoformas como la de 60 kd de FSH y la de 34 kd de LH pueden ser factores que determinan probablemente una baja bioactividad de las gonadotropinas hipofisarias y por lo tanto un estímulo inadecuado para el testículo, determinando así el hipogonadismo.

**ANEXO: CONTROL DE CALIDAD DEL RIA DE  
LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) Y HORMONA  
FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)**

**CONTROL DE CALIDAD DEL RIA DE FSH Y LH.**

Se llevó a cabo con el objeto de garantizar la confiabilidad de las determinaciones en las que se basan los resultados de este estudio.

- Especificidad.

En la tabla A se muestran los datos de la reactividad cruzada de los antisueros empleados en las determinaciones de LH y FSH, entre ellos mismos y con respecto a la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la Gonadotropina coriónica humana (HCG), hormonas con las cuales presentan homología estructural. El porcentaje de reacción cruzada de FSH con las diferentes hormonas es muy bajo, sin embargo LH cruza en forma importante con la HCG de origen placentario; en nuestro estudio los pacientes que se manejaron fueron varones, por lo que con excepción del caso de cáncer testicular que puede producir HCG la reactividad cruzada con esta hormona no es posible.

# ESPECIFICIDAD

## REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS ANTISUEROS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE FSH Y LH.

	% DE REACTIVIDAD CRUZADA CON FSH	% DE REACTIVIDAD CRUZADA CON LH
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE HUMANA (FSH)	113.0	4.3
HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES HUMANA (TSH)	0.37	9.4
HORMONA LUTEINIZANTE HUMANA (LH)	0.50	100.0
GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (HCG)	0.002	26.1

LOS RESULTADOS SE EXPRESAN COMO LA RELACION DE LA CONCENTRACION DE FSH Y/O LH  
A LA CONCENTRACION DE LA SUSTANCIA DE REACCION CRUZADA AL 50 % DE INHIBICION DE  
MAXIMA UNION.

Tabla A

**P R E C I S I O N****VARIACION INTER-ENSAYO DE LH Y FSH**

Como un apoyo a la confiabilidad de los datos reportados, en las Tablas B y C se indica la precisión de los ensayos de LH y FSH evaluados mediante la  $M + DE$  y el coeficiente de variación (CV) de tres sueros control que se procesaron en cada uno de los radioinmunoanálisis realizados en la presente investigación (12 para FSH y 20 para LH), datos que son representados esquemáticamente en las gráficas de Levey-Jennings (Figs. I-VI) en donde podemos observar que los valores obtenidos para los tres sueros control, se mantuvieron en todos los ensayos dentro de dos desviaciones estándar, por lo que puede decirse que los ensayos fueron adecuados. Dentro de este contexto se encontró una mayor imprecisión en los sueros control de valores bajos.

# CONTROL DE CALIDAD DEL RIA DE FSH Y LH

## PRESICION INTER - ENSAYO PARA FSH

SUERO CONTROL	NUMERO DE ENSAYOS	M $\pm$ D E (mUI/ml)	C V (%)
B A J O	12	9.7 $\pm$ 0.95	9.84
M E D I O	12	17.54 $\pm$ 1.55	8.83
A L T O	12	64.50 $\pm$ 5.89	9.13

Tabla B

## PRESICION INTER - ENSAYO PARA LH

SUERO CONTROL	NUMERO DE ENSAYOS	M $\pm$ D E (mUI/ml)	C V (%)
B A J O	20	16.14 $\pm$ 1.77	11.72
M E D I O	20	26.33 $\pm$ 2.68	10.18
A L T O	20	83.01 $\pm$ 5.26	6.34

Tabla C

## GRAFICAS DE LEVEY - JENNINGS PARA FSH

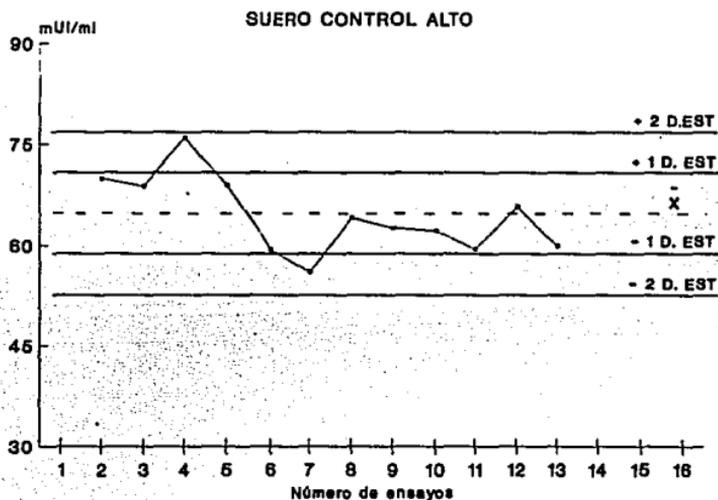


Fig. I

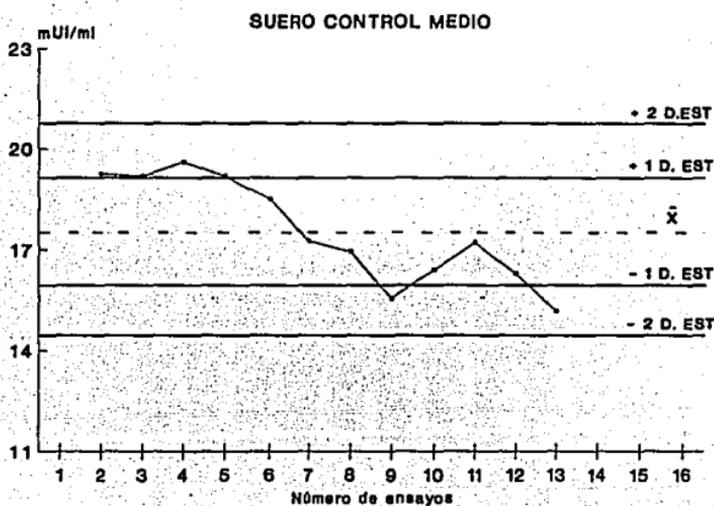


Fig. II

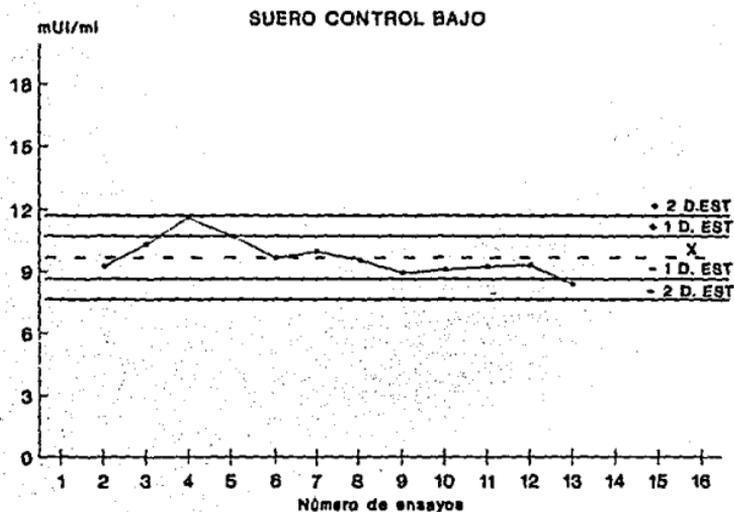


Fig. III

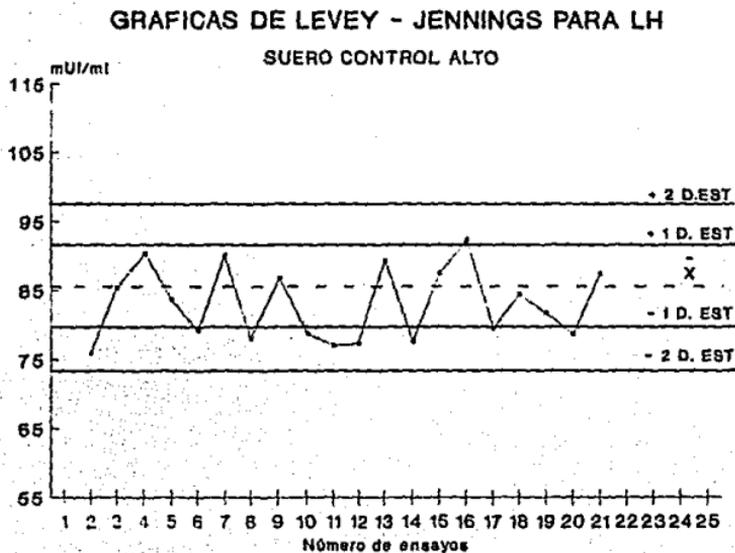


Fig. IV

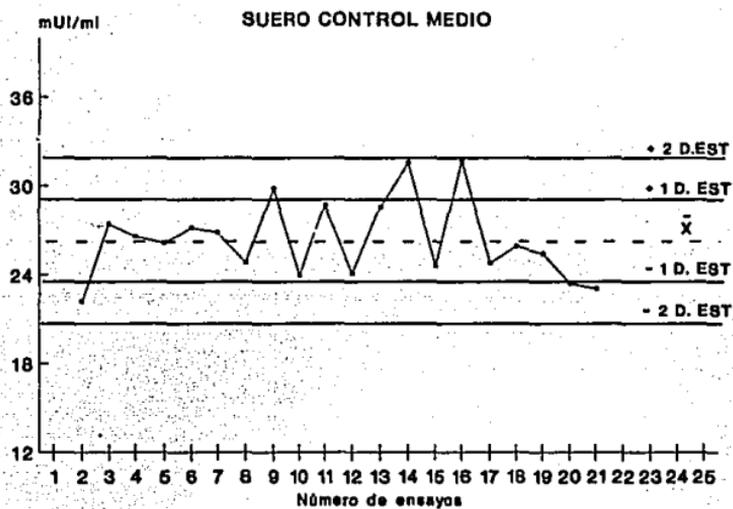


Fig. V

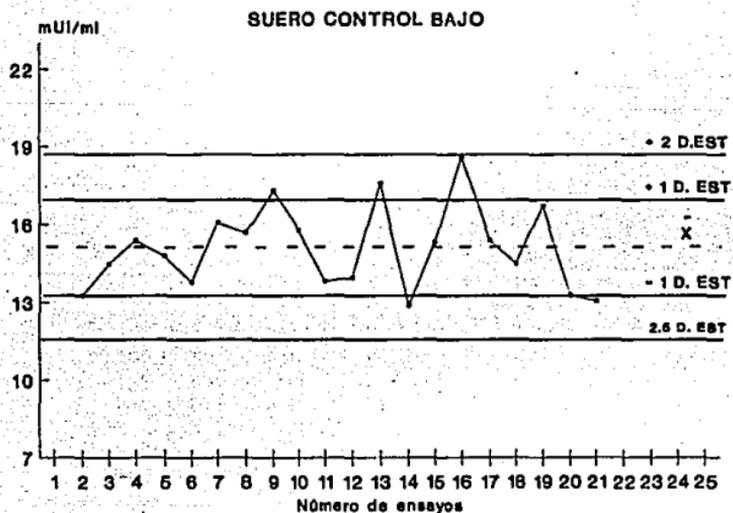


Fig. VI

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Greenspan SF, Forsham HO. Endocrinología básica y clínica. 2a Ed. México: Editorial el Manual Moderno, 1988: 345-78.
- 2.- Mason M, Fonseca Y, Ruiz E, Morán C, Zarate A. Distribution of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone isoforms in sera from women with primary ovarian failure compared with that of normal reproductive and postmenopausal women. *Fertility Sterility* 1992; 22 (2): 1-6.
- 3.- Ochoa R, Mason M, Fonseca Y, Morán C, Zarate A. Distribution of growth hormone isoforms in sera from women with normal ovarian function, galactorrhea, and normoprolactinemia. *Fertility Sterility* 1993; 60 (2): 272-75.
- 4.- Kourides IA, Landon MB, Hoffman BI, Weintraub BD. Excess free alpha relative to beta subunits of the glycoprotein hormones in normal and abnormal human pituitary glands. *Clinical Endocrinology* 1980; 12: 407-16.
- 5.- Sherins RJ, Vaitukaitis JL, Chrambach A. Physical characterization of FSH and its desialylation products by isoelectrofocusing and electrophoresis in polyacrylamide gel. *Endocrinology* 1973; 92: 1135-41.
- 6.- Van-Ginkel LA, Loeber JG. Heterogeneity of human luteinizing hormone. Effect of neuraminidase treatment on biologically active hormone and alpha and beta subunits. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 114(4): 577-83.
- 7.- Fonseca ME, Mason M, Zarate A. Heterogeneidad molecular de las gonadotropinas circulantes en la menopausia. *Arch Inv Med* 1988; 19: 41-48.
- 8.- Wide L. Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 55: 682-88.
- 9.- Peckman WD, Knobil E. Qualitative changes in the pituitary gonadotropins of the male rhesus monkey following castration. *Endocrinology* 1976; 98 (4): 1061-64.
- 10.- Solano AR, García AV, Catt KJ. Modulation of serum and pituitary luteinizing hormone bioactivity by androgen in the rat. *Endocrinology* 1980; 106 (6): 1941-48.

- 11.- Matzkin H, Homonnai ZT, Galiani D, Paz G, Dekel N. Serum Bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone in oligospermic and azospermic: application of a modified granulosa cell bioassay. *Fertility Sterility* 1990; 53 (4): 709-14.
- 12.- Beyer TA, Rearick JI, Paulson JC. Biosynthesis of mammalian glycoproteins. *J Biol Chem* 1979; 254: 12531-41.
- 13.- Whitcomb RW, Crowley WF. Clinical review 4: Diagnosis and treatment of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70 (1): 3-7.
- 14.- Dunkel L, Alfthan H, Stenman UH, Perheentupa J. Gonadal control of pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boys evaluated by ultrasensitive time-solved immunofluorometric assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70 (1) 107-114.
- 15.- Beitins Z, Axelrod Ll, Ostrea T, Little R, Badger T. Hypogonadism in a male with an immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: characterization of the abnormal hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 52 (6): 1143-49.
- 16.- Vitukaitis JL, Ross GT. Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 308-11.
- 17.- Chapel SC, Ulloa A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endoc Rev* 1983; 4: 179-211.
- 18.- Miller C, Ulloa A, Chappel HL. Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biological activities of each follicle-stimulating hormone (FSH) form. *Fertility Sterility* 1983; 40: 242-47.
- 19.- Philip H. The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; 52 (4): 735-53.
- 20.- Lobo A, Kletzky O. normalization of androgen and sex hormone binding globulin levels after treatment of hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol metab* 1983; 56 (3): 552-66.

- 21.- Lipshultz LI, Howards SS. Infertility in the male. 2a Ed. Toronto: Editorial Mosby-year book, 1991: 121-70.
- 22.- Veldhuis JD, Urban RJ, Beitins IZ, Blizzard RM, Johnson ML, Dufau ML. Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Steroid Biochem* 1989; 33 (4): 739-49.
- 23.- Castro MM, Bropnsther B, Angulo MA. Genetic forms of male hypogonadism. *Urology* 1990; 35 (3): 195-204.
- 24.- Winters SJ. Expanding the differential diagnosis of male hypogonadism. *N Engl J Med* 1992; 326 (3): 193-5.
- 25.- De la Cruz CD, Méndozza NV. Manual para elaborar proyectos de investigación en ciencias de la salud. Lineamientos generales. México: Editorial UNAM, 1990: 7-136.
- 26.- Wortsman J, Rosner W, Dufau ML. Abnormal testicular function in men with primary hypothyroidism. *Am J Med* 1987; 82 (2): 207-12.
- 27.- Laurent TG, Killander J. A theory of gel filtration and its experimental verification. *J Chromatogr* 1964; 14: 317-20.
- 28.- Moore TW, Eastman CR. Diagnostic endocrinology. Filadelfia: Editorial Mosby-year book, 1990: 17-31.
- 29.- Spiro RG. *N. Engl J Med* 1963; 269: 566-621.
- 30.- Plucinsky MC, Riley WM, Prorok JJ. *Cáncer* 1966; 58: 2680-85.
- 31.- Berns GJ, O'Kennedy R. *Biochem Soc Trans* 1990; 18: 333-34.
- 32.- Moran E, O'Kennedy R, Thornes RD. *Biochem Soc Trans* 1985; 109: 55-59.
- 33.- Stefenell HK, Klotz AE, Engel A, Baver P. *J Cáncer Clin Oncol* 1985; 109: 55-59.
- 34.- Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 1959; 234: 1971-75
- 35.- Wang W, Erlansson K, Lindh F, Lundgren T, Zopf D. High-performance liquid chromatography of sialic acid-containing oligosaccharides and acidic monosaccharides. *Anal Biochem* 1990; 190: 182-87.

- 36.- Manzi AE, Díaz S, Varki A. High-pressure liquid chromatography of sialic acids on a pellicular resin anion-exchange column with pulsed amperometric detection: A comparison with six other systems. Anal Biochem 1990; 188: 20-32.
- 37.- Gross HJ, Sticher U, Brossmer R. A highly sensitive fluorometric assay for sialyl transferase activity using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as donor. Anal Biochem 1990; 186: 127-34.
- 38.- Kinsella AV, Berns JG, Kennedy R. A modified thiobarbituric acid method for the determination of N-acetylneuraminic acid. Biochem Soc Trans 1991; 19: (1): 56.