



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

56

Zey

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

FALLA DE ORIGEN

FACTORES HORMONALES QUE DETERMINAN LA CONCENTRACION Y ESTRUCTURA DE LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE HORMONAS SEXUALES (SHBG)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: CARLOS RIVERA PAREDES

UNAM FES ZARAGOZA



LO RENOVAMOS EN SU 25 ANIVERSARIO

ASESORES: DRA. MA. EUGENIA FONSECA YERENA OFB MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1995



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.

Todas las aptitudes del hombre tienen sus limitaciones y esto sirve para curarnos de la debilidad de sentirnos satisfechos de nosotros mismos.

Arthur Conan Doyle.

Pero esto es lo maravilloso del hombre: nunca se desalienta o disgusta lo suficiente para abandonar algo que debe hacer, porque sabe que es importante y merece la pena serlo.

Ray Bradbury.

Con todo mi agradecimiento a:

Dra. Ma. Eugenia Fonseca Yerena

QFB Martha A. Sánchez Rodríguez

por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo.

**A mis sinodales por sus acertados comentarios
en la corrección del escrito.**

Al Dr. Arturo Zárate Treviño

**Jefe de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades
Endócrinas del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI por
permitir la realización de esta tesis.**

**A todo el personal del Laboratorio de la Unidad de
Investigación Clínica de Enfermedades Endócrinas
del CMN Siglo XXI del IMSS**

Dedico este trabajo de manera especial a:

Mis padres: Pascual Rivera Marquina

Imelda Paredes de Rivera

por toda la bondad y confianza con que forjaron mi camino.

A mis hermanos: Alejandro Armando

Rosa Maria y

Eduardo

por el apoyo y estímulo incondicional que me ofrecieron.

**A mis compañeros y profesores por los
gratos momentos que compartimos y por
las enseñanzas recibidas.**

**Este trabajo también está dedicado a ti: amigo,
compañero o estudiante que de alguna manera
colaboraste en la realización de este trabajo y
que con tu presencia me diste ánimo para
terminarlo.**

CONTENIDO

Resumen	1
Capitulo I.-Introducción	4
Planteamiento del problema	6
Objetivos	9
Hipótesis	10
Capitulo II.- Antecedentes	11
1.-Ciclo Mestrua	11
2.-Ovarios Poliquísticos	13
3.-Menopausia	14
4.-Tratamiento de la Menopausia	14
5.-Cambios Endocrinológicos del embarazo	15
6.-Función testicular e hipogonadismo en el hombre	17
7.-Glándula Tiroides	19
Capitulo III.-Diseño experimental	24
1.-Material de laboratorio	24
2.-Material clínico	26
3.-Métodos	27
Capitulo IV.-Resultados	36
I.-Estudio hormonal y concentraciones de la SHBG	36
II.-Relación de los niveles de la SHBG con la concentración de hormonas	49
III.-Resultados del estudio cromatográfico	58
IV.-Caracterización de las formas moleculares de la SHBG	69
V.-Efecto de los niveles de testosterona sobre las formas moleculares de la SHBG en el hombre	77
VI.-Perfiles moleculares de la SHBG en la mujer	80
VII.-Perfiles moleculares de la SHBG en pacientes con alteraciones de la glándula Tiroides	102
VIII.- Estudio del ácido siálico	108
Capitulo V.-Discusión de resultados y conclusiones	131
Anexo I.-Estandarización del RIA de la SHBG	145
Anexo II.-Estandarización del método del ácido tiobarbitúrico para la determinación de ácido siálico	152
Bibliografía	161

RESUMEN.

La globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) es una glicoproteína plasmática producida por el hígado que transporta específicamente estradiol y testosterona, así como sus derivados. Los niveles plasmáticos de la SHBG están influidos por la variación en la concentración sérica de varias hormonas como son: testosterona, estradiol y hormonas tiroideas principalmente.

La SHBG es importante para la disposición y captación de las hormonas esteroideas por los tejidos blanco, en los cuales ejercen su acción biológica; no obstante no se conoce la función precisa de esta proteína, en el sistema endócrino, como también se desconoce la importancia de la glicosilación de la proteína.

Se ha apreciado que la concentración sérica de la globulina varía en ciertos estados fisiológicos y en ciertos procesos patológicos en los que están involucrados cambios en el ambiente hormonal. Este estudio pretende dilucidar cuales son los mecanismos que regulan la concentración plasmática de la SHBG, así como su heterogeneidad molecular y el grado de glicosilación de la proteína y sus implicaciones.

Para lograr lo anterior se realizaron determinaciones de los niveles plasmáticos de la SHBG en muestras de pacientes en los que de alguna manera, normal o patológica existían variaciones en las concentraciones plasmáticas de los andrógenos, estrógenos y las hormonas tiroideas; tales estados fueron: hipogonadismo e hipertiroidismo en los hombres, y ciclo menstrual normal, embarazo, menopausia (con y sin tratamiento) ovarios poliquísticos e hipotiroidismo en la mujer. Se determinaron los niveles hormonales de FSH, LH, testosterona, estradiol y hormonas tiroideas a fin de establecer la posible correlación de estas hormonas con los niveles de la SHBG, para lo cual se determinó la concentración de SHBG en el suero de 15 pacientes de cada grupo. Además a las muestras de dos pacientes de cada grupo se le realizó una cromatografía en Sephadex G-150 para determinar las isoformas de la proteína en las diferentes situaciones clínicas estudiadas y por otra parte también se determinó la concentración de ácido siálico en cada uno de los sueros y en las fracciones de las muestras cromatografiadas, para conocer su distribución en las diferentes isoformas.

Los resultados obtenidos indican que la concentración de la SHBG es más elevada en las mujeres que en los hombres, en las mujeres a su vez, es más elevada durante el ciclo menstrual y durante el embarazo que en la menopausia y que en los ovarios poliquísticos; lo que implica que existe una regulación positiva de la SHBG por los estrógenos y un efecto negativo por parte de la testosterona.

En los estudios de correlación entre la concentración de las hormonas y de la SHBG se encontró un marcado " dimorfismo sexual " en la regulación de la globulina por los esteroides sexuales, es decir que en la mujer la testosterona inhibe a la SHBG y el estradiol la estimula, mientras que en el hombre ocurre lo contrario; así también se estableció que las hormonas tiroideas estimulan la síntesis de la SHBG mostrando mayor correlación con los niveles de SHBG que los mismos estrógenos.

Con respecto al estudio cromatográfico se estableció la presencia de por lo menos 8 diferentes variedades moleculares o isoformas de las que destacan: un oligómero, un dímero, dos monómeros y 4 isoformas de peso molecular bajo, probablemente fragmentos de degradación de la SHBG. Cabe mencionar que las isoformas mencionadas no se encontraron en todos los casos estudiados, pero se detectaron claramente en algunos de ellos, observándose además cambios en la proporción cuantitativa de las isoformas y un recambio de una forma molecular a otra, lo que indica que las isoformas se encuentran en equilibrio dinámico, modificando su proporción en respuesta a los cambios hormonales.

Se encontró que las diferencias existentes en la SHBG entre hombres y mujeres no solo es cuantitativa, también es en relación a la proporción de las isoformas existentes, lo que indica que los cambios en estrógenos y andrógenos modifican no solo la cantidad de la SHBG, sino también las isoformas presentes, determinando un recambio entre las formas moleculares.

En nuestros resultados el contenido de carbohidratos fué de 22-23 % siendo de ellos, el más importante el ácido siálico demostrándose que la glicosilación es variable dependiendo del estado fisiopatológico.

Por otra parte se estableció que los estrógenos y las hormonas tiroideas modulan la glicosilación de las isoformas de la SHBG determinando que en el hombre normal las isoformas de mayor peso molecular sean las que se encuentran con mayor grado de glicosilación, mientras que en las mujeres sean las formas monómericas; como se sabe la glicosilación de la SHBG es la que determina su microheterogeneidad molecular. De acuerdo a recientes estudios esta microheterogeneidad molecular, es un regulador de la especificidad de la SHBG para el transporte de esteroides, así como para unir el complejo SHBG-hormona a los receptores de los tejidos blanco determinando también la velocidad de su metabolismo por lo que la principal función de la SHBG puede ser regular la distribución de hormonas a las células de los tejidos.

CAPITULO I

Introducción.

La transmisión de información en el organismo es llevada a cabo por los sistemas nervioso y endócrino; en el sistema endócrino el mensaje es transportado de una célula a otra a través de la corriente sanguínea mediante sustancias químicas denominadas *hormonas*.

Las hormonas son mensajeros químicos que coordinan la actividad de diferentes células en los organismos pluricelulares y tienen las siguientes características:

- Son moléculas sintetizadas por tejidos específicos.
- Se secretan directamente al torrente circulatorio, que las transporta hasta el sitio donde van a actuar.
- Alteran específicamente la actividad de ciertos tejidos susceptibles (órgano blanco, células diana)

Desde el punto de vista estructural existen tres clases principales de hormonas:

- 1) Hormonas protéicas.
- 2) Derivadas de aminoácidos.
- 3) Hormonas esteroides.

Entre estas clases de hormonas existen algunas diferencias fundamentales, las dos primeras son hormonas solubles en agua (protéicas y aminas aromáticas) mientras que las hormonas esteroides de naturaleza lipídica no lo son ⁽¹⁾. Las primeras, tienen receptores específicos sobre la superficie celular; cuando una célula blanco recibe su mensaje endócrino, la función celular es estimulada vía *segundo mensajero* de los cuales el sistema de la adenilato ciclasa es el mejor conocido. En el caso de las hormonas esteroides el receptor de la hormona está localizado en el interior de la célula blanco. Así mientras que las hormonas polipeptídicas pueden interaccionar directamente en la superficie celular, los esteroides requieren entrar a la célula. Esto sugiere diferentes mecanismos de transporte para las diferentes hormonas. Las hormonas protéicas, hidrosolubles circulan libremente en el torrente sanguíneo, las hormonas esteroides y tiroideas,

insolubles en agua, son solubilizadas mediante la fijación a proteínas transportadoras como la albúmina, o bien a proteínas específicas (2). Las hormonas esteroides viajan en el plasma en un estado de equilibrio dinámico entre el estado unido a proteína y el libre (fig. 1). Esto se debe a que una vez que la hormona se libera a la circulación de su sitio de producción, una proporción importante y variable es unida a las proteínas del plasma. Las proteínas plasmáticas humanas específicas para los esteroides sexuales son: la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), (también llamada globulina transportadora de testosterona-estradiol, globulina transportadora de testosterona o proteína transportadora de esteroides sexuales), la globulina transportadora de cortisol (CBG), y la recientemente identificada proteína transportadora de estradiol (E₂B). Las proteínas transportadoras varían entre especies así como las funciones desempeñadas por las diferentes hormonas.

El lugar de la albúmina en el transporte de esteroides permanece incierto ya que la albúmina tiene una gran capacidad para unir a las hormonas y a otras moléculas, sin embargo la afinidad de esta unión es de un orden bajo. Por esta razón se ha considerado, que esta unión no específica, no afecta la disponibilidad de la hormona para los tejidos blanco, como ocurre cuando los esteroides se unen a las proteínas específicas.

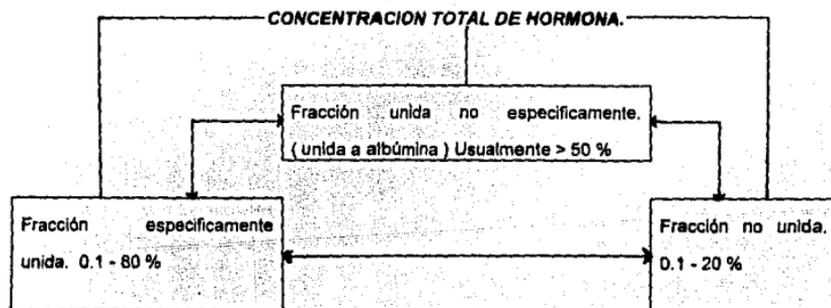


FIG. 1.- Transporte de hormonas esteroides en plasma humano.

Planteamiento del problema.

La globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG), es una proteína plasmática de origen hepático, de transporte específico para hormonas esteroides. Fue descubierta a mediados de la década de los 60's (3) y es representativa de la clase de glicoproteínas sanguíneas específicas fijadoras de hormonas.(4) Esta glicoproteína fija específicamente 5α -dihidrotestosterona (DHT) y testosterona (T) con una elevada afinidad y 17β -estradiol (E_2) con menor afinidad.

La globulina transportadora de hormonas sexuales, (SHBG), es una beta globulina; cuya masa molecular ha sido estimada de 30-120,000. Puede existir en el plasma como un monómero o un dímero formado por dos subunidades, de tamaños diferentes de 52 y 49 kDa en relación 10:1 según algunos investigadores; no obstante en algunos sujetos se ha demostrado que la SHBG tiene una variante molecular de 56 kDa (5).

Al igual que otras β -globulinas la SHBG es una glicoproteína con un contenido variable de carbohidratos (entre 18-32 %) siendo aproximadamente la tercera parte de ellos ácido siálico. La microheterogeneidad que es típica de las glicoproteínas también puede ser observada para SHBG, atribuyéndose a variaciones en el contenido de los residuos de ácido siálico, lo que determina diferentes grados de glicosilación de la proteína, diferente carga y peso molecular (4,6,7,8,9). En términos fisiológicos la presencia de residuos de ácido siálico es importante porque parecen aumentar la vida media funcional de las glicoproteínas, debido a que las asialoglicoproteínas son clarificadas de la circulación rápidamente, mediante su unión a receptores hepáticos específicos, con la subsecuente internalización hepática del complejo. Algunos autores mencionan evidencia de que la glicosilación de las glicoproteínas es un factor importante que regula su mecanismo de acción (10), esto no es totalmente aceptado ya que otros autores consideran que los carbohidratos componentes de esta glicoproteína no participan en su función fisiológica, debido a que las cadenas de oligosacáridos no están involucradas en las interacciones hormona-proteína (4). No obstante es preciso mencionar que la microheterogeneidad de esta proteína se origina de la variabilidad del contenido monosacárido de los oligosacáridos (3), además de que la presencia de carbohidratos modifica las propiedades

físicas y químicas del péptido, altera su accesibilidad a la hidrólisis por proteasas, regula el metabolismo de la proteína, influye en su movilidad, localización y organización.⁽¹¹⁾

Respecto a su acción biológica, se han propuesto algunas funciones importantes para la SHBG tales como: un papel regulador, estabilizando los niveles de hormona libre, en presencia de patrones de producción fluctuantes. Así se cree, que la principal función de esta glicoproteína de transporte es la de proteger a las hormonas esteroideas de la acción de factores sanguíneos y de la eliminación excesiva.⁽⁴⁾ Sin embargo el papel preciso de la SHBG dentro del sistema endócrino no está, hasta el momento, completamente definido.

Bajo condiciones normales, las concentraciones circulantes de SHBG en el hombre y en la mujer, no muestran cambios circadianos ni cíclicos, teniendo poco cambio en su concentración a través de la vida adulta, aún después de la menopausia.

Sin embargo se han detectado variaciones de la concentración de la SHBG en relación con la edad y el sexo y se ha observado lo siguiente: al momento del nacimiento, la concentración de SHBG es baja y similar en ambos sexos; antes de la pubertad cuando aún no ocurre el incremento de T o E₂, la concentración de SHBG disminuye ligeramente en ambos sexos. Después en la pubertad, se observa un progresivo dimorfismo sexual, los niveles de SHBG disminuyen progresivamente en los varones, hasta alcanzar los valores de la edad adulta, mientras que en las mujeres la disminución de SHBG, aunque también ocurre, es menor⁽⁶⁾. En mujeres en edad reproductiva se han reportado niveles más altos de SHBG durante el periodo peri-ovulatorio y en la fase lútea del ciclo menstrual, que durante la fase folicular temprana, sin embargo esto no ha sido confirmado. Por otra parte en las mujeres post-menopáusicas los niveles de SHBG parecen ser ligeramente más bajos que durante la vida reproductiva y se sabe que la terapia de reemplazo hormonal incrementa los niveles de SHBG a cifras no solo mayores que las presentes en la post-menopausia, sino aún más elevadas que en las mujeres ovulando. Durante el embarazo ocurre un rápido incremento de los niveles de SHBG, llegando a ser a los tres meses tres veces más elevados que los niveles basales, cuatro veces a los seis meses y de siete a ocho veces al término de la gestación⁽⁶⁾.

En varones adultos, los niveles medios de SHBG, son estables entre los 20 y 50 años de edad, comenzando a incrementarse en la sexta década de la vida.

En la actualidad se han establecido diversas condiciones bajo las cuales los niveles plasmáticos de SHBG varían. Entre ellas se han considerado:

- a) Factores hormonales como: la concentración de andrógenos, estrógenos, progestágenos, corticoides, hormonas tiroideas, hormona del crecimiento y prolactina. La administración de hCG a hombres normales o con hipogonadismo hipogonadotrópico causa solo una ligera disminución en SHBG (12).
- b) Factores no hormonales como: obesidad, estrés, drogas, cirrosis hepática, síndrome nefrótico e insuficiencia renal crónica.

No obstante, no se sabe con exactitud cuales son los factores que controlan la síntesis de la SHBG, ni su grado de glicosilación y su influencia sobre su acción biológica.

Por ello considerando todos estos antecedentes, decidimos estudiar los factores hormonales que regulan a la SHBG, no solo en su concentración, sino también su estructura, formas moleculares y grado de glicosilación, en diversos estados fisiológicos y patológicos.

En este estudio se cuantificará la concentración de SHBG en el suero por radioinmunoanálisis (RIA) y se estudiará su estructura por cromatografía en columna de Sephadex G-150, para así conocer sus formas moleculares en diferentes condiciones clínicas. Además se establecerá el grado de glicosilación de la SHBG mediante la determinación de ácido siálico en el suero y en las diferentes fracciones cromatográficas, tratando de encontrar una relación entre la heterogeneidad molecular y el contenido de ácido siálico.

Objetivos.

1.- Determinar por radioinmunoanálisis los valores de la SHBG en las siguientes condiciones fisiológicas o patológicas:

- Varones con niveles hormonales normales.
- Varones con hipogonadismo, en condiciones basales y bajo prueba de reserva testicular (estimulación con hCG).
- Mujeres normales en edad fértil, durante el ciclo menstrual.
- Mujeres con ovarios poliquísticos.
- Mujeres menopáusicas con y sin terapia de reemplazo hormonal (tratamiento con estrógenos).
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con hipotiroidismo.
- Pacientes con hipertiroidismo.

2.- Establecer una posible relación entre la concentración de la SHBG y los niveles de E₂ y T, así como de las hormonas tiroideas, en los diferentes estados fisiológicos o patológicos.

3.- Determinar las características estructurales de la SHBG en los diferentes estados fisiológicos o patológicos señalados, mediante cromatografía en columna de Sephadex G-150.

4.- Determinar la concentración de ácido siálico en el suero de los pacientes y en las diferentes fracciones de cada cromatografía.

5.- Determinar el posible papel de las hormonas sobre la estructura de la SHBG, su grado de glicosilación y por lo tanto su acción biológica.

Hipótesis.

Las hormonas gonadales (E_2 , T) son transportadas en el torrente circulatorio, unidas a la SHBG la cual mediante esta unión, regula el grado de acción de estas hormonas, ya que, como se sabe, solo interactúa con el receptor la fracción libre, para ejercer su acción biológica.

Las hormonas esteroides a su vez regulan la síntesis y grado de glicosilación de la SHBG, determinando así la microheterogeneidad que caracteriza a esta glicoproteína.

Por lo tanto la concentración de T y E_2 no sólo modifican la concentración sino también la estructura de la SHBG, efecto que debe ser específico de las hormonas gonadales.

CAPITULO II

ANTECEDENTES.

Como ya se mencionó anteriormente, existen algunos factores hormonales que influyen en la concentración de la SHBG, como son los estrógenos, andrógenos y las hormonas tiroideas; por ello parece pertinente referirnos en este capítulo a las variaciones que con respecto a estas hormonas, se aprecian en los diferentes estados fisiológicos o patológicos que se estudian en este trabajo.

1) Ciclo Menstrual.

Los acontecimientos del ciclo menstrual normal obedecen a interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el tracto genital. Aunque en el ciclo menstrual se diferencian cuatro etapas, debe destacarse que este es un fenómeno cíclico, en el cual cada fase pasa gradualmente a la siguiente.⁽¹³⁾

a) *Fase Menstrual.*- El primer día de la menstruación se cuenta como el comienzo del ciclo menstrual; en esta fase la capa funcional de la pared uterina se descama y expulsa durante la menstruación, lo que en condiciones normales ocurre con intervalos de 28 días y dura de tres a seis días.

b) *Fase Proliferativa (folicular).*- Esta etapa (día 6 a 12) coincide con el crecimiento de los folículos ováricos y es regulada principalmente por FSH que estimula la síntesis de estrógenos, secretados por la teca interna que rodea a los folículos.

c) *Fase Ovulatoria.*- Ocurre a la mitad del ciclo (día 13 - 15) en la cual por acción de FSH y LH, el folículo experimenta una etapa de aumento repentino de dimensiones. En especial los niveles de LH se incrementan durante esta fase, provocando la formación de una vesícula en el folículo, la cual se rompe expulsando, a través de la superficie del ovario, un ovocito junto con líquido folicular.

d) *Secretoría (luteínica)*.- Esta etapa (día 15 a 28) coincide con la formación y el crecimiento del cuerpo lúteo o amarillo, el cual secreta estrógenos y progesterona; esta última prepara al endometrio para una posible implantación del ovocito fecundado. Si no ocurre la fecundación el endometrio entra en la fase premenstrual.

Cambios en los esteroides ováricos durante el ciclo menstrual normal.

Estrógenos: En el periodo inicial del desarrollo folicular los niveles de estradiol son bajos. Más o menos una semana antes del pico de LH se produce un aumento lento primero y luego más rápido del estradiol que culmina un día antes del pico de LH o, con menos frecuencia, coincide con él. En el periodo ovulatorio tiene lugar una caída rápida de los niveles de estrógenos los cuales vuelven a subir durante la fase lútea, hasta un nivel máximo que se alcanza 5 a 8 días después de la ruptura del folículo.

Progestágenos: Durante la fase proliferativa y antes del pico de LH existen en la circulación solo pequeñas cantidades de progesterona de origen ovárico. Al ocurrir el pico de secreción de LH y la ovulación, comienza la síntesis de la progesterona, con un aumento inicial ligero, seguido por un aumento importante, paralelo al incremento de los estrógenos durante la fase lútea.

Andrógenos: En la mujer la androstendiona es secretada por el ovario y la suprarrenal; la contribución relativa de estas dos fuentes, cambia según el día y la fase del ciclo ovárico; así el folículo de Graaf en crecimiento secreta androstendiona durante el ciclo menstrual. Por otra parte los estudios de los efluentes venosos ováricos y suprarrenal revelan que el ovario secreta pequeñas cantidades de androstendiona y testosterona y la suprarrenal, androstendiona pero sobre todo dehidroepiandrosterona (DHEA). Sin embargo la mayor parte de la testosterona plasmática deriva del metabolismo periférico de la androstendiona, ya que las fluctuaciones durante el ciclo menstrual son mínimas.

La dihidrotestosterona es secretada solo en muy pequeña cantidad por el ovario, es la conversión periférica de androstendiona y testosterona en dihidrotestosterona, lo que origina la mayor parte de esta hormona en el plasma.

2) Ovarios Poliquísticos.

La enfermedad de ovarios poliquísticos, es un síndrome cuyo cuadro clínico es frecuentemente simulado por otros desórdenes endócrinos. Generalmente esta caracterizado por anovulación crónica, hiperandrogenismo y obesidad. El hirsutismo, uno de los signos físicos comúnmente asociados con hiperandrogenemia, resulta de la excesiva producción de andrógenos o del incremento de la acción de los andrógenos.⁽¹⁴⁾

En la forma característica del trastorno, el término denota el desarrollo de varios folículos primordiales que no llegan a desarrollarse totalmente, con alteraciones en la síntesis de estrógenos y falla de la ovulación, lo que se acompaña de un exceso de andrógenos, por los valores elevados de LH. La estimulación de los ovarios con LH por periodos prolongados, hace que aumente la secreción de andrógenos y se presenten en la glándula, cambios morfológicos característicos. El síndrome también se acompaña en algunas mujeres de cambios en la producción de andrógenos suprarrenales (DHEA-SO₄). La producción de estrógenos es variable, y en algunos casos elevada, capaz de producir hiperplasia endometrial o la aparición de un adenocarcinoma del endometrio.

Se desconoce con exactitud la causa de este síndrome, y es posible que su origen sea múltiple. Es importante que cada uno de los cambios funcionales que se manifiestan, tienden a perpetuar el ciclo de anomalías funcionales. Se ha sugerido que en algunas mujeres, el trastorno puede ser desencadenado por una producción excesiva de andrógenos suprarrenales en el momento de la pubertad o por un incremento inducido por estrés, en la secreción de los mismos; no obstante su origen parece ser fundamentalmente ovárico. La conversión periférica de andrógenos a estrógenos facilitaría la secreción de una mayor cantidad de LH, con lo cual aumentaría la producción de andrógenos por el ovario, alterándose la maduración folicular. Debe mencionarse que aunque la producción de andrógenos es variable y puede estar aumentada, rara vez alcanza las cifras que se observan en presencia de tumores ováricos funcionales.

3) Menopausia.

La menopausia comienza con la última menstruación inducida por la secreción endógena cíclica de hormonas ováricas. Normalmente aparece entre los 42 y los 50 años.⁽¹⁴⁾ El acontecimiento ovárico determinante de la menopausia es el cese de la función cíclica de los ovarios y por lo general los cambios funcionales pueden atribuirse al agotamiento de los folículos. En su inicio, la premenopausia se anuncia con una frecuencia decreciente de las ovulaciones, con menstruaciones irregulares o periodos variables de amenorrea, y una secreción de estrógenos cada vez menor. Se sabe que algunos años antes del cese final de la menstruación, ocurre una disminución de la respuesta del ovario a las gonadotropinas. En mujeres que están en la edad premenopáusica pero que todavía tienen periodos ovulatorios, las concentraciones medias de FSH y LH son más altas que en las mujeres jóvenes, en tanto que los niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo menstrual están disminuidos. En la parte inicial del período perimenopáusicico, el cambio característico es un aumento de FSH sin aumento concomitante de LH.

Después de la menopausia las concentraciones de estrógenos en la sangre venosa ovárica y en la sangre periférica declinan a niveles muy bajos y la extirpación de los ovarios no suele alterar la cantidad de estrógenos en la sangre, ni la excretada en la orina por las mujeres postmenopáusicas.

La declinación de la secreción estrogénica se acompaña de signos y síntomas de déficit hormonal en los órganos estrógeno-dependientes, incluyendo la hipófisis, útero, cuello uterino, vagina y mamas.

4) Tratamiento de la menopausia.

Como ya se mencionó, el cese de la maduración folicular cíclica, es el cambio básico de la función ovárica que acompaña a la menopausia fisiológica. Cabe considerar que durante el ciclo menstrual, un 60 % de la producción diaria de estrógenos es estradiol, que proviene de la secreción ovárica, mientras que el 40 %, es estrona, derivada de la aromatización de la androstendiona en los tejidos periféricos, secretada por los ovarios y las suprarrenales. Así, cuando la maduración del folículo cesa por cualquier motivo, la secreción ovárica de estradiol queda abolida, pero la producción

de estrona prácticamente no varía. Sin embargo su concentración es baja y es por ello que en pacientes con menopausia se administra terapia de sustitución hormonal, siendo las indicaciones principales para la hormonoterapia: combatir los bochornos y la vaginitis atrófica y evitar la osteoporosis en mujeres que tienen alto riesgo de desarrollarla.

Existe una gran variedad de preparados estrogénicos, los más usados son etinil estradiol y los estrógenos conjugados. Es importante, al administrar la terapia, evitar efectos sistémicos, así como el sangrado por supresión. Se debe señalar que hasta las dosis de apenas 0,325 mg diarios de estrógenos conjugados pueden producir efectos sistémicos, tales como alteración en las concentraciones de algunas proteínas transportadoras (CBG) y modificaciones importantes en los lípidos.(11)

5) Cambios endocrinológicos del embarazo.

Las alteraciones endocrinas que acompañan al embarazo, figuran entre las más notables que se registran en la fisiología y fisiopatología de los mamíferos. Se ha visto que el ovario materno controla los estadios iniciales del embarazo, pero posteriormente pasa a ocupar un papel secundario dentro de la gestación al desarrollarse la placenta. Los cambios que se observan en las hormonas maternas circulantes, son consecuencia de las grandes cantidades de estrógenos y progesterona que se producen durante el embarazo.

La producción hormonal del cuerpo lúteo o cuerpo amarillo, parece ser la directamente responsable de mantener la gestación durante las primeras 10-12 semanas, posteriormente, una vez que se establece la función placentaria, ésta desempeña el principal papel en cuanto a la esteroidogénesis, relegando el sistema endocrino materno a un plano prácticamente complementario. En lo anterior, va implícita la producción de grandes cantidades de estrógenos y progesterona que indudablemente son necesarias para el mantenimiento del embarazo.

Se puede decir que la interrelación hormonal entre el feto y la placenta prácticamente se inicia con la producción de esteroides por ello se ha establecido el concepto de una "unidad funcional feto-placentaria" que durante el embarazo produce grandes cantidades de hormonas

esteroides, las cuales son sintetizadas en un esfuerzo colaborado entre la madre, el feto y la placenta. Las hormonas esteroides producidas por la placenta pasan directamente a la circulación e influyen en las funciones endocrinas tanto de la madre como del feto. Desde hace mucho tiempo se sabe que durante el embarazo se produce un aumento muy importante en la excreción urinaria de esteroides por la madre; compuestos como el pregnadiol y el estriol principales metabolitos urinarios de progesterona y estradiol respectivamente, sufren incrementos hasta del 200 % en comparación con los valores encontrados fuera del embarazo.⁽¹⁵⁾

Hasta hace poco se pensaba que tales esteroides se sintetizaban íntegramente en la placenta, sin embargo, la placenta no es capaz de realizar síntesis *de novo*, a partir de precursores no esteroides, como es el acetato; requiere compuestos previamente formados por la madre o por el feto. Lo anterior significa que en la unidad feto-placentaria existen dos sistemas incompletos y complementarios de esteroidogénesis, ya que las enzimas que tienen poca actividad o están ausentes en el feto, se encuentran muy activas en la placenta y viceversa, de tal manera que se requiere la integración de ambos para que se lleve a cabo la síntesis de los esteroides.

La unidad fetoplacentaria produce fundamentalmente dos tipos de esteroides: 1) "neutros", y 2) estrógenos.

Síntesis de esteroides "neutros". La progesterona es el compuesto que se produce en mayor cantidad en la placenta; para su síntesis es necesaria la presencia de precursores hormonales maternos, en particular el colesterol, ya que la placenta es incapaz de formar progesterona a partir de acetato. La progesterona es a su vez aprovechada por el feto, como principal precursor para la biosíntesis de corticoesteroides, mediante reacciones de hidroxilación que se llevan a cabo en las suprarrenales fetales.

La unidad feto-placentaria también tiene una producción importante de andrógenos y ésta se realiza de una manera muy peculiar. La suprarrenal fetal sintetiza dehidroepiandrosterona a partir de la pregnenolona que le llega de la placenta, y la dehidroepiandrosterona así formada, pasa a su vez a la placenta en donde sirve como precursor de andrógenos, como la androstenediona y la testosterona.

Síntesis de estrógenos. No obstante que en la placenta se encuentran grandes cantidades de

estrógenos, tal órgano es incapaz de sintetizarlos *de novo* y por lo tanto, depende tanto del feto como de la madre para que le proporcionen los precursores androgénicos necesarios, a partir de los cuales produce estrógenos. En esta forma el estriol, que es el estrógeno más abundante durante el embarazo, se sintetiza a través de una serie de reacciones enzimáticas en las cuales se involucran: la suprarrenal y el hígado fetal y la placenta.

Los estrógenos y la progesterona son necesarios para los siguientes eventos:

- a.- Preparación del endometrio para la nidación del huevo fecundado y mantenimiento del implante.
- b.- Control de las funciones hipofisarias y ováricas maternas.
- c.- La adaptación metabólica materna.
- d.- La preparación para la lactancia.
- e.- Modulación del crecimiento uterino, acomodación, tono miometrial y contractilidad.
- f.- Participación en el mecanismo del trabajo de parto.

6) Función testicular e hipogonadismo en el hombre.

Los testículos poseen dos componentes importantes, 1) las células de Leydig o células intersticiales, que constituyen el principal componente endócrino, siendo el producto principal de su secreción la testosterona. 2) los túbulos seminíferos que se encargan de la producción de los espermatozoides. Ambos componentes testiculares guardan estrecha relación y requieren que el eje hipotálamo-hipófisis-testículo esté intacto, para iniciar y conservar su función. Además, se requieren varias estructuras accesorias de los genitales para la maduración funcional y el transporte de los espermatozoides. Por lo anterior, los trastornos de los testículos, hipotálamo, hipófisis o de los órganos sexuales secundarios pueden ocasionar anomalías de la producción de andrógenos, o de los gametos y en consecuencia hipogonadismo y esterilidad, o una combinación de ambos problemas.

Esteroides gonadales.- Los tres esteroides de importancia básica en la función reproductora del hombre son la testosterona, la dihidrotestosterona y el estradiol. El andrógeno más importante es la testosterona, y más de 95 % es secretada por las células de Leydig. Además de la testosterona, los testículos secretan pequeñas cantidades de dihidrotestosterona, un andrógeno muy potente, y

los andrógenos débiles dehidroepiandrosterona y androstendiona.⁽¹⁶⁾ Las células de Leydig también secretan pequeñas cantidades de estradiol, estrona, pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona. Sin embargo la testosterona no actúa directamente, intracelularmente es convertida por la acción de la 5 α -reductasa a 5 α -Dihidrotestosterona (DHT), esteroide que unido a sus receptores nucleares específicos, es la responsable de los efectos de la testosterona

Eje hipotálamo-hipófisis-células de Leydig. - El hipotálamo sintetiza un decapeptido, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y lo secreta de una manera pulsátil a la sangre de la red portal hipotálamo-hipofisaria. En la adenohipófisis, la GnRH actuando sobre el gonadotropo (célula productora de gonadotropinas), estimula la liberación de hormona luteinizante (LH) y en menor magnitud, de la FSH a la circulación general. La LH es captada por las células de Leydig, fenómeno que culmina con la secreción de andrógenos.

Eje hipotálamo-hipófisis-túbulo seminífero. - Como ya se mencionó las células del gonadotropo estimuladas por GnRH, secretan FSH a la circulación general. Esta hormona glucoproteica, se une en el testículo a receptores específicos en las células de Sertoli y estimula la síntesis de los espermatozoides y la producción de una proteína ligadora de andrógenos (ABP). Para que comience la espermatogénesis, se necesita FSH, sin embargo, la maduración completa de los espermatozoides requiere no sólo del efecto de la FSH, sino también de la testosterona.

Evaluación de la función gonadal del hombre. - El cuadro clínico de individuos con deficiencia en la producción o en la acción de la testosterona, depende generalmente de la edad a la que inicia el hipogonadismo. Cuando se presenta en la pubertad, no existe un desarrollo adecuado de los órganos sexuales secundarios y las características sexuales masculinas, mientras que si la deficiencia de testosterona se presenta después de la pubertad, el individuo se masculiniza normalmente, pero puede manifestar disminución de la libido, impotencia, desgano y esterilidad.

Generalmente un análisis del semen excluye la disfunción gonadal, sin embargo, no basta un solo análisis anormal del semen, para hacer el diagnóstico de trastorno de la función testicular. Este estudio debe ser complementado, por el análisis de las gonadotropinas hipofisarias (FSH, LH),

prolactina y los esteroides gonadales (T y E₂). Todas estas hormonas pueden medirse por radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis de andrógenos y estrógenos mide por lo general la concentración sérica total de esteroides; esto es, la suma de la hormona libre, biológicamente activa y la fracción ligada a proteínas. A pesar de que en muchas circunstancias no se necesita medir la cantidad real de las hormonas esteroides libres, en algunas situaciones es importante, sobre todo cuando se sospechan alteraciones en la concentración de las proteínas ligadoras.

Prueba de estimulación con gonadotropina coriónica.- La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glucoproteica con semejanza estructural y acciones biológicas semejantes a las de la LH. Cuando se inyecta hCG, esta hormona se une a los receptores de LH en las células de Leydig y estimula la síntesis y secreción de testosterona y otros esteroides testiculares. Por esto, es posible valorar de manera directa, la actividad funcional de las células de Leydig por inyección intramuscular de hCG (5, 000 UI). La respuesta normal comprende la duplicación de la concentración de testosterona a las 72 horas de la inyección. Los pacientes con enfermedad gonadal primaria mostrarán una menor respuesta después de la administración de hCG, en tanto que aquellos con insuficiencia de las células de Leydig, como consecuencia de enfermedad hipofisaria o hipotalámica, tendrán una respuesta cualitativamente normal.⁽¹⁶⁾

7) Glándula tiroides.

Entre las glándulas endocrinas, el tiroides es singular por tener dos funciones importantes: 1) Mantener una gran reserva hormonal y 2) La elevada captación de yoduro, necesaria para la síntesis de las hormonas, de tal manera, que la ingestión adecuada de yoduro es el requisito básico para la síntesis normal de las hormonas por el tiroides.⁽¹⁶⁾ Las únicas dos vías importantes para la depuración del yoduro del líquido extracelular, son los riñones y el tiroides. El tiroides puede regular la cantidad neta de yoduro que capta del líquido extracelular, y toma sólo lo que necesita para la síntesis de las hormonas tiroideas.

La unidad funcional básica del tiroides es el folículo tiroideo. El yoduro inorgánico en el interior

de la célula tiroidea, se oxida con rapidez para después ser incorporado a la tiroglobulina, proteína precursora de las hormonas tiroideas. La tiroglobulina es almacenada en sitios extracelulares, en el interior del foliculo; por tal razón, como requisito para la secreción de hormonas tiroideas a la sangre, la tiroglobulina debe ser sometida a proteólisis, siendo la tiroxina (T_4) y en menor grado la triyodotironina (T_3) los productos principales del proceso proteolítico que pasan a la sangre.

La síntesis y secreción de las hormonas tiroideas es regulada por mecanismos extratiroideos (tirotropina) e intratiroideos (autorreguladores). La tirotropina u hormona estimulante del tiroides (TSH) es una glicoproteína secretada por el tirotripo (célula especializada de la adenohipófisis) que ejerce diversos efectos en el tiroides, cuyo resultado neto es el incremento en la secreción de las hormonas tiroideas.

Trastornos de la glándula tiroides.

Los pacientes con enfermedad de la tiroides, por lo regular, presentan: 1) Agrandamiento de la glándula, o bocio; 2) Síntomas de deficiencia tiroidea o hipotiroidismo; 3) Síntomas de exceso de hormonas tiroideas o hipertiroidismo.⁽¹⁶⁾

1) Hipotiroidismo.

El hipotiroidismo es un síndrome clínico resultado de la deficiencia de hormonas tiroideas, la cual, a su vez, origina una disminución general del metabolismo.

El hipotiroidismo se puede clasificar en diversas formas. Puede ser primario por insuficiencia del tiroides, secundario por deficiencia de la TSH producida por la hipófisis, o terciario por deficiencia hipotalámica de hormona liberadora de tirotropina (TRH); o puede haber una anomalía en los receptores de tiroxina en las células y por lo tanto insensibilidad a esta hormona.

La frecuencia de las diversas causas de hipotiroidismo varía con los factores geográficos o ambientales, las características genéticas de la población, y la distribución de los grupos por edades. La deficiencia de hormonas tiroideas, afecta todos los tejidos corporales, de tal forma que los síntomas son múltiples.

En la forma primaria del hipotiroidismo se tienen las siguientes características: disminución de T_4 sérica y de la T_4 libre con un incremento notable de TSH en suero. Los valores de T_3 en suero son variables, y pueden estar dentro de límites normales. En cambio en el hipotiroidismo secundario o terciario tanto las hormonas esteroides (T_3 , T_4 , T_4L) como la TSH se encuentran disminuidas

El hipotiroidismo produce un menor metabolismo periférico de estrógenos, con alteración en la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) con lo cual surgen ciclos anovulatorios e infertilidad.

2.- Hipertiroidismo.

El hipertiroidismo es un síndrome clínico resultado de la sobreproducción sostenida de las hormonas del tiroides. Este síndrome puede ser causado por diferentes entidades clínicas como son: hipersecreción de TSH, enfermedad de Graves, hipertiroidismo inducido por yodo, bocio multinodular tóxico o un adenoma tóxico; y también por la presencia de un tumor trofoblástico o un coriocarcinoma.

El aumento simultáneo de las concentraciones séricas de T_4 y T_3 es el patrón usual en pacientes con hipertiroidismo, no importando el origen de este. Las concentraciones séricas de T_4 abarcan desde valores que están apenas elevados en pacientes con enfermedad leve, hasta cifras mayores en los casos más severos. Las concentraciones de T_3 están aumentadas casi siempre, en ocasiones hasta niveles muy superiores al valor medio normal. El aumento de la concentración de T_3 es proporcionalmente mayor que el aumento de la T_4 sérica, de modo que la relación T_3/T_4 en el suero casi siempre es alta. Esto se debe a que en el hipertiroidismo la T_3 sérica no sólo refleja su producción periférica a partir de T_4 , sino también la hipersecreción de T_3 por la propia glándula tiroides. En consecuencia, la concentración sérica de T_3 puede ser alta y no la de T_4 .

Enfermedad de Graves.

Las anomalías tiroideas características de la enfermedad de Graves se deben a la acción sobre la glándula, de inmunoglobulinas de la clase Ig G, anticuerpos que se producen contra componentes de la tiroides como la tiroglobulina (anticuerpos antitiroglobulina) o contra ciertas

regiones del tiroides (anticuerpos microsomaes) o de la membrana celular que comprende el receptor para TSH. Se presume que estas Inmunoglobulinas se fijan a sus regiones antigénicas complementarias en la membrana plasmática y activan la adenil ciclasa, con lo cual inician una cadena de reacciones que conducen al crecimiento y aumento de la vascularidad de la glándula tiroides y a la hipersecreción de hormonas.

Bocio multinodular tóxico.

El bocio multinodular tóxico es un trastorno en el cual también ocurre hipertiroidismo. No se sabe con certeza si representa una enfermedad o si es la expresión clínica de uno o varios factores patogénicos. La sobreproducción de hormona tiroidea en el bocio multinodular tóxico suele ser leve en comparación con la enfermedad de Graves y las concentraciones séricas de T_4 y T_3 a menudo sólo están aumentadas en forma marginal.

Adenoma tóxico.

Una tercera forma de hipertiroidismo, mucho menos común, es la que producen los adenomas o nódulos de la glándula tiroides. Por definición, el adenoma es autónomo, por que es capaz de funcionar sin la estimulación de la TSH y por otra parte en la sangre no se encuentran estimuladores tiroideos anormales. Al principio la lesión puede presentarse como un pequeño nódulo o no palpase, pero en ambos casos se le detecta en el centelleograma, como una área localizada de captación aumentada de radioyodo. A medida que el tumor crece, asume una mayor participación en la función glandular, de modo que el tejido remanente se suprime cada vez más, hasta que sobreviene la atrofia y la supresión completa del resto de la glándula. Algunos adenomas de este tipo secretan con preferencia T_3 y otros, además de las hormonas tiroideas normales, secretan una proteína yodada que se puede medir como yodo proteico (PBI).

Hipertiroidismo en la enfermedad trofoblástica.

Muchas veces la hiperfunción tiroidea se presenta en pacientes con una mola hidatidiforme, un

coriocarcinoma o un carcinoma metastásico de testículo. Estas neoplasias en particular la mola hidatidiforme, elaboran un estimulador tiroideo semejante a la TSH hipofisaria. Algunas pacientes se presentan con tirotoxicosis, sin embargo en la mayoría no hay manifestaciones clínicas importantes y tampoco bocio, a pesar de las frecuentes evidencias de laboratorio de un severo estado hipertiroideo. Los hallazgos comprenden concentraciones séricas altas de T_4 y T_3 (total y libre) y abolición de la respuesta de TSH a TRH.

Hipersecreción de TSH.

En raros casos ocurre hipertiroidismo por hipersecreción de TSH, que puede ser debida a dos factores causales: un adenoma hipofisario secretor de TSH o por una secreción inapropiada de TSH debido a: 1) resistencia hipofisaria a las hormonas tiroideas, 2) secreción aumentada de TRH 3) umbral elevado para el control de la retroalimentación, caso en el que las concentraciones séricas de TSH son inapropiadamente altas, en relación con las concentraciones séricas de T_4 y T_3 . En la variedad adenomatosa puede haber una masa o tumor en la región de la hipófisis (THSoma) que se caracteriza por la producción elevada de subunidades α libres de TSH, además la concentración sérica de TSH no aumenta tras la administración de TRH. En cambio en pacientes con hipersecreción no adenomatosa de TSH, no existe elevación de las subunidades α en la sangre y la respuesta a la TRH suele ser normal.

Hipertiroidismo inducido por yodo.

La administración de yodo suplementario a personas con bocio endémico (por carencia de yodo) puede ocasionar sobreproducción de hormonas tiroideas. A veces en estos pacientes la concentración sérica de T_3 es normal, aunque la de T_4 libre y total está aumentada.

Aunque el razonamiento lógico dicta que el fenómeno de hipertiroidismo inducido por yodo sólo puede ocurrir cuando la tiroides está fuera del control regulador normal, se han descrito varios pacientes con hipertiroidismo inducido por yodo, en los cuales la función tiroidea era normal y supresible después de suspender el yodo, restableciéndose el estado eutiroideo. No se conoce el mecanismo por el cual el yodo induce tirotoxicosis en estos casos.

CAPITULO III.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

1.- MATERIAL DE LABORATORIO.

a) Equipo.

Columna para cromatografía (48 x 1.5 cm.).

Colector de fracciones (Gilson).

Centrífuga refrigerada (Sorvall RC-3).

Baño maría (Dubnoff Metabolic Shaking Incubator Precision Sc Co).

Balanza analítica (Chyo Jupiter C3-200).

Potenciómetro (Beckman Φ 40 pH meter).

Contador de centelleo (Packard Cobra Auto-gamma).

Parrilla de agitación magnética (Sybron/Termolyne).

Agitador vortex (Super mixer Lab-Line instruments Inc.).

Balanza granataria (Harvard trip balance Ohaus).

Espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 4A UV/VIS).

b) Material Diverso.

Pipetas serológicas 1,2,5 y 10 ml

Vasos de precipitados 50,100,400 y 1000 ml.

Matraces aforados 50,100 250,500 y 1000 ml.

Micropipetas 50,100 y 200 μ l.

Cronómetro.

Gradillas metálicas y de acrílico.

Tubos de plástico (12 x 75 mm.)

Microjeringas 500 μ l.

Tubos de ensaye (12 x 75)

Pipetores de 5 ml (Repipet II Lab Industries Inc.)

Soporte universal.

c) Reactivos.

Sephadex G-150 tamaño de partícula 40-120 μm (SIGMA Chemical Company).

Albúmina bovina (SIGMA Chemical Company).

Cloruro de sodio.

Fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de sodio.

Azida de sodio.

Metaperyodato de sodio.

Acido fosfórico.

Arsenito de sodio.

Sulfato de sodio.

Acido 2-tiobarbitúrico.

Acido silático.

Acido clorhídrico.

Etanol.

Acido sulfúrico.

Marcadores de peso molecular para cromatografía en columna (SIGMA Chemical CO.).

Citocromo C (PM 12,400)

Anhidrasa carbónica (PM 29,000)

Ovoalbúmina (PM 45,000)

Albúmina bovina (PM 66,000)

Fosforilasa B (PM 97,400)

Deshidrogenasa Alcohólica (PM 150,000)

Azul dextrán (PM 2,000,000)

Estuches para determinar SHBG por RIA (Diagnostic Systems Laboratories.)

2.- MATERIAL CLINICO.

1) Varones:

Controles: 4 varones normales (27-44 años) con niveles hormonales normales.

15 pacientes masculinos con hipogonadismo (25-68 años), a los que se les realizó una prueba de estimulación con hCG (basales y 72 horas post-estimulación.)

2) Mujeres.

15 mujeres normales con ciclo menstrual normal (20-45 años.)

a) Fase Ovulatoria (día 13-15).

b) Fase Lutea (día 20-22).

10 pacientes con ovarios poliquísticos (21-42 años).

15 mujeres menopáusicas sin tratamiento (45-68 años).

15 mujeres menopáusicas con terapia sustitutiva con estrógenos (45-60 años).

15 mujeres embarazadas (1 er y 3 er trimestre).

3) Pacientes con alteraciones de la glándula tiroides.

a) 15 pacientes con hipotiroidismo.

b) 15 pacientes con hipertiroidismo.

3.-METODOS

A) Obtención y conservación de muestras.

La sangre se obtuvo por punción venosa mediante un sistema vacutainer, efectuando la punción entre las 7 y 8:30 horas, estando el paciente en ayunas, extrayendo entre 15 y 20 ml de sangre. Esta se dejó coagular, centrifugándose una vez separado el suero, a 1500 rpm durante 5 minutos. El suero obtenido se guardó en alícuotas de 500 μ l, en tubos de plástico con tapón, debidamente etiquetados, almacenándose a -20 °C hasta el momento de utilizarse.

B) Determinación de SHBG por radioinmunoanálisis (RIA).

Ensayos de unión competitiva. Radioinmunoanálisis.

Los ensayos de unión competitiva son un grupo de métodos analíticos *in vitro*, basados en la unión reversible no covalente, de una molécula pequeña o ligando con una proteína de unión específica.⁽¹⁷⁾

Las técnicas de radioinmunoanálisis y el análisis de radiorreceptores se basan en la evaluación del grado de unión de una sustancia radiomarcada, con un anticuerpo o una proteína receptora; donde la proteína a cuantificar compete por la unión con la marca radiactiva ⁽¹⁸⁾. Todos los radioinmunoensayos son métodos de unión de proteínas.

Un requisito para la aplicación analítica de anticuerpos al RIA es que las moléculas radiactivas Sx* y las no marcadas del compuesto Sx no difieran en sus propiedades inmunoquímicas o en su capacidad para unirse al anticuerpo.

La cantidad real de compuesto Sx en la muestra puede ser calculada por comparación con una curva estandar elaborada con cantidades conocidas de Sx.

La mayoría de los ensayos radioinmunológicos comprenden los siguientes pasos: ⁽¹⁹⁾

- 1.- Extracción del compuesto Sx de la orina o del suero. En la actualidad este paso es necesario solamente para algunas hormonas ya que la mayoría pueden ser estimadas directamente sin extracción.
- 2.- Adición de una cantidad definida de moléculas radiactivas del compuesto Sx*.

- 3.- Adición de una cantidad definida del anticuerpo específico contra el compuesto Sx.
- 4.- Incubación.
- 5.- Separación de las moléculas libres del compuesto Sx y de las unidas al anticuerpo.
- 6.- Medición de la porción libre de las moléculas radiactivas o de la unida al anticuerpo y cálculo del porcentaje de unión (% B).

La determinación de SHBG por RIA se efectuó en cada una de las muestras de suero, siguiendo las indicaciones del instructivo suministrado por los fabricantes (SHBG Catalogo DEL 6300 de Diagnostic Systems Laboratories Inc. Webster Texas), al cual se le hicieron algunas modificaciones para incrementar la sensibilidad (20) y para mejorar los parámetros de control de calidad. Tales modificaciones consistieron en incrementar el tiempo de incubación de una a tres horas, utilizar concentraciones de estándares para la curva de calibración de 3.9 nM/L a 62.5 nM/L (obtenidas por dilución con PBS pH 7.4 de los estándares proporcionados en el kit) en lugar de las concentraciones suministradas en el estuche (10 nM/L a 250 nM/L) y diluir el anticuerpo proporcionado 1:2 con PBS pH 7.4 (para mayor información de la estandarización del método consultar el anexo I).

DETERMINACION DE LA SHBG.

PROTOCOLO DEL ENSAYO

TUBO	CONTENIDO.	S/S CONTROL O MUESTRA (μ L)	SHBG- ¹²⁵ (μ L)	ANTI-SHBG (μ L)	REACTIVO PRECIPITANTE (ml)
1, 2	CT	—	500	—	—
3, 4	NSB	150 *	500	—	1
5, 6	Bo (0 nM/ L)	50	500	100	1
7, 8	St A (3.9 nM/L)	50	500	100	1
9, 10	St B (7.81 nM/L)	50	500	100	1
11, 12	St C (15.62 nM/L)	50	500	100	1
13, 14	St D (31.25 nM/L)	50	500	100	1
15, 16	St E (62.5 nM/L)	50	500	100	1
17, 18	SC _B	50	500	100	1
19, 20	SC _M	50	500	100	1
21, 22	SC _A	50	500	100	1
23, 24	MUESTRA 1	50	500	100	1
25, 26	MUESTRA 2	50	500	100	1

ETC.

* 50 μ l de solución NSB + 100 μ l de agua deionizada.

CT = Cuentas Totales.

Bo = Unión Máxima o porcentaje de unión del ensayo.

NSB = Unión no específica.

St = Estándares.

Sc = Suero Control: Bajo, Medio y Alto.

Técnica:

- 1.- Marcar los tubos del ensayo del 1-100.
- 2.- Adicionar 50 μ l de los estándares, controles o muestras, a los tubos apropiados. A los tubos 3 y 4 (NSB) adicionar 50 μ l de solución NSB y 100 μ l de agua deionizada.
- 3.- Adicionar 500 μ l de **SHBG I 125** a todos los tubos.
- 4.- Adicionar 100 μ l de **anti-SHBG** a todos los tubos, excepto a los de cuentas totales (CT) y los de la unión no específica (NSB).
- 5.- Agitar los tubos.
- 6.- Incubar por 3 horas a temperatura ambiente.
- 7.- Adicionar 1 ml de reactivo precipitante a todos los tubos, excepto a los de cuentas totales (CT).
- 8.- Agitar todos los tubos.
- 9.- Incubar por 15' a temperatura ambiente.
- 10.- Centrifugar todos los tubos (excepto los de cuentas totales) por 15-20' a 3000 r.p.m., en una centrífuga refrigerada .
- 11.- Aspirar o decantar los tubos y secar las gotas remanentes.
- 12.- Llevar los tubos a un detector de radiaciones gamma y contar cada uno de ellos durante un minuto.
- 13.- Relacionar las cuentas por minuto (cpm) de los problemas a la curva de calibración que se obtiene a partir de los estándares (3.9-62.5 nM/L de concentración).

C) Cromatografía en Sephadex G-150.

1.- Empacado de la columna

Se colocan 6 gramos de Sephadex en un vaso de precipitado de 400 ml. adicionando agua en proporción 1:10 para hidratar el gel, cambiando el agua cada 15-30'. 3 ó 4 veces; después se deja reposar 12-24 horas. Una vez hinchado el Sephadex se sustituye el agua destilada por buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4 lavando el Sephadex dos veces más con buffer. Después se procede a

empacar la columna manteniendo el Sephadex en un baño maría a 45°C durante 15' a fin de eliminar las burbujas agregando poco a poco el gel. Una vez llena la columna hasta el nivel deseado, se hace pasar buffer de fosfatos a través de la misma y se deja correr con el fin de compactar el Sephadex, finalmente la columna se instala en el cuarto frío y se deja estabilizar durante 72 horas.

2.- Calibración de la columna.

Dado que la filtración en gel es un procedimiento en el que la separación de las moléculas se efectúa en función de su peso molecular (PM) es necesario calibrar la columna con marcadores o proteínas de PM conocido, y además determinar el volumen vacío de la columna (V_0) y el volumen total del lecho (V_t) (21). Para ello el flujo de la columna se regula y estandariza a una velocidad de 9 ml/hora efectuando el corrimiento contra la gravedad a 4-8°C, después se procede a cromatografiar 1.0 ml de una solución de azul dextrán con el fin de establecer el volumen de vaciado (V_0) que es el volumen de líquido que permanece en el espacio intersticial, entre los granos del lecho. Una vez que ha pasado el colorante, se inicia la elución con el buffer de fosfatos eliminando los primeros 0.5 ml, recolectando después 50 fracciones de 1.0 ml, las cuales se llevan a un espectrofotómetro para determinar su concentración y conocer el volumen en el que eluyó la mayor proporción del colorante, el cual corresponde al V_0 . Después se cromatografía SHBG I 125 para establecer el volumen de elución de la globulina (V_e) y el V_t por el volumen de elución del I 125 libre. Estos datos V_0 y V_t servirán para calcular posteriormente la constante de partición (K_{av}) de cada una de las moléculas separadas en la cromatografía.

Posteriormente se recubre la columna con albúmina bovina (BSA) haciendo pasar 1 ml de BSA al 2.5 % seguida de 20 ml de buffer, con lo cual se evita que las proteínas de los marcadores o de la muestra de suero se adhieran a las paredes de vidrio. Después se hace pasar 1 mg de cada uno de los marcadores de PM (12, 400 - 150, 000) diluidos en 1 ml de buffer de fosfatos se eluye y recolectan las fracciones en la forma indicada anteriormente y se determina su volumen de elución por la absorbancia de cada una de las fracciones a 280 nm. Una vez conocido el V_e de cada molécula se calcula el valor de la relación V_e/V_0 para cada uno de los marcadores. Finalmente se grafica dicho

valor contra el respectivo PM, con el fin de obtener la curva de calibración de pesos moleculares, la que se utilizará posteriormente para conocer el PM de las isohormonas separadas por la cromatografía.

3.- Cromatografía de las muestras de suero.

Se hacen pasar 2.0 ml de los sueros de los pacientes, a través de la columna, desechando el primer ml del eluado, colectando posteriormente 50 fracciones de 1.0 ml, las cuales se reciben en tubos de plástico que contienen 0.2 ml de albúmina bovina al 2.5 %. Todas las fracciones se guardan en el congelador a -20°C hasta el momento de medir su concentración de SHBG por radioinmunoanálisis.

D) Determinación de ácido siálico.

Las glicoproteínas resultan de la asociación covalente de carbohidratos con proteínas. La glicosilación de las proteínas representa uno de los más importantes eventos post-transcripcionales debido a la universalidad del fenómeno.⁽²²⁾ Las glicoproteínas varían en el contenido de carbohidrato de <1 % a > 90 % en peso. Estas se encuentran en todas las formas de vida y tienen funciones que abarcan todo el espectro de actividad de las proteínas, incluyendo de enzimas, proteínas transportadoras, receptores, hormonas y proteínas estructurales.⁽²³⁾

Como ya se señaló anteriormente la SHBG es una glicoproteína con un contenido variable de carbohidratos (entre 18 - 32 %) siendo aproximadamente la tercera parte de ellos ácido siálico.^(2) En términos fisiológicos la presencia de residuos de ácido siálico es importante porque parecen aumentar la vida media funcional de las glicoproteínas y con ello su actividad biológica de ahí el interés por su determinación.

El término " ácidos siálicos " es el nombre de un grupo de ácidos nonalosamínicos acilados, muy abundantes en la naturaleza. La estructura básica no sustituida $C_9H_{17}O_9N$ es común para todos. Los ácidos siálicos pueden ser identificados por métodos químicos y fisicoquímicos. De los métodos químicos, son evaluados el análisis elemental de nitrógeno, acetilo total y O acetilo, además del análisis de ácido glicólico y la oxidación con peryodato. Los ácidos siálicos han sido estimados

también por muchos métodos colorimétricos, tales como: el del orcinol, difenilamina, resorcinol, el método directo de Erlich y el del ácido tiobarbitúrico.

Un método muy sensible y bastante específico para el análisis de ácido siálico, es el método del ácido tiobarbitúrico, descrito por Warren.⁽²⁴⁾ En la literatura se ha encontrado que existen algunos factores que afectan el ensayo (25,26) como son: a) la intensificación de color del cromóforo por adición de disolventes orgánicos como el etanol, b) aumento en la formación del color con el incremento de concentración del periodato, c) variación en la intensidad del color por efecto de la temperatura. Todos estos factores fueron tomados en cuenta en este trabajo para modificar el método original de Warren, y estandarizar la técnica con objeto de obtener la sensibilidad necesaria para cuantificar el ácido siálico no solo en los sueros de los pacientes, sino también en cada una de las fracciones de las cromatografías (para mayor información de la modificación del método consultar el anexo 2).

El procedimiento modificado y ya estandarizado se describe a continuación:

1) Hidrólisis de las muestras.

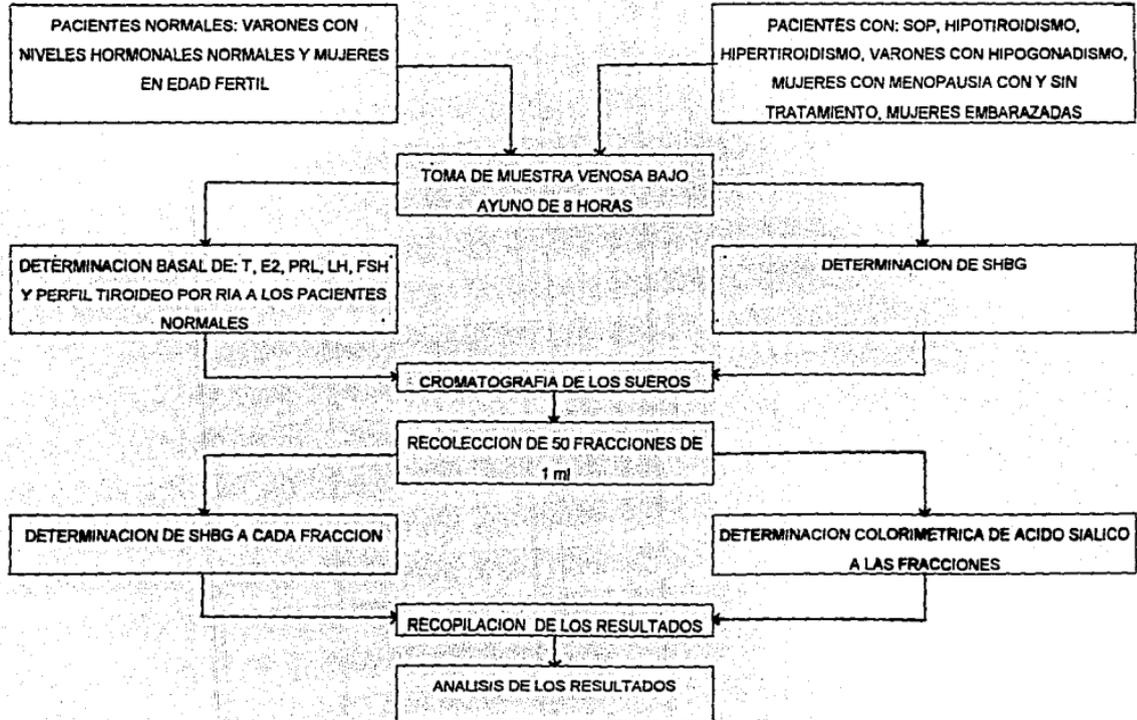
- 1.1.- Colocar en tubos de vidrio limpios (12 x 75 mm) 2.25 ml de agua destilada.
- 1.2.- Adicionar 0.05 ml de H_2SO_4 1 N.
- 1.3.- Agregar 200 μ l del suero o de las fracciones de las cromatografías. Agitar.
- 1.4.- Colocar los tubos en un baño en ebullición durante 60'.

2) Reacción de color.

- 2.1.- En tubos de ensayo (12 x 75 mm) agregar los siguientes reactivos: 200 μ l de la muestra hidrolizada.
- 2.2.- Adicionar 50 μ l de metaperiodato de sodio 0.2 M en ácido fosfórico 9M. Mezclar.
- 2.3.- Reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Agitar.
- 2.4.- Agregar 500 μ l de arsenito de sodio al 10 % en solución de Na_2SO_4 0.5 M- H_2SO_4 0.1 N.
- 2.5.- Agitar vigorosamente.
- 2.6.- Reposar 2 minutos. Agitar.

- 2.7.- Adicionar 1,5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.6 % en solución de Na_2SO_4 0.5 M.
- 2.8.- Mezclar por inversión.
- 2.9.- Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo durante 60'.
- 2.10.- Enfriar los tubos al chorro de agua.
- 2.11.- Agregar 2 ml de HCl al 5 % en etanol.
- 2.12.- Colocar los tubos en un baño de agua a 37°C por 15'.
- 2.13.- Agitar vigorosamente.
- 2.14.- Centrifugar a 3500 rpm durante 15'.
- 2.15.- Decantar y leer en el espectrofotómetro a 550 nm contra blanco de agua.
- 2.16.- La concentración de ácido siálico se calcula por interpolación de la absorbancia de cada una de las muestras o de las fracciones en una curva estandar realizadas con concentraciones conocidas de ácido siálico (1.25 a 10 $\mu\text{g/ml}$).

DIAGRAMA DE BLOQUES



CAPITULO IV

RESULTADOS

I.-ESTUDIO HORMONAL Y CONCENTRACION DE LA SHBG.

A) En el hombre.

Los resultados del estudio hormonal en los pacientes estudiados, así como la concentración de la SHBG, se muestran en la tabla 1, la cual presenta los valores obtenidos en los hombres normales en comparación con los encontrados en hombres con hipogonadismo (n=15). Se puede apreciar que en el grupo normal los valores de T y E_2 se encuentran dentro de las cifras de referencia para la población normal, en cambio en los hombres con hipogonadismo la concentración de T es más baja y la de E_2 y la relación E_2/T más elevada. La representación gráfica de estos valores se presenta en la figura 1.

La tabla 2 a su vez muestra la respuesta de las hormonas y de la SHBG a la prueba de estimulación con hCG, que se realizó en los hombres con hipogonadismo con objeto de evaluar la reserva testicular. Como puede verse la T y el E_2 casi duplicaron sus valores y la relación E_2/T también se incrementó, no así la concentración de la SHBG.

La respuesta a hCG en dos hombres con niveles normales de testosterona e hipogonadismo por "insensibilidad a andrógenos", se presenta en la tabla 3 en comparación con la respuesta de dos hombres normales. Se observa que la concentración de SHBG en los pacientes con resistencia a los andrógenos fué más elevada, que en los hombres con hipogonadismo de la tabla 2, pero tampoco, presentaron respuesta en la SHBG post-estimulación con hCG; mientras que en los hombres normales sí se incrementó la globulina (figura 2). La respuesta de T y E_2 se encontró también disminuida en relación a la respuesta normal (tabla 3).

B) En la mujer.

La tabla 4 indica la concentración de SHBG en las diferentes fases del ciclo menstrual normal de la mujer, en tanto que la tabla 4-A indica la concentración de hormonas y de la SHBG en el suero de mujeres, en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas, como son: el ciclo menstrual, la menopausia (pre y post-tratamiento con E_2) el embarazo y el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP). Como puede observarse, los valores de E_2 y de la SHBG fueron más bajos en las mujeres con SOP y en la menopausia, sobre todo en esta última. Sin embargo después del tratamiento sustitutivo con estrógenos las cifras de SHBG aumentaron, alcanzando valores más elevados que los encontrados en mujeres jóvenes durante el ciclo menstrual normal (figura 3).

En el embarazo los estrógenos y la SHBG se incrementaron notablemente, alcanzando la SHBG cifras 4 veces más elevadas que durante el ciclo menstrual (figura 4).

C) En pacientes con alteraciones de la función tiroidea.

En pacientes con alteraciones de la glándula tiroidea, también se encontraron modificaciones importantes en la concentración de la SHBG; en los casos de hipotiroidismo (pacientes del sexo femenino) los valores de la SHBG fueron 60 % más bajos que en la mujer normal, mientras que en los casos de hipertiroidismo (pacientes del sexo masculino) la concentración de la SHBG fue más elevada que en los hombres eutiroides (tabla 5, figura 5).

TABLA 1.- VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG EN EL HOMBRE

	EDAD AÑOS	SHBG nM/L	T ng/ml	E ₂ pg/ml	E ₂ /T	LH mUI/ml	FSH mUI/ml
NORMAL							
M ± DE	33	148.18 ± 52.84	7.08 ± 0.81	15.75 ± 3.33	2.24 ± 0.46	20.65 ± 1.55	10.75 ± 2.22
BANDA n= 4	27 - 44	95.34 - 201.02	6.27 - 7.89	12.42 - 19.08	1.77 - 2.70	19.10 - 22.20	8.53 - 12.97
HIPOGONADISMO							
M ± DE	40	131.87 ± 35.19	5.43 ± 1.37	28.95 ± 11.49	5.49 ± 2.25	18.08 ± 5.73	15.88 ± 10.21
BANDA n= 15	25 - 55	96.88 - 167.06	4.06 - 6.80	17.46 - 40.44	3.24 - 7.74	12.35 - 23.82	5.67 - 26.09

FIGURA 1
VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG EN EL HOMBRE

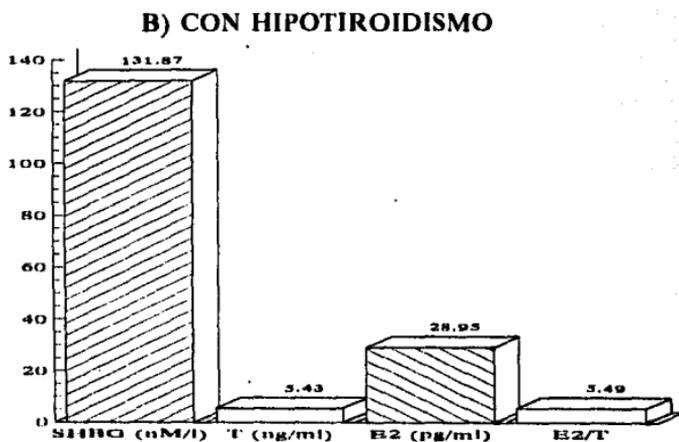
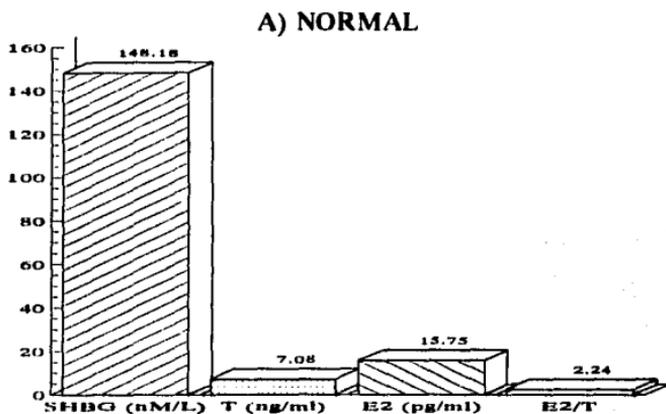


TABLA 2.-VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO

PRE- Y POST-TRATAMIENTO CON HCG

		SHBG (nM/L)	T (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	E ₂ /T	LH mUI/ml	FSH mUI/ml
PRE-	M ± DE	131.87 ± 35.19	5.43 ± 1.37	28.95 ± 11.49	5.49 ± 2.25	18.08 ± 5.73	15.88 ± 10.21
	n=15 BANDA	96.68 - 167.06	4.06 - 6.80	17.46 - 40.44	3.24 - 7.74	12.35 - 23.82	5.67 - 26.04
POST	M ± DE	131.67 ± 33.70	9.63 ± 2.95	67.53 ± 23.46	7.15 ± 2.24	—	—
	n=15 BANDA	97.97 - 165.37	6.68 - 12.58	44.07 - 90.99	4.91 - 9.39	—	—

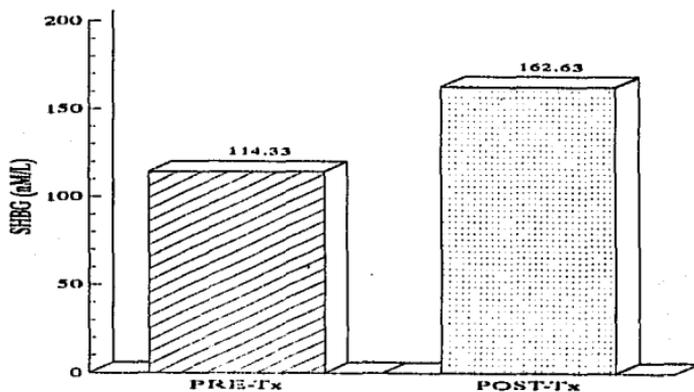
TABLA 3.-VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG EN DOS HOMBRES CON HIPOGONADISMO POR INSENSIBILIDAD A ANDROGENOS

PRE- Y POST-TRATAMIENTO CON HCG

		SHBG (nM/L)	T (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	E ₂ /T	LH mUI/ml	FSH mUI/ml
NORMALES n= 2	PRE-	114.33	6.55	16.95	2.56	12	19.45
	POST-	162.63	12.80	55.60	4.25	—	—
HIPOGONADISMO n= 2	PRE-	287.64	7.60	26.73	3.38	44.6	28
	POST-	280.73	9.18	38.73	3.57	—	—

FIGURA 2
CONCENTRACION DE LA SHBG EN EL HOMBRE
(Pre y post-estimulación con HCG)

A) NORMALES



B) CON HIPOGONADISMO

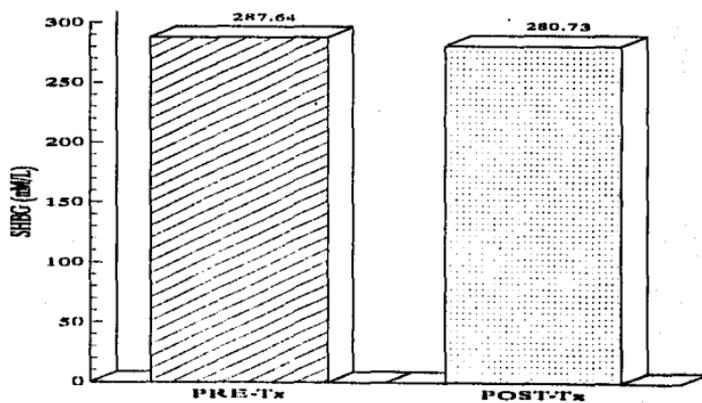


TABLA 4.- VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG DURANTE EL CICLO MESTRUAL (n=2).

	SHBG (nM/L)	E ₂ (pg/ml)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	PROGES- TERONA (ng/ml)
FASE OVULATORIA (DIA 13)	423	234	26	106	—
FASE POSTOVULATORIA (DIA 15)	211	295	12.1	24.5	—
FASE LUTEA (DIA 21)	285	166	8.1	15.0	11.8

TABLA 4-A.- VALORES HORMONALES Y DE LA SHBG EN MUJERES.

		SHBG (nM/L)	E ₂ (pg/ml)	T (ng/ml)	E ₂ /T
CICLO MENSTRUAL	M ± DE	317.16 ± 55.80	156.67 ± 81.18	0.74 ± 0.35	146.82 ± 115.15
	BANDA	261.36-372.98	75.49-237.85	0.39-1.09	31.67-261.97
	n	21	21	5	5
MENOPAUSIA	M ± DE	142.59 ± 38.40	5.98 ± 4.30	0.18 ± 0.11	30.97 ± 20.30
	BANDA	104.19-181.0	1.66-10.28	0.07-0.29	10.67-51.27
	n	15	12	12	12
MENOPAUSIA CON Tx	M ± DE	385.88 ± 79.8	126.15 ± 82.87	0.15 ± 0.06	921.24 ± 678.5
	BANDA	306.1-465.68	43.28-209.02	0.09-0.21	242.74-1599.74
	n	15	15	12	12
OVARIOS POLIQUISTICOS	M ± DE	264.31 ± 81.73	94.73 ± 65.63	0.82 ± 0.35	207.96 ± 187.19
	BANDA	182.58-346.0	29.10-160.36	0.27-0.97	20.79-396.17
	n	12	10	7	7
EMBARAZO	M ± DE	1189.17 ± 130.39	3096.48 ± 1301.64		
	BANDA	1038.78-1299.56	1794.84-4396.12		
	n	24	24		

FIGURA 3
CONCENTRACION DE LA SHBG (nM/L) EN MUJERES

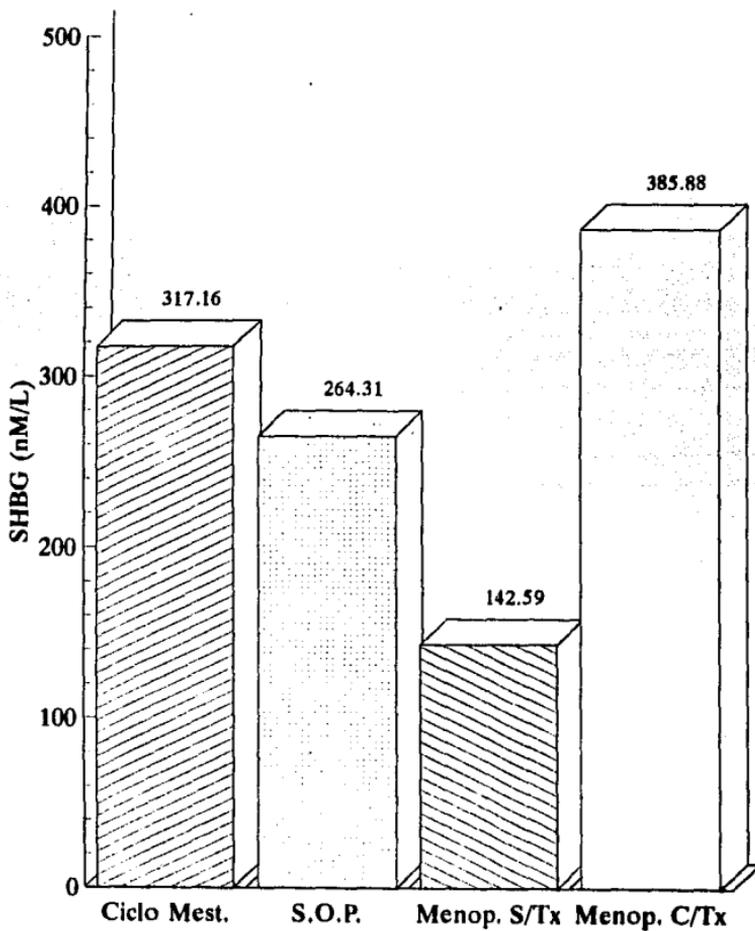


FIGURA 4
CONCENTRACION DE LA SHBG (nM/L) EN EL CICLO
MESTRUAL Y EL EMBARAZO

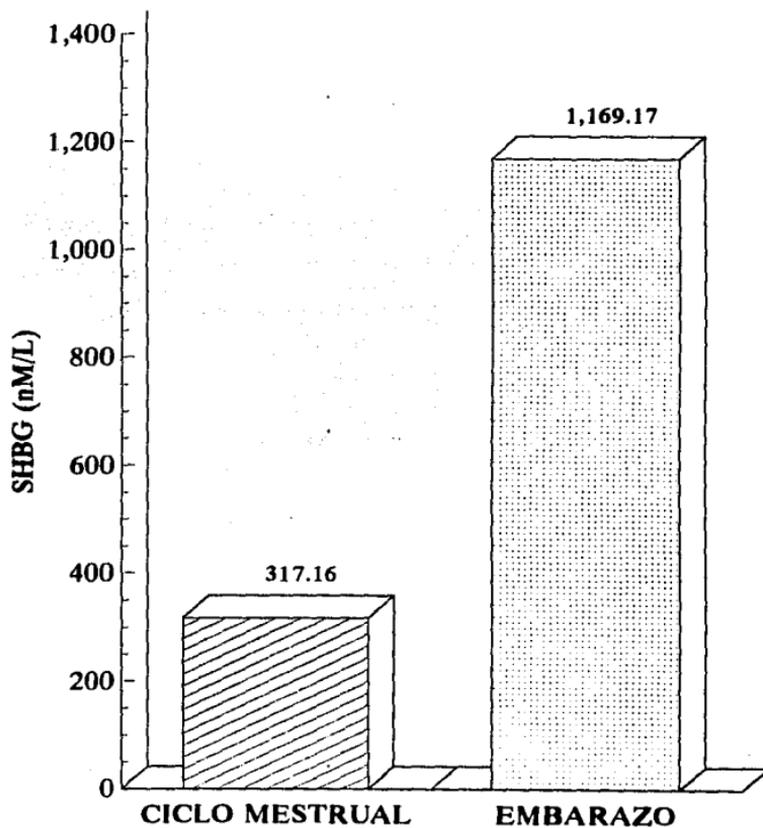
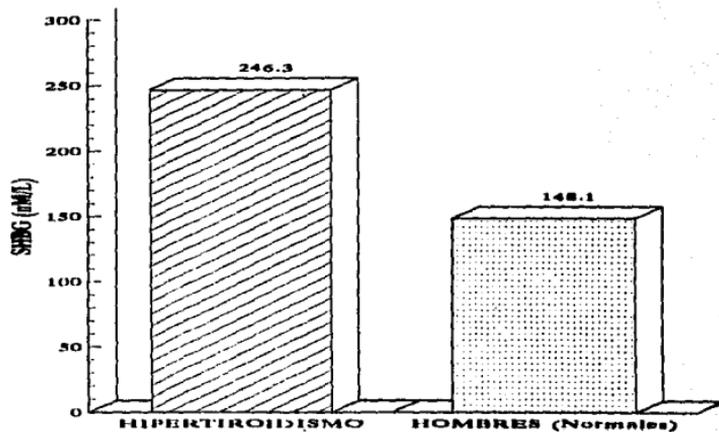
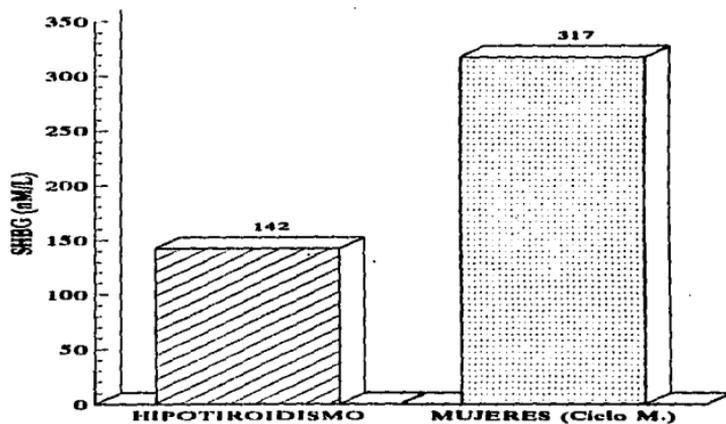


TABLA 5.-CONCENTRACION DE HORMONAS Y DE LA SHBG EN LOS PACIENTES CON HIPO E HIPER TIROIDISMO

		SHBG (nM/L)	T ₃ (ng/dl)	T ₄ (µg/dl)	T ₄ L (ng/dl)	TSH (µU/ml)
HIPOTIROIDISMO n= 15	M ± DE	142 ± 36.41	80.53 ± 28.51	2.24 ± 1.94	0.33 ± 0.25	44.67 ± 9.00
	BANDA	105.59 - 178.41	52.02 - 109.04	0.30 - 4.18	0.08 - 0.58	35.66 - 53.67
HIPERTIROIDISMO n= 15	M ± DE	246.36 ± 15.93	468.37 ± 64.08	22.04 ± 3.47	5.44 ± 1.05	0.17 ± 0.20
	BANDA	230.43 - 262.92	404.29 - 532.44	18.57 - 25.50	4.39 - 6.49	
NORMALES	MUJER	317.1 ± 55.8	90 - 190	5.0 - 12.5	0.7 - 2.0	0 - 5.0
	HOMBRE	148.1 ± 52.8				

FIGURA 5
CONCENTRACION DE LA SHBG EN PERSONAS CON HIPO E
HIPERTIROIDISMO



II.-RELACION DE LOS NIVELES DE LA SHBG CON LA CONCENTRACION DE HORMONAS.

A) Con las hormonas gonadales (E₂,T)

1.- En el hombre.

La concentración de testosterona presentó una correlación lineal positiva con la concentración de la SHBG en el hombre ($r = 0.558$) tanto en condiciones basales como post-estimulación con hCG, evaluando la respuesta a las 72 y 96 horas (figura 6). Por el contrario la relación fue negativa entre los niveles de SHBG y la concentración de estradiol ($r = - 0.707$) así como también con la relación E₂/T, lo cual se observó tanto en condiciones basales como post-estimulación con hCG (figura 7 y 8).

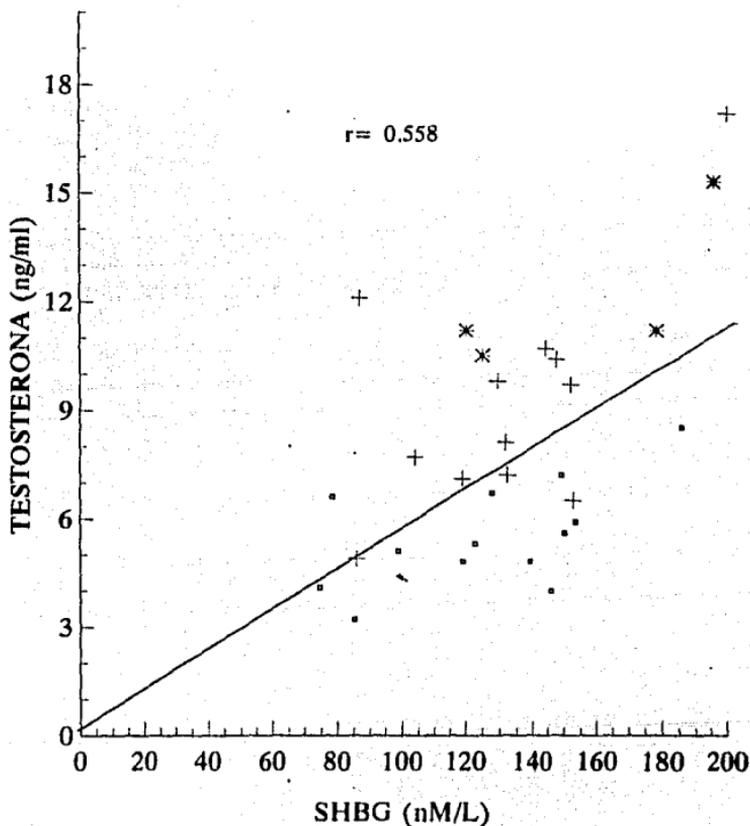
2.- En la mujer.

El estudio de correlación entre los niveles de la SHBG y los esteroides gonadales mostró en la mujer una respuesta diferente a la del hombre; así con E₂ se obtuvo una relación lineal positiva en las diferentes situaciones clínicas estudiadas. Las figuras 9 y 10 dan ejemplos representativos de estos resultados; en cambio con la testosterona la relación fue inversa ($r = - 0.663$) siendo mayores los niveles de la globulina, mientras más baja fué la concentración de la testosterona (figura 11).

B) Con las hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas (T₃, T₄ y T_{4L}) mostraron tener un efecto positivo sobre la concentración de la SHBG tanto en hombres como en mujeres, con coeficientes de correlación muy elevados obtenidos al relacionar la concentración de las hormonas tiroideas en pacientes con hiper hipotiroidismo, con los niveles de la SHBG (figura 12 y 13). En cambio con la TSH, la correlación fué negativa.

FIGURA 6
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE TESTOSTERONA
CON LA SHBG EN EL HOMBRE
(Pre y post-estimulación con HCG)



• BASAL + 72 HORAS × 96 HORAS

FIGURA 7
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE E2 CON SHBG EN
EL HOMBRE
(Condiciones basales)

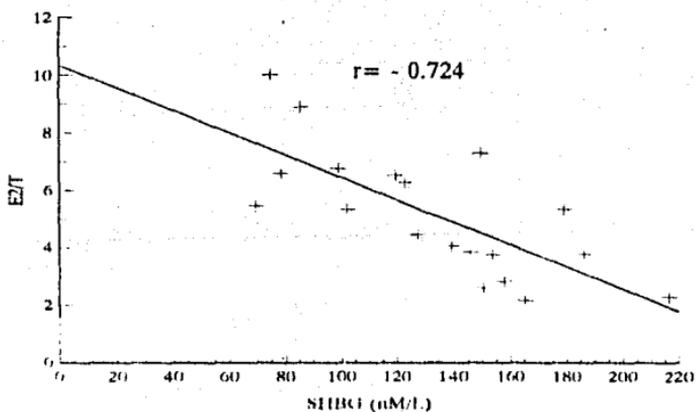
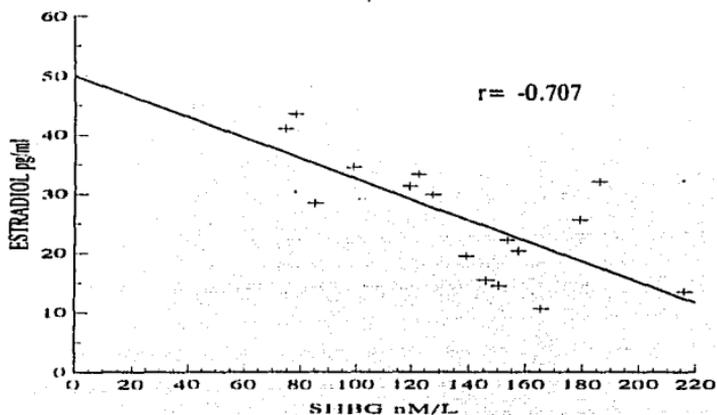
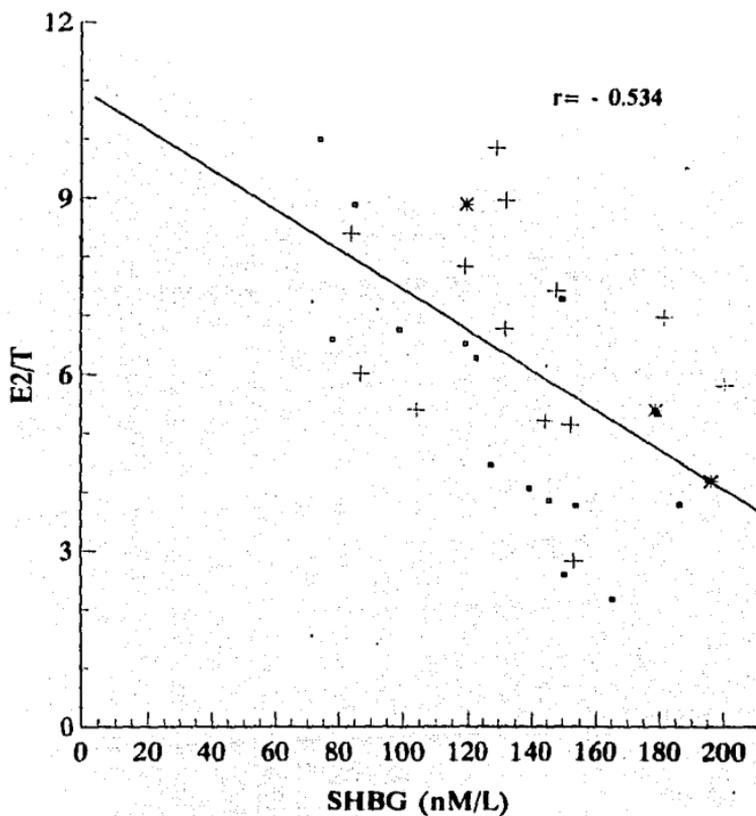


FIGURA 8
RELACION E2/T CON LA CONCENTRACION DE SHBG EN EL
HOMBRE
(Pre y post-estimulación)



• BASAL + 72 HORAS * 96 HORAS

FIGURA 9
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE E2 CON LA SHBG
EN LA MENOPAUSIA

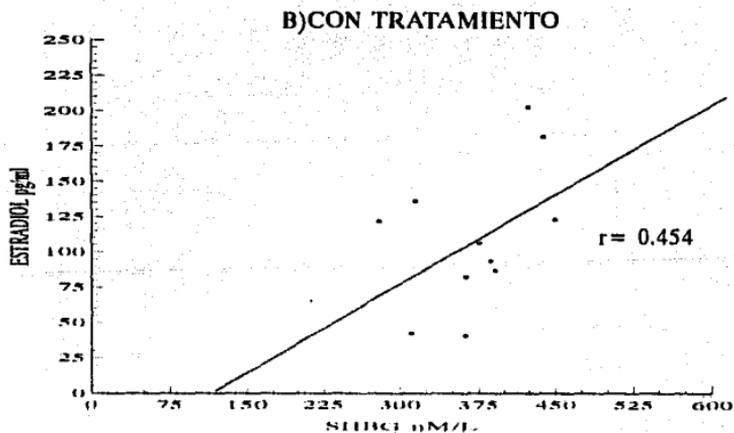
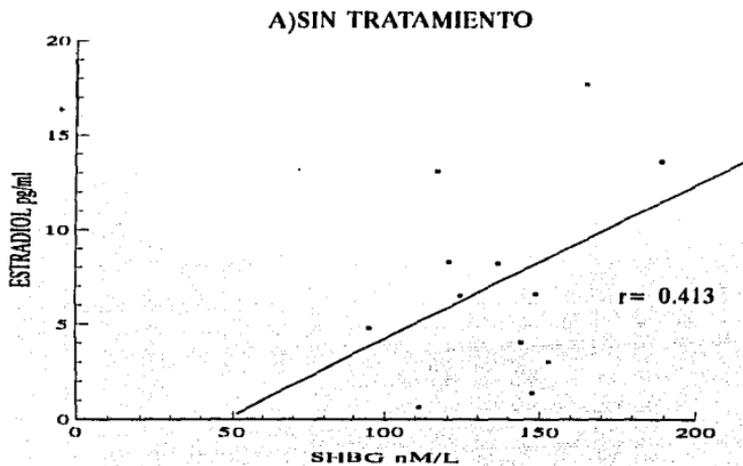
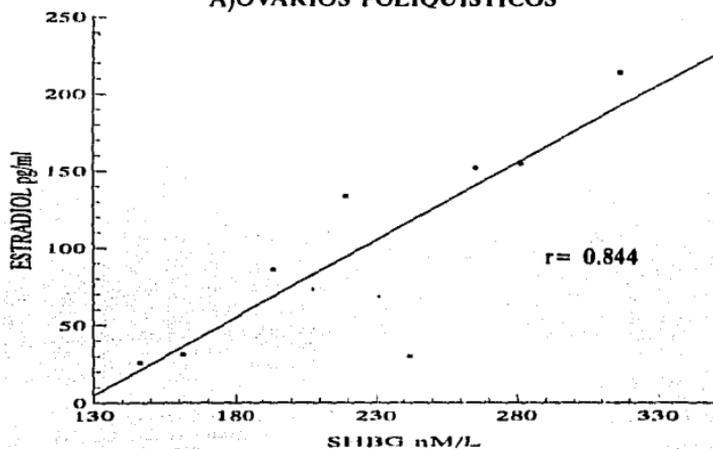


FIGURA 10
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE ESTRADIOL CON
LA SHBG EN LA MUJER

A) OVARIOS POLIQUISTICOS



B) EMBARAZO

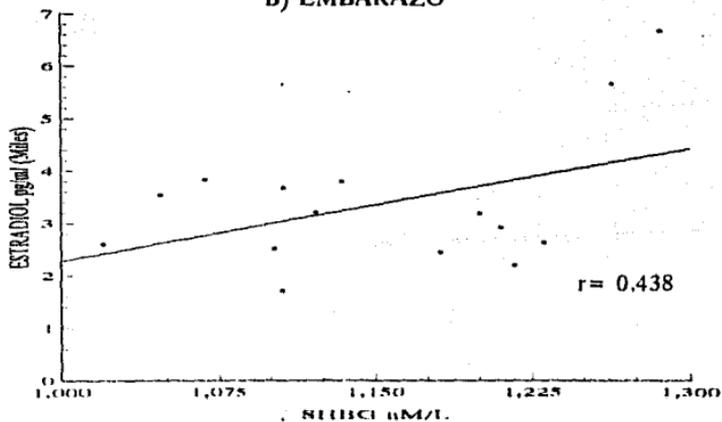
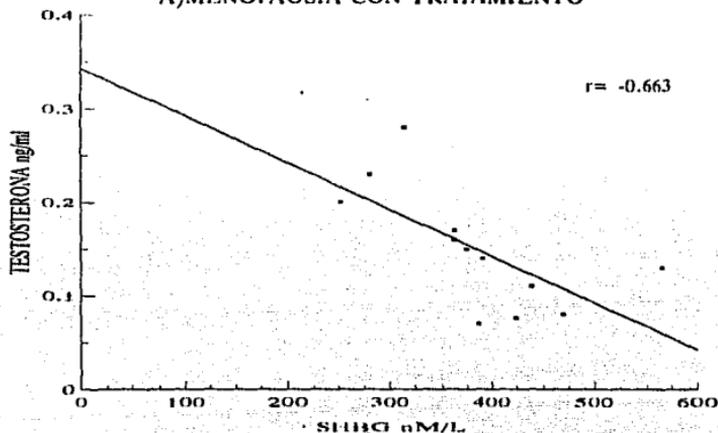
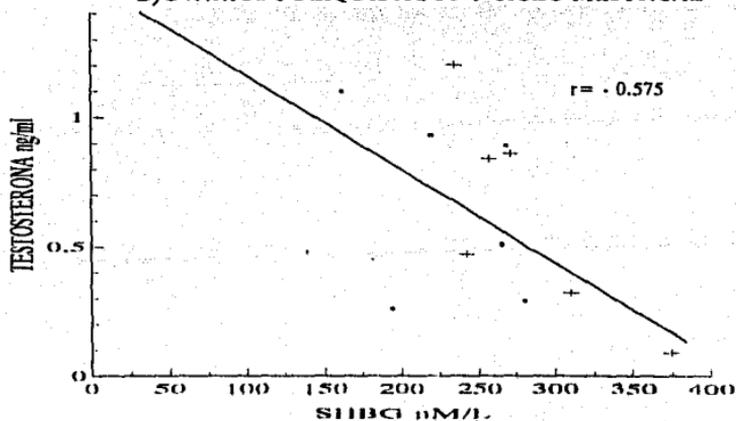


FIGURA 11
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE TESTOSTERONA
CON LA SHBG EN LA MUJER

A) MENOPAUSIA CON TRATAMIENTO



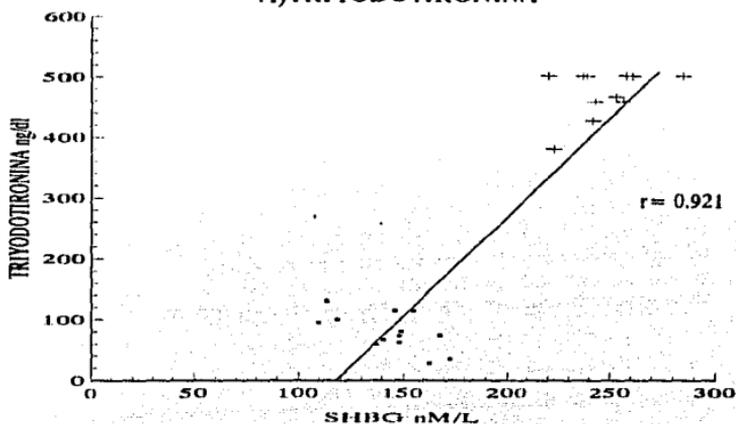
B) OVARIOS POLIQUISTICOS Y CICLO MESTRUAL



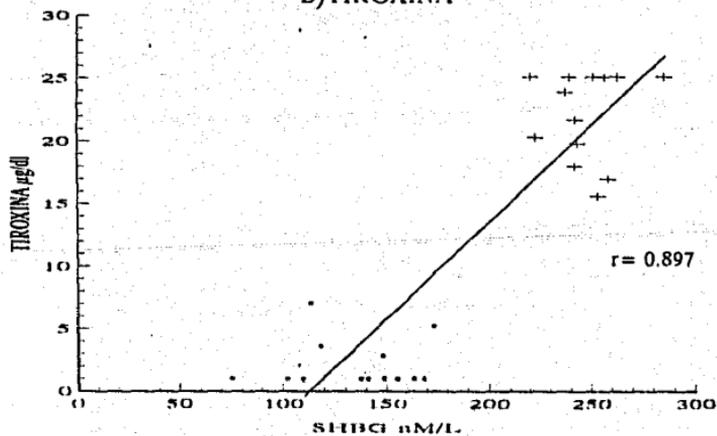
• OVARIOS POLIQUISTICOS + CICLO MESTRUAL

FIGURA 12
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE LAS HORMONAS
TIROIDEAS CON LA SHBG

A) TRIYODOTIRONINA



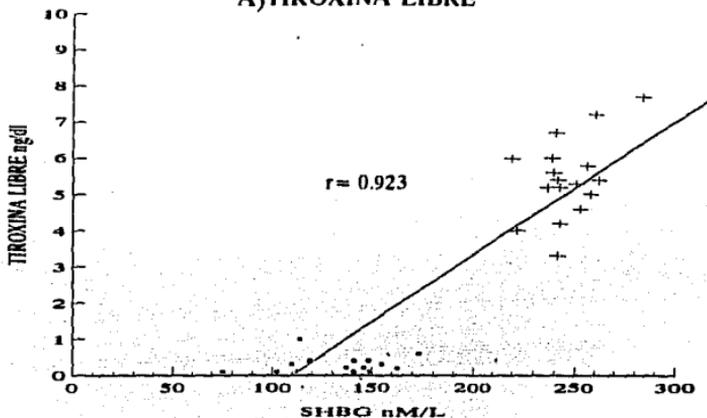
B) TIROXINA



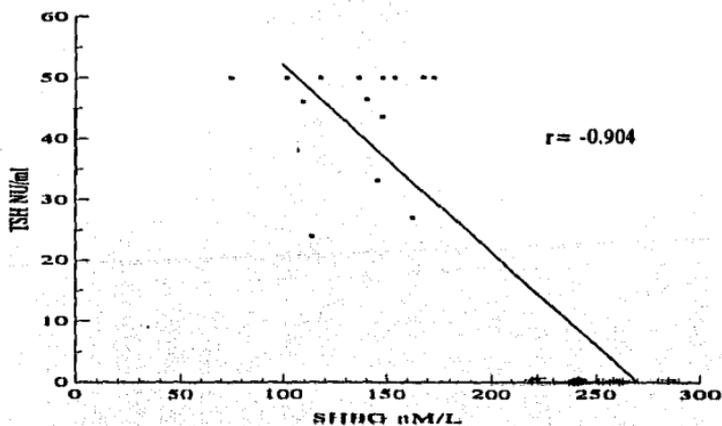
• HIPOTIROIDISMO + HIPERTIROIDISMO

FIGURA 13
CORRELACION DE LA CONCENTRACION DE LAS HORMONAS
TIROIDAS CON LA SHBG

A) TIROXINA LIBRE



B) HORMONA ESTIMULANTE DE LA TIROIDES



• HIPOTIROIDISMO + HIPERTIROIDISMO

III.-RESULTADOS DEL ESTUDIO CROMATOGRÁFICO.

A) Curva de calibración de pesos moleculares.

Para su obtención, se determinó el volumen de elución (V_e) de las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular para calibrar la columna: Deshidrogenasa alcohólica (150 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina bovina (65 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C (12.4 kDa). Con el V_e se calculó la relación V_e/V_o que guarda una relación inversa con el peso molecular de las proteínas en la filtración en gel (figura 14).

B) Perfil de elución de los estándares de la SHBG.

El perfil cromatográfico de dos diferentes preparaciones estándar de SHBG marcadas con ^{125}I (*SHBG) que se sometieron a la filtración en gel, se muestran en las figuras 15 y 16. Para su obtención la radiactividad presente en cada fracción de la cromatografía (cpm) se graficó en la ordenada, contra su respectivo volumen de elución en la abscisa.

La figura 15 corresponde al perfil de elución del estándar de los laboratorios Diagnostic Systems. Se puede apreciar la presencia del pico de la *SHBG que eluyó en la fracción número 23, y además un segundo pico de radiactividad en la fracción número 50, debido a la elución del ^{125}I libre. Este último es importante, porque por su peso molecular tan pequeño, marca el volumen final de la cromatografía o V_f del sistema y se indica en la parte superior derecha de la figura mediante una pequeña flecha; en el lado izquierdo se localiza el sitio de elución del azul dextrán (PM aproximado de 2,000 kDa) que marca el V_o o volumen inicial de la cromatografía. Así mismo se indica el sitio de elución de otros marcadores de peso molecular utilizados para facilitar la identificación de las isoformas de la SHBG en los cromatogramas. La figura 16 representa el perfil de elución del estándar de la SHBG de Diagnostic Products Co (DPC) como puede verse, el área de elución de la SHBG muestra dos picos, en lugar de uno. El primero cuantitativamente más importante fué eluido en la fracción número 23 y el segundo en la fracción número 25; además se encuentran otros pequeños picos de radiactividad, resultantes de la degradación de la globulina.

C) Perfil de elución de la SHBG en los sueros de los pacientes.

El perfil de elución de los sueros sometidos a la filtración en gel, se obtuvo al valorar mediante el radioinmunoanálisis (RIA) la inmunoreactividad de la SHBG en cada una de las fracciones de la cromatografía, graficando posteriormente este valor en nMl. contra el respectivo volumen de elución (Ve) en ml.

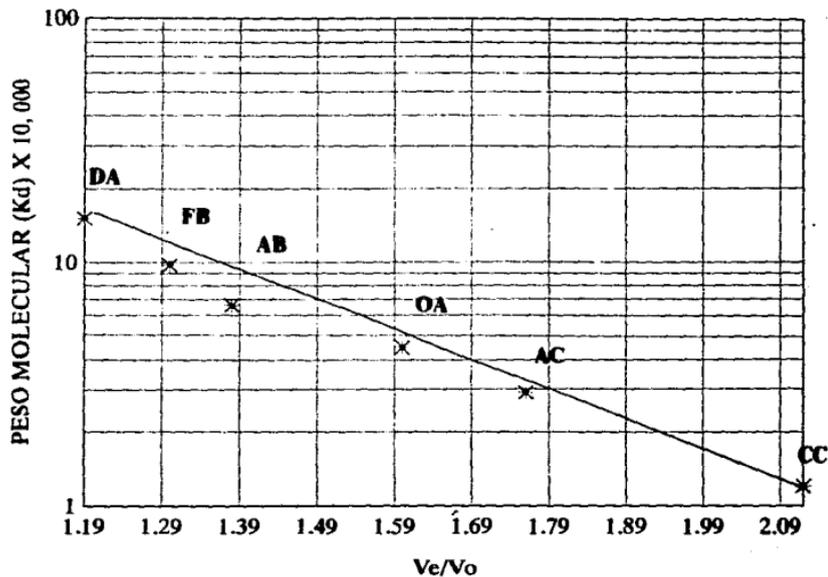
Las figuras 17 y 18 muestran los perfiles de elución representativos del comportamiento cromatográfico de la SHBG en el suero de hombres normales. Así en la figura 17 se representan los perfiles de elución de dos hombres jóvenes de 27 y 30 años respectivamente; se observa marcada heterogeneidad, con la presencia de dos picos en el área de la SHBG, en las fracciones 23 y 25, correspondientes a los picos detectados en el estándar de la ^{125}I SHBG de DPC. Además en la figura superior se observan otros picos de poca inmunoreactividad eluidos después de la fracción 35, mientras que en el caso de la figura inferior se aprecian picos de actividad de SHBG en las fracciones 30, 32 y 35 lo que indica la presencia de formas de bajo peso molecular. Nótese que las moléculas más pesadas, de mayor inmunoreactividad eluyeron entre el Vo y la AB, las formas ligeras entre la AB y la AC y las formas pequeñas con el CC y después de este.

En la figura número 18 se representan los perfiles de dos hombres también normales, de 33 y 44 años de edad (parte superior e inferior respectivamente) los que a diferencia de los perfiles anteriores, muestran menor heterogeneidad molecular, detectándose solo los picos de las fracciones 23 y 25 y ligera actividad de SHBG en las fracciones 31-33 en el primer caso y en 34-35 en el segundo, con muy pequeña proporción de los fragmentos de bajo peso molecular, eluidos después de la fracción 35.

En los hombres con hipogonadismo, los perfiles cromatográficos representados en la figura 19, muestran algunas diferencias en relación a los perfiles de los hombres normales. En primer lugar destaca una mayor actividad total de la SHBG por la diferencia de escalas en la ordenada, así como un desplazamiento o corrimiento del perfil de elución hacia la derecha del cromatograma con los picos de mayor inmunoreactividad en las fracciones 25 y 27-28 (en lugar de 23 y 25) esta última corresponde a una molécula de un peso molecular menor que las anteriores. También está

aumentada la actividad de SHBG en las fracciones 32 a 36 y no se observan los picos correspondientes a las moléculas de muy bajo peso molecular, que eluyen después de la fracción 36, por lo que los perfiles son más homogéneos. Estos cambios pueden observarse con mayor claridad en las figuras 20 y 21 en donde se compara el perfil cromatográfico de un hombre normal con uno de hipogonadismo, siendo evidente en estos últimos el desplazamiento del pico de mayor actividad hacia la derecha, poco después del sitio de elución del estándar marcado (*SHBG) así como el incremento de la actividad en las fracciones 27 y 35 y la ausencia de fragmentos.

FIGURA 14
CURVA DE CALIBRACION DE PESOS MOLECULARES



DA.-Deshidrogenasa alcohólica

OA.-Ovoalbúmina

FB.-Fosforilasa B

AC.-Anhidrasa carbónica

AB.-Albúmina bovina

CC.-Citocromo C

FIGURA 15
CROMATOGRAFIA DE ^{125}I SHBG DE DIAGNOSTIC SYSTEMS
LABORATORIES
($K_{av} = 0.16$)

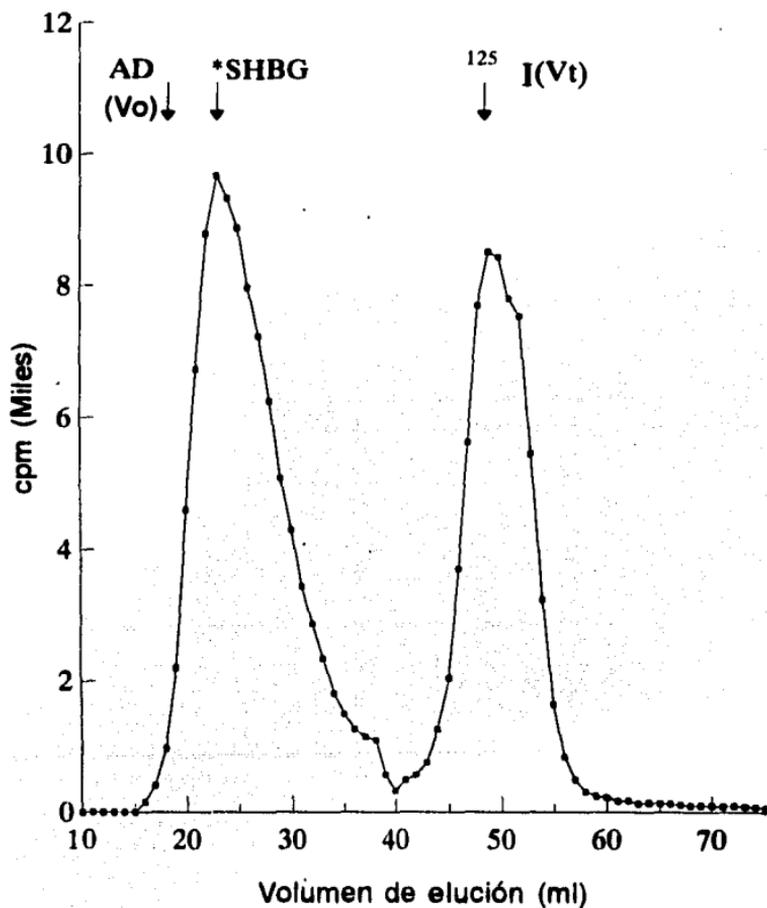


FIGURA 16
CROMATOGRAFIA DE SHBG DE DPC

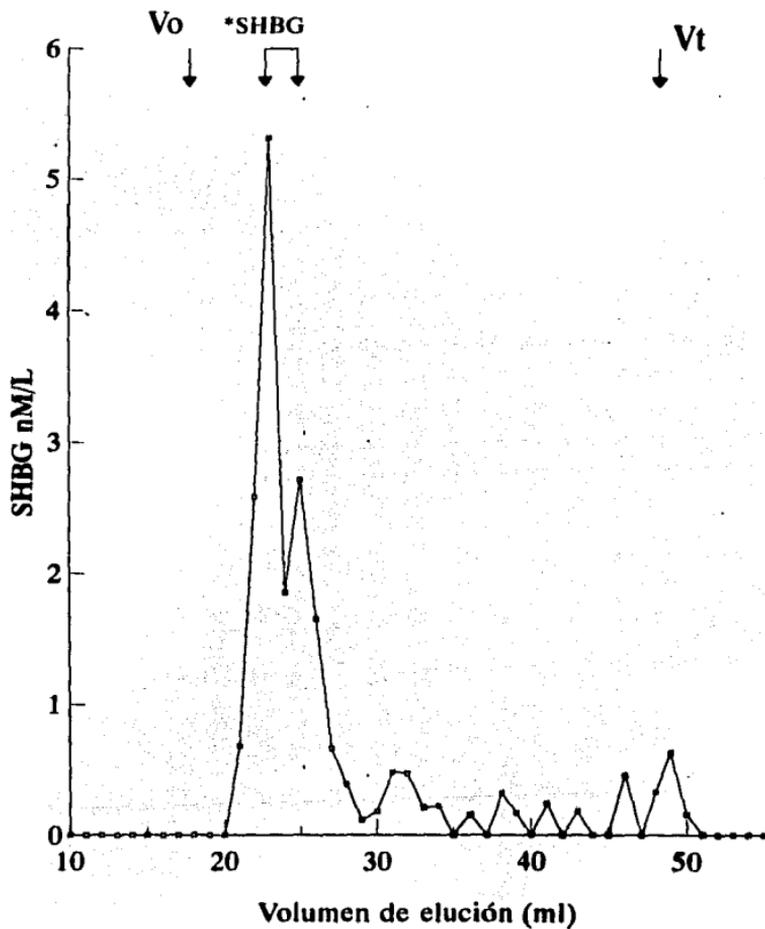


FIGURA 17
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN HOMBRES
 (Normales)

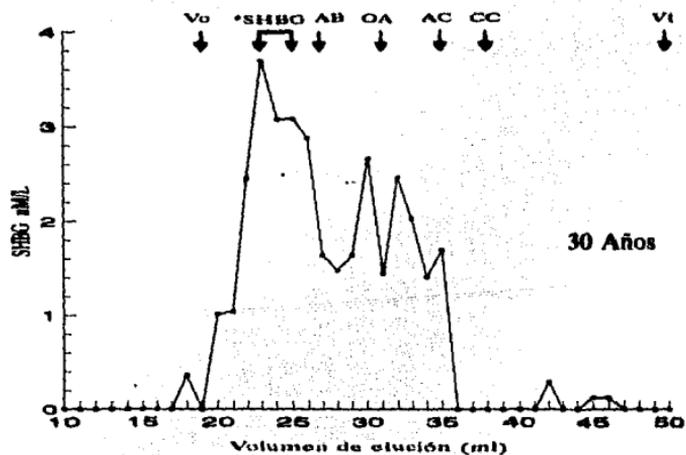
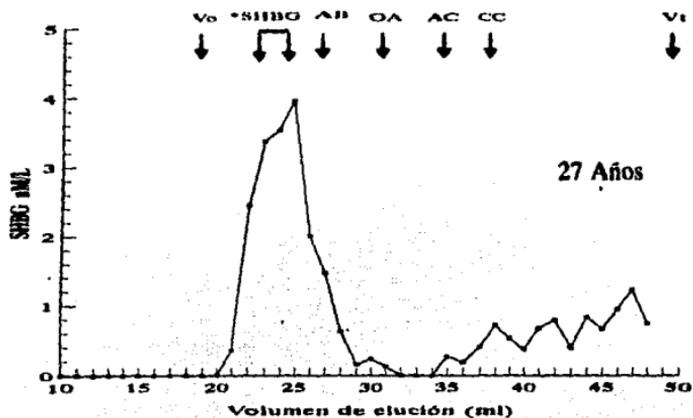


FIGURA 18
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA SHBG EN HOMBRES
(Normales)

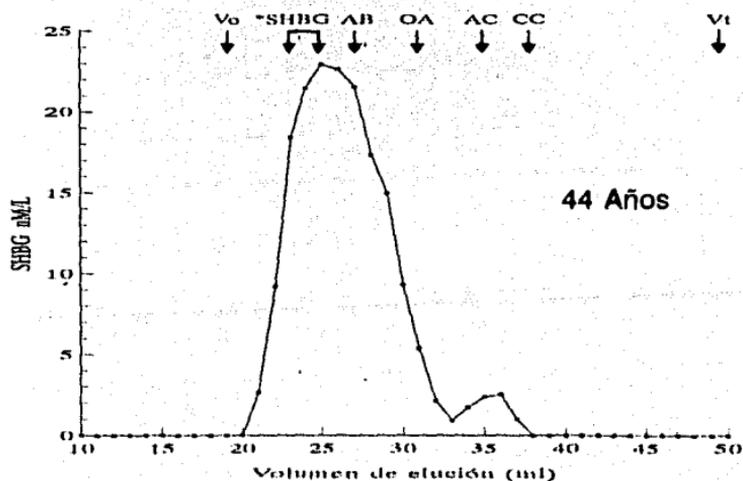
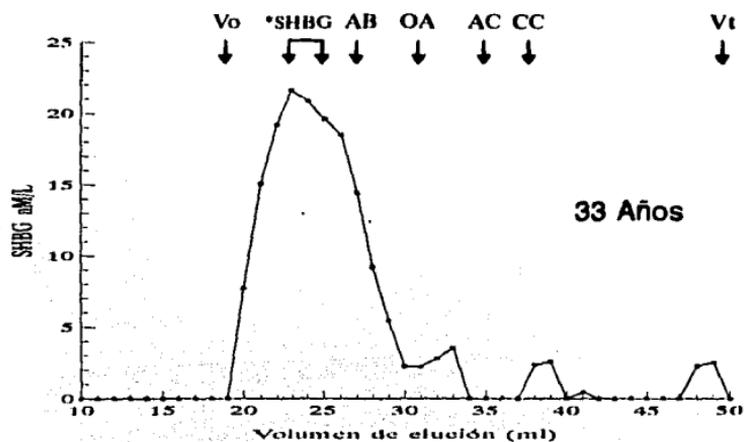


FIGURA 19
 PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO

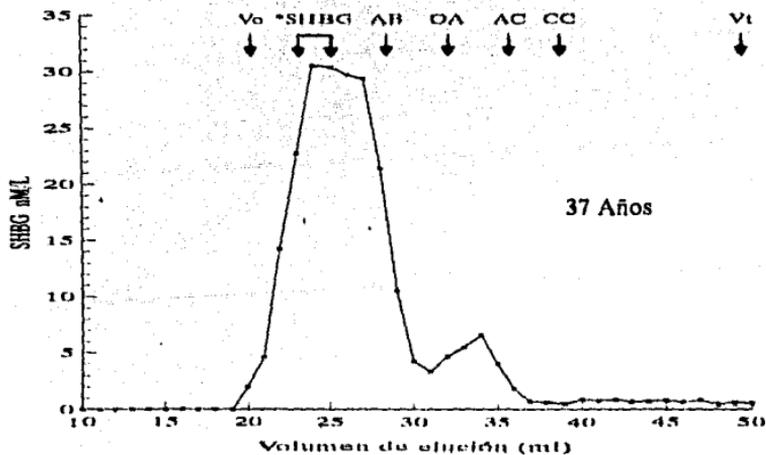
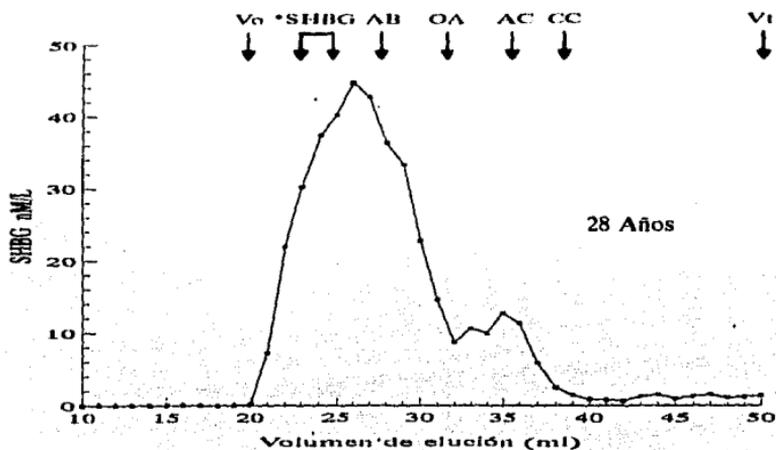


FIGURA 20
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LA SHBG EN HOMBRES

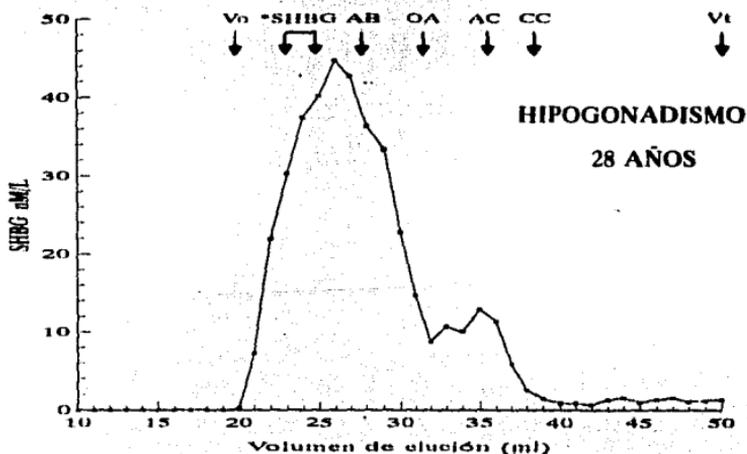
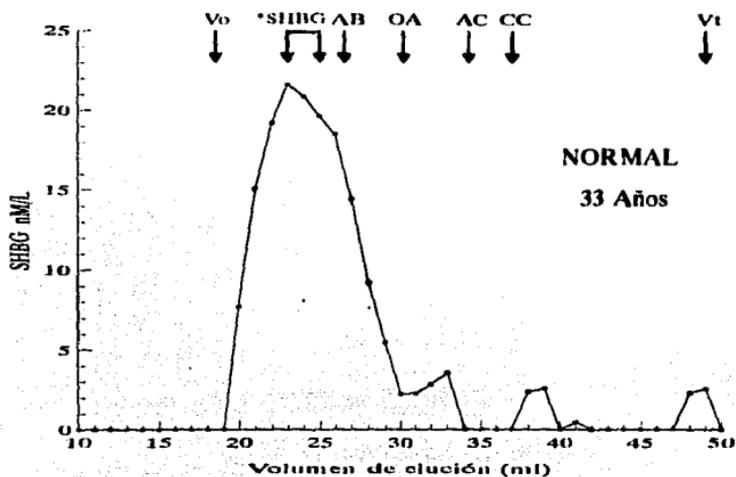
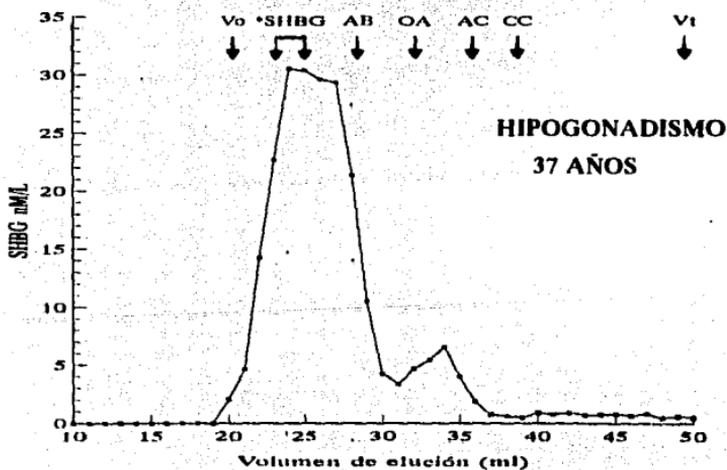
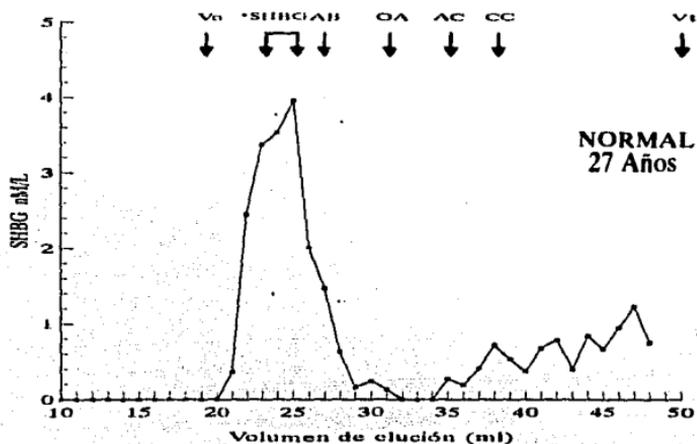


FIGURA 21
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN HOMBRES



IV.-CARACTERIZACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG.

Las formas moleculares de la SHBG fueron identificadas por los picos de inmunoreactividad presentes en los diferentes cromatogramas, tanto de hombres normales como de hombres con hipogonadismo, caracterizándose posteriormente en base a los siguientes criterios:

- 1) Volumen de elución (V_e)
- 2) Constante de partición (K_{av})
- 3) Peso molecular

Este último se calculó a partir del valor de la relación V_e/V_0 , el cual se interpola en la curva de calibración de pesos moleculares.

Tomando en cuenta estos tres criterios, se pudieron detectar en el hombre 8 picos de inmunoreactividad, cuya caracterización se presenta en la tabla número 6, que contiene su V_e , K_{av} y PM lo que permite identificar fácilmente a cualquier molécula en un cromatograma.

De acuerdo a su peso molecular las isoformas 3 y 4 parecen corresponder a los dos monómeros o subunidades que constituyen a la SHBG, la molécula número 2 al dímero o molécula completa formada por la unión de las dos subunidades, mientras que la forma grande de 135 - 115 kDa podría ser un oligómero formado por la unión de varios monómeros. Las formas de bajo peso molecular (24, 18- < 8 kDa) para su manejo desde el punto de vista práctico se agrupan bajo el nombre de "fragmentos". Como ya se mencionó anteriormente la forma oligomérica (135 - 115 kDa) y el dímero eluyeron antes de la albúmina bovina (AB) los monómeros después de ésta, entre la ovoalbúmina (OA) y la anhidrasa carbónica (AC) mientras que los fragmentos fueron eluidos poco antes del citocromo C y después de éste.

De acuerdo a estos datos, el porcentaje de inmunoreactividad de las moléculas presentes en los cromatogramas de los hombres normales se compara con la de los hombres con hipogonadismo en la tabla 7; donde puede verse que la forma grande de 135 - 115 kDa (molécula número 1) solo se detectó en los hombres normales, no en el hipogonadismo, aunque en ambos grupos predominó el dímero de la globulina (molécula número 2) siendo su proporción más elevada, así como la de los monómeros (moléculas 3 y 4) en los hombres con hipogonadismo.

Cuando los pacientes fueron sometidos a la prueba de estimulación con hCG para evaluar la respuesta testicular, se observaron algunos cambios importantes tanto en los valores hormonales de la SHBG (previamente presentados en la tabla 2) como en el comportamiento cromatográfico de la globulina. Así la figura 22 muestra la respuesta a la prueba con hCG en un hombre normal, destacando en primer lugar la disminución de la concentración de la SHBG y el corrimiento del perfil hacia la derecha del cromatograma cambiando el pico de mayor inmunoreactividad de la fracción 23 a la 25, lo que indica una disminución del oligómero y un incremento del dímero y un recambio del monómero de 36 kDa a 24 kDa disminuyendo los fragmentos de bajo peso molecular.

En uno de los casos de hipogonadismo (figura 23) correspondiente a un hombre joven de 28 años, post-estimulación con hCG se observó una ligera elevación del dímero, el monómero de 54-46 kDa sin modificaciones importantes y un recambio de las formas de 24 a 36 kDa, con una ligera elevación de los fragmentos. Sin embargo en otro hombre con hipogonadismo la respuesta fue diferente (figura 23-A) post-estimulación con hCG disminuyó la concentración de la SHBG, pero no aumentó la proporción del dímero, el monómero de 54 - 46 kDa (en las fracciones 27-28) disminuyó su proporción y nuevamente se observó un recambio del monómero de 36 kDa a la isoforma de 24 kDa eluida en la fracción número 35. La proporción cuantitativa de las isoformas de SHBG en respuesta a este estímulo, se presenta en la tabla 8, tanto en los hombres normales como en aquellos con hipogonadismo, y la representación gráfica de estos valores en la figura 24 donde pueden apreciarse más fácilmente las diferencias entre los dos grupos.

TABLA 6.-CARACTERIZACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN EL HOMBRE
(PICOS DE INMUNOREACTIVIDAD)

MOLECULA	1	2	3	4	5	6	7	8
Ve (ml)	21 - 23	25 - 28	29 - 31	32 - 34	35 - 36	37 - 40	41 - 42	44 - 50
Kav	0.06 - 0.12	0.16 - 0.194	0.35 - 0.37	0.39 - 0.45	0.48 - 0.52	0.6 - 0.65	0.71 - 0.74	0.77 - 0.93
PM (kDa)	135 - 115	90 - 78	54 - 46	38 - 36	24	18 - 16	12	< 8
	OLIGOMERO	DIMERO	MONOMEROS.		FRAGMENTOS.			

Tabla 7.-INMUNOREACTIVIDAD DE LAS MOLECULAS DE SHBG EN EL HOMBRE (%)

MOLECULA	1	2	3	4	5 - 8
	135 - 115 kDa	90 - 78 kDa	54 - 46 kDa	38 - 36 kDa	FRAGMENTOS. (24 < 8 kDa)
NORMAL	28.8 ± 35	42.5 ± 30	10.2 ± 7.5	5.7 ± 6.7	11.8 ± 5.3
HIPOGONADISMO.	—	55.6 ± 1.4	27.1 ± 0.4	9.3 ± 2.0	7.68 ± 1.13

FIGURA 22
CROMATOGRAFIA DE SHBG EN HOMBRES
 (Pre y post-estimulación con HCG)
 Normal 33 años

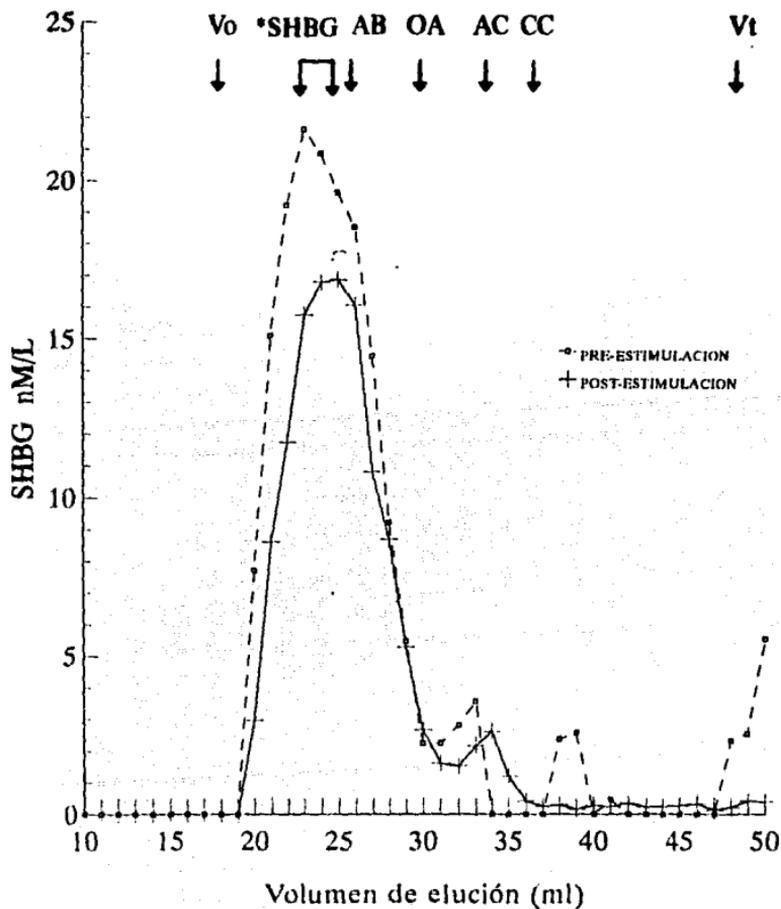


FIGURA 23
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN HOMBRES
 (Hipogonadismo, 28 años)

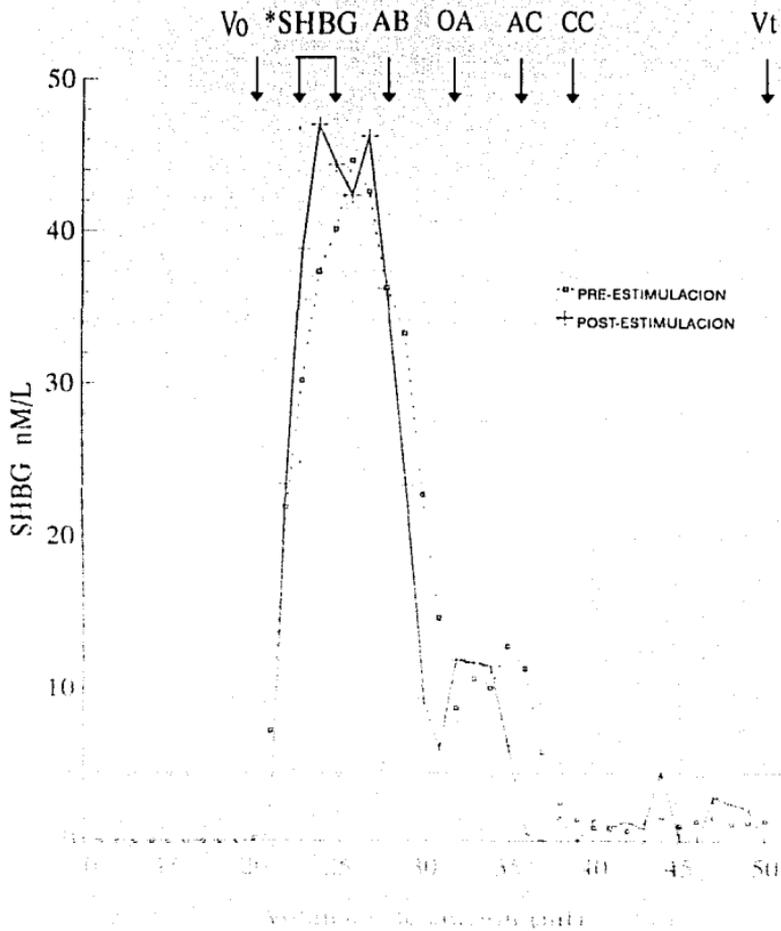


FIGURA 23-A
CROMATOGRAFIA DE SHBG EN HOMBRES
 (Pre y post-estimulación con HCG)
 Hipogonadismo 46 años

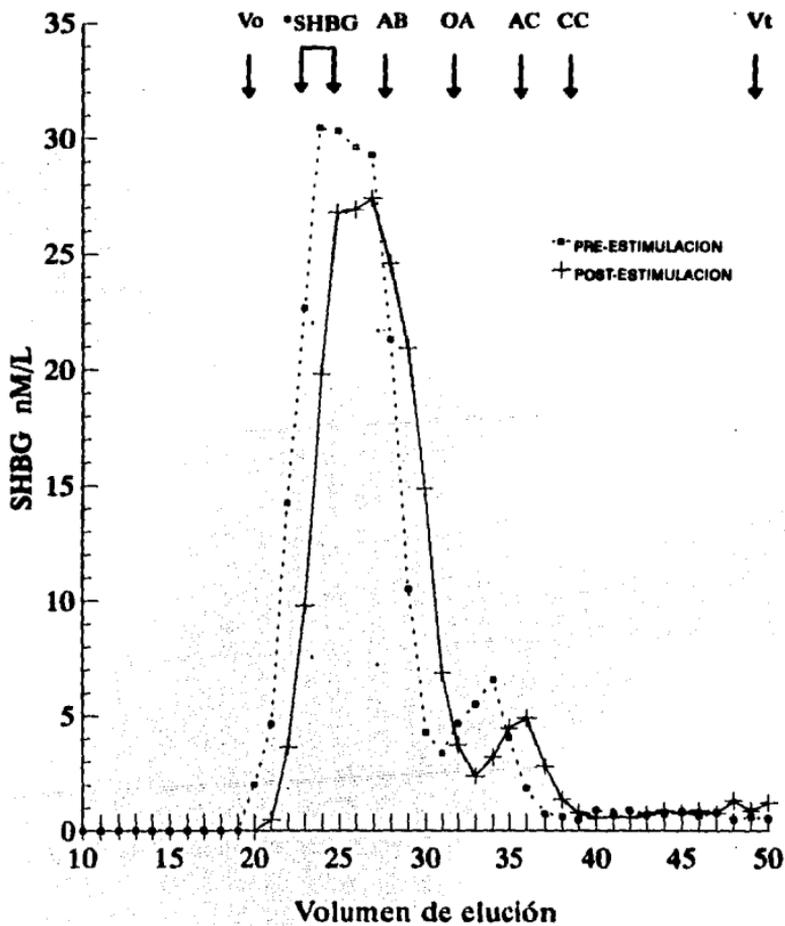
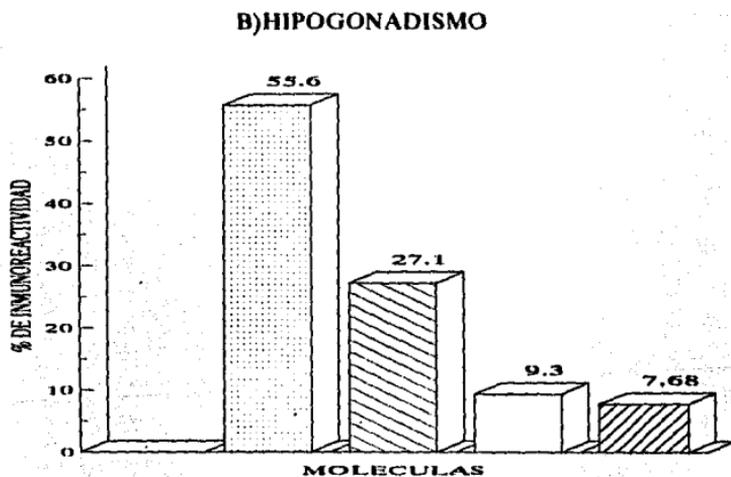
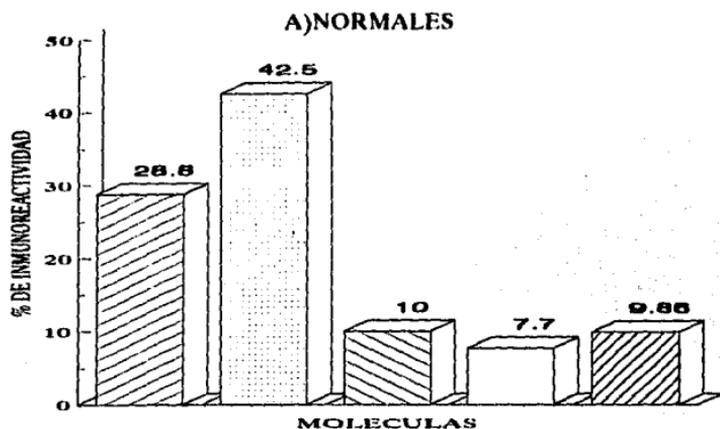


Tabla 8.-INMUNOREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN EL HOMBRE (%)

PRE Y POST-ESTIMULACION CON HCG

MOLECULA		1	2	3	4	5-8
		135 - 115 kDa	90 - 78 kDa	54 - 46 kDa	38 - 36 kDa	FRAGMENTOS.
NORMALES	PRE-	28.8 ± 35	42.5 ± 30	10.2 ± 7.5	5.7 ± 6.7	11.6 ± 5.3
	POST- HCG	—	83.6 ± 6.6	9.5 ± 4.6	4.1 ± 1.6	2.90 ± 0.31
HIPOGONADISMO.	PRE-	—	55.6 ± 1.4	27.1 ± 0.4	9.3 ± 2.0	7.68 ± 1.13
	POST-HCG	—	56.1 ± 8.8	11.2 ± 10.6	13.5 ± 8.0	18.20 ± 6.40

FIGURA 24
FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN EL HOMBRE (%)



▨ 135 - 115 KD ▩ 90 - 78 KD ▧ 54 - 46 KD □ 36 - 24 KD ▤ 16 - <8 KD

V.-EFECTO DE LOS NIVELES DE TESTOSTERONA SOBRE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN EL HOMBRE.

La proporción de las formas moleculares de la SHBG en el hombre mostraron por estudios de correlación, ser dependientes de la concentración de los esteroides gonadales. Las formas grandes tuvieron una relación lineal positiva con el nivel de testosterona (figura 25), mientras que la relación fué inversa con la proporción de monómeros y fragmentos de bajo peso molecular (figura 25 y 26) lo que explica la presencia del oligómero y el predominio del dímero de la globulina en condiciones normales y porque el oligómero no se observa en los casos de hipogonadismo que tienen niveles bajos de T incrementándose en cambio la proporción de los monómeros (tabla 7).

FIGURA 25
CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
CON TESTOSTERONA EN HOMBRES

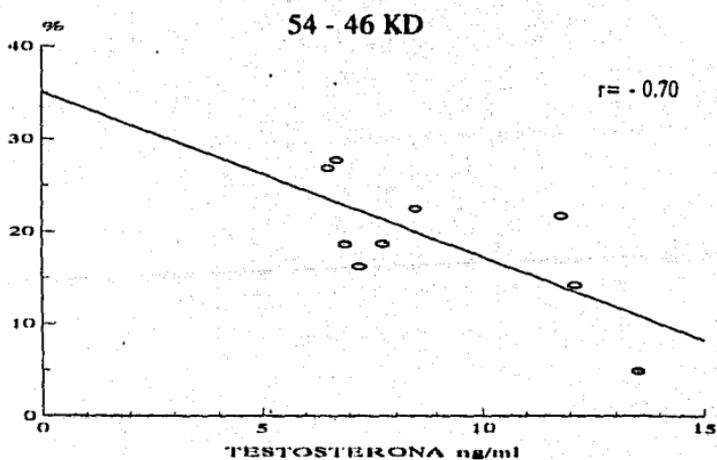
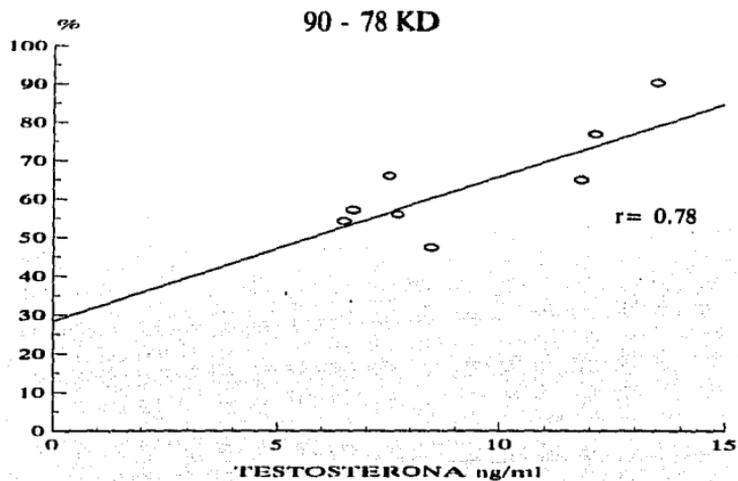
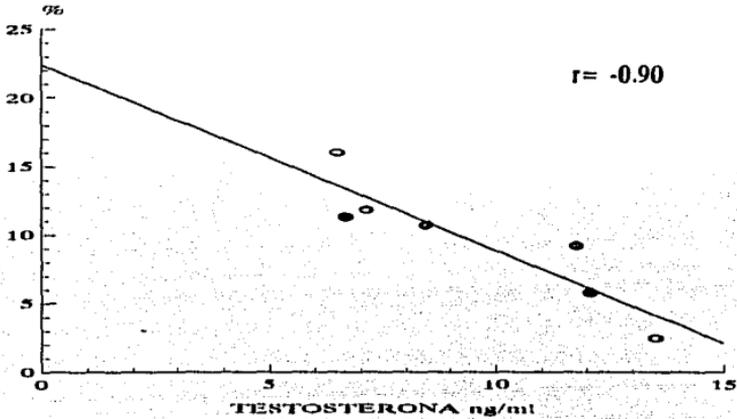
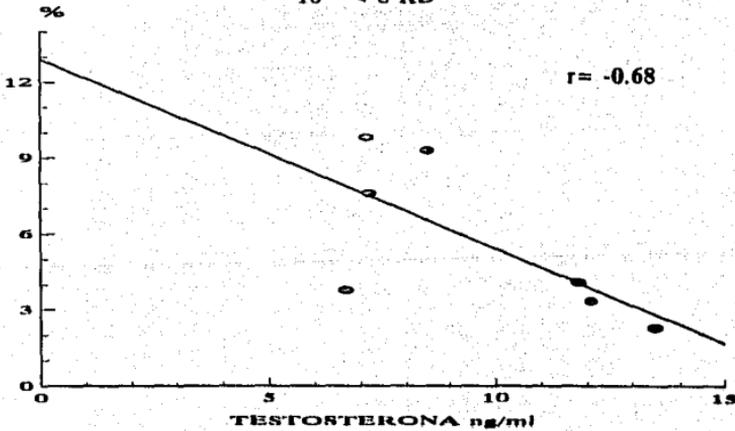


FIGURA 26
CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
CON TESTOSTERONA EN HOMBRES

36 - 24 KD



16 - < 8 KD



VI.-PERFILES MOLECULARES DE LA SHBG EN LA MUJER.

A) Durante el ciclo menstrual.

En las figuras 27 y 28 se muestran los perfiles cromatográficos representativos del comportamiento de la SHBG, a lo largo del ciclo menstrual; en la figura 27 los perfiles obtenidos en el día 13 del ciclo (período ovulatorio) en comparación con el día 15 del ciclo (post-ovulatorio) observándose algunas diferencias importantes. En el día 13 la SHBG mostró dos picos de elevada inmunoreactividad, de concentración muy similar, uno en la fracción 24-25 y el otro en la 27 (dímero y monómero de 54 - 46 kDa respectivamente), además el pico del monómero de 36 kDa con menor actividad en las fracciones 32 a 34. En cambio en el día 15 predominó el pico de la fracción 25 correspondiente al dímero, el monómero de 54 kDa disminuyó notablemente observándose varios picos de menor inmunoreactividad entre ellos el monómero de 36 kDa y otros en la región de los fragmentos. La figura 28 representa los perfiles de elución del suero, obtenido en el día 21 del ciclo, en dos pacientes diferentes; destaca nuevamente la elevación de la forma monomérica de 54 kDa en las fracciones 27-29, con mayor actividad que el dímero de la fracción 24-25, además un pico de menor inmunoreactividad en las fracciones 34-36, correspondiente a la molécula de 24 kDa.

B) En el ovario poliquístico (SOP).

Los perfiles de la SHBG en el día 7 y 21 del ciclo, en pacientes con SOP, se muestran en la figura 29, para su comparación; en el día 7 se observan dos picos importantes de inmunoreactividad, uno en la fracción 23 y otro cuantitativamente mayor en la fracción 25, los cuales corresponden a la molécula oligomérica de 135-115 kDa y al dímero de 90-78 kDa respectivamente. Se observan también otros picos de menor actividad en las fracciones 32-34 (monómero de 36 kDa) y en la región de los fragmentos. En el día 21 llama la atención el predominio del dímero sobre el monómero de 54 kDa, con menor actividad del monómero de 36 kDa en las fracciones 31-33. Esto es diferente a lo que se había observado en el día 21 del ciclo menstrual normal en el que el monómero pesado predominaba sobre la actividad del dímero. Esto se pone de manifiesto al comparar los cromatogramas de la figura 30.

C) Menopausia.

En los casos de menopausia sometidos a la filtración en gel (figura 31) el perfil cromatográfico del suero de una de las pacientes estudiadas mostró el predominio del dímero de la SHBG que eluyó en la fracción 25 con menor actividad en la región de los monómeros. En otro de los casos analizados (figura inferior) se observó además del dímero un pico de poca actividad correspondiente a la forma grande de la globulina (135-115 kDa) y el monómero de 36 kDa. Cuando estas mujeres fueron sometidas a tratamiento con estrógenos conjugados (figura 32 gráfica superior) ya no pudo observarse el pico del oligómero (fracción 23), disminuyó la proporción del dímero y se incrementó la proporción de los monómeros (fracciones 30 - 36) de manera similar a lo que ocurre durante el ciclo menstrual.

D) Embarazo.

La figura 33 representa los perfiles cromatográficos de dos mujeres con embarazo de 12 y 36 semanas que se ilustran en la parte superior e inferior respectivamente. Destaca sobre todo a las 36 semanas además del dímero de la globulina y del monómero de 54 kDa una elevada proporción del monómero de 36 kDa a lo que se debe la forma tan peculiar del perfil cromatográfico, encontrándose los fragmentos sensiblemente disminuidos.

Una vez obtenidos los perfiles de elución de las mujeres, en las diferentes condiciones clínicas, se hizo el análisis para caracterizar las diferentes formas moleculares presentes, tomando en cuenta los criterios ya mencionados, llamando la atención que son prácticamente las mismas que las detectadas en el hombre (tabla 9). Los porcentajes de inmunoreactividad para estas isoformas durante el ciclo menstrual se indican en la tabla 10 y su representación gráfica de los valores promedio de las tres fases estudiadas en la figura 34, mientras que el análisis de las isoformas en los casos de ovarios poliquístico, menopausia con y sin tratamiento y durante el embarazo se presentan en la tabla 11 en comparación con los valores promedio obtenidos durante el ciclo menstrual. Por otra parte las siguientes figuras (35-37) representan los porcentajes de inmunoreactividad de las diferentes

moléculas de la SHBG en los casos de menopausia (figura 35) síndrome de ovarios poliquísticos (figura 36) y el embarazo (figura 37) con objeto de hacer más evidentes los cambios encontrados.

Cuando se hizo el análisis particular del comportamiento de cada una de las formas moleculares en las diferentes situaciones clínicas se observó que:

1) La forma oligomérica (135 - 115 kDa) solo se detectó en los casos de ovario poliquístico y menopausia (figura 38), abarcando una tercera y quinta parte de la actividad total de SHBG respectivamente, mientras que el dímero (90-78 kDa) se encontró en todos los casos estudiados, mostrando también su más elevada proporción en los casos de menopausia y en los de ovario poliquístico y su menor proporción durante el ciclo menstrual normal.

2) De los 2 monómeros detectados el de 54-46 kDa fué el más importante cuantitativamente (figura 39), alcanzando valores superiores al 30 % de la inmunoreactividad durante el ciclo menstrual, la menopausia tratada con estrógenos y durante el embarazo, sin embargo no se detectó en el síndrome de ovarios poliquísticos. El monómero de 36 kDa tuvo menor proporción, variando entre 6 y 16 % estando más elevado en el embarazo (figura 39).

3) El fragmento de 24 kDa solo se detectó durante el ciclo menstrual y en los casos de menopausia tratada con estrógenos, siendo su proporción alrededor del 5 %, mientras que los otros fragmentos de bajo peso molecular (18 kDa - < 8 kDa) se encontraron en todos los casos estudiados con excepción de la menopausia en una proporción ligeramente mayor (4-11%) sobretodo en el síndrome de ovarios poliquísticos (figura 40).

E) Relación de las formas moleculares de la SHBG con la concentración de estradiol.

Al relacionar la proporción de las diferentes formas moleculares de la globulina, con los niveles de estradiol se encontró una elevada correlación lineal negativa ($r = -0.86$) con el dímero de la SHBG (90 - 78 kDa) disminuyendo su proporción en relación inversa a la concentración de estradiol. Por el contrario la relación fue lineal positiva con las formas monoméricas y los fragmentos de bajo peso molecular con coeficientes de correlación muy elevados (figura 41 y 42) sugiriendo un efecto inductor de los estrógenos sobre las subunidades de la globulina. Cabe resaltar que estos resultados son totalmente opuestos a lo que se observó en el caso de la testosterona, en relación a la proporción de las formas moleculares.

FIGURA 27
 PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN MUJERES

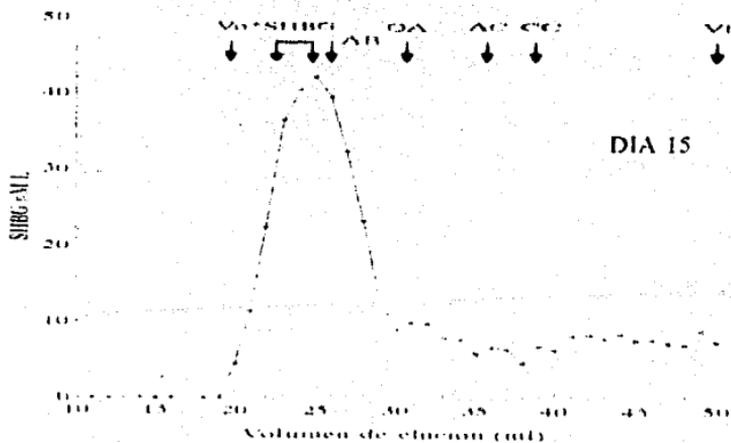
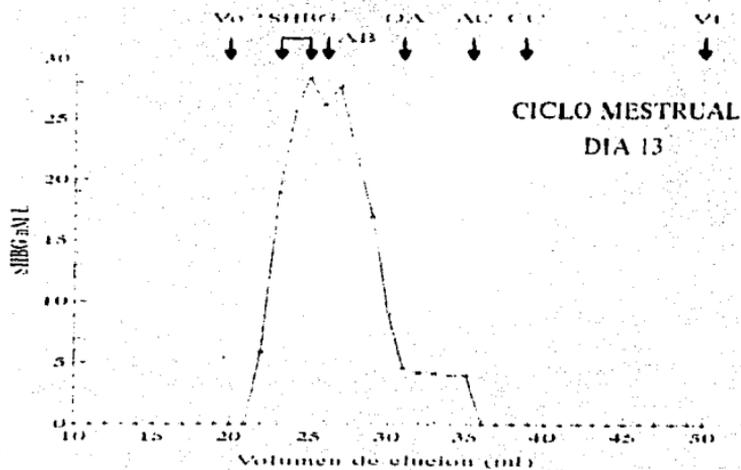


FIGURA 28
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN MUJERES
 (Ciclo menstrual)

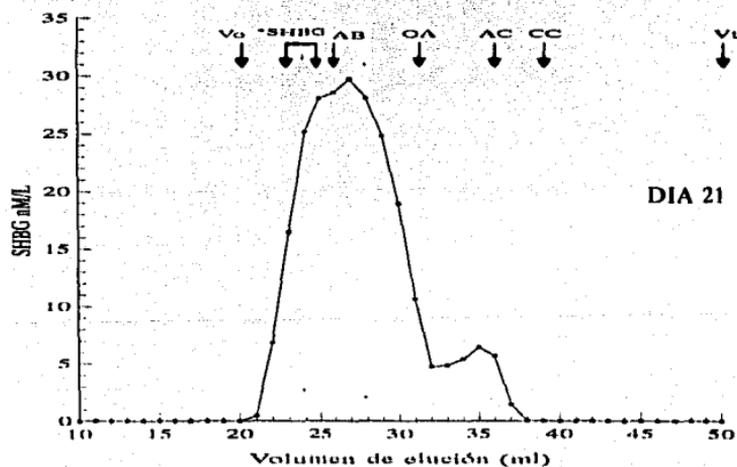
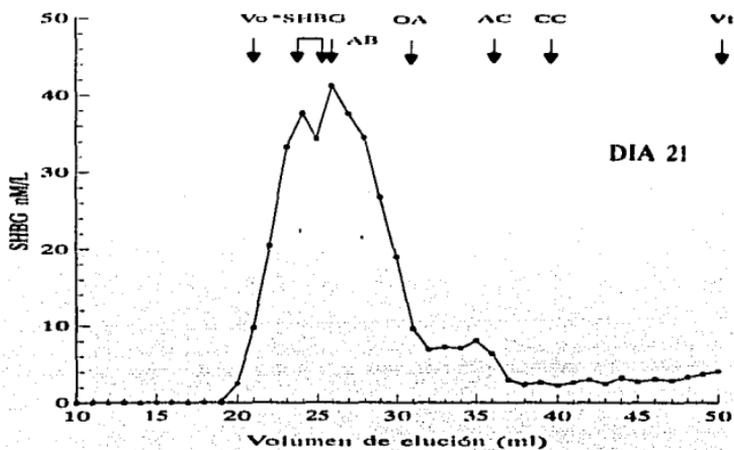


FIGURA 29
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN MUJERES
 (Ovarios poliquisticos)

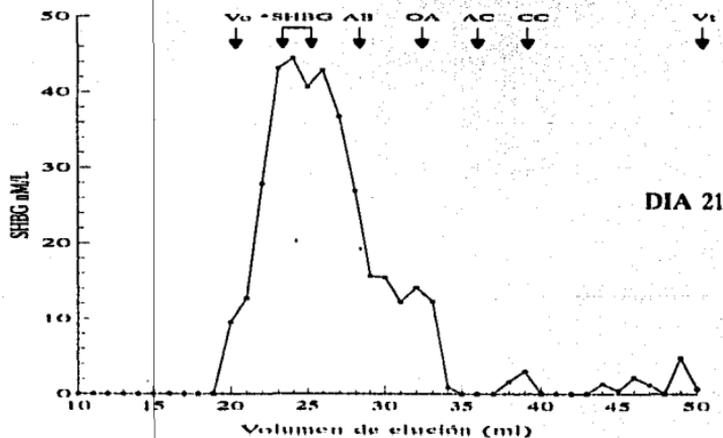
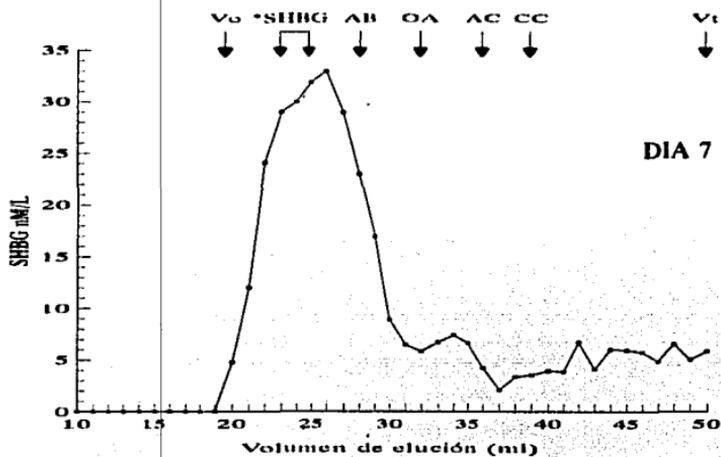
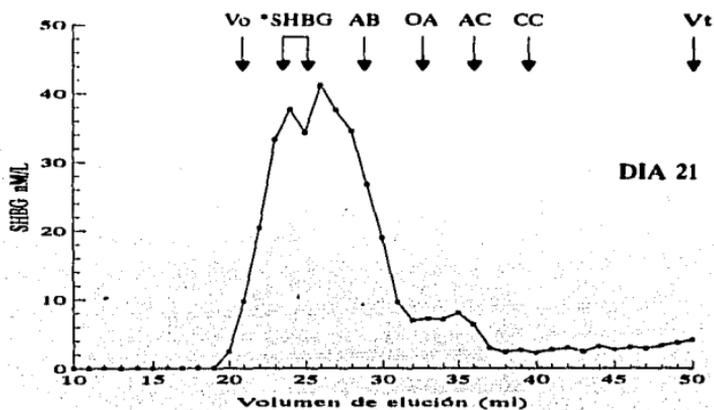


FIGURA 30
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN MUJERES

A) CICLO MESTRUAL NORMAL



B) OVARIOS POLIQUISTICOS

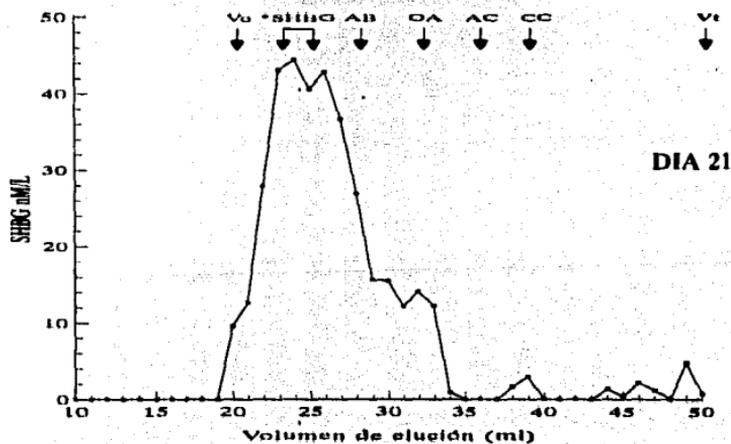


FIGURA 31
CROMATOGRAFIA DE SHBG EN LA MENOPAUSIA
 (Sin tratamiento)

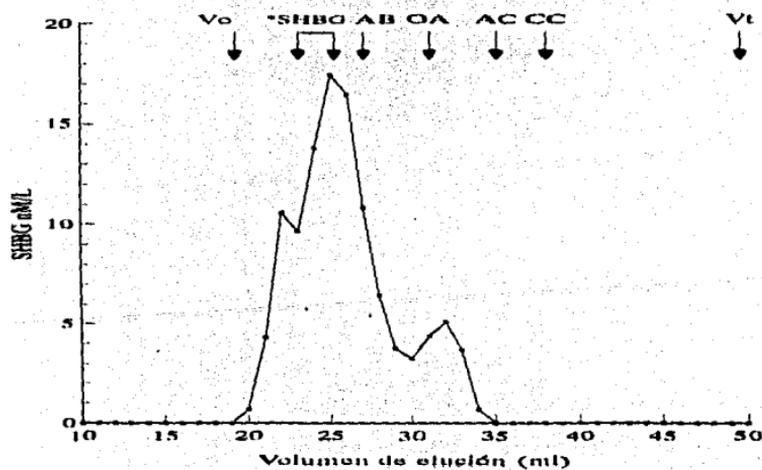
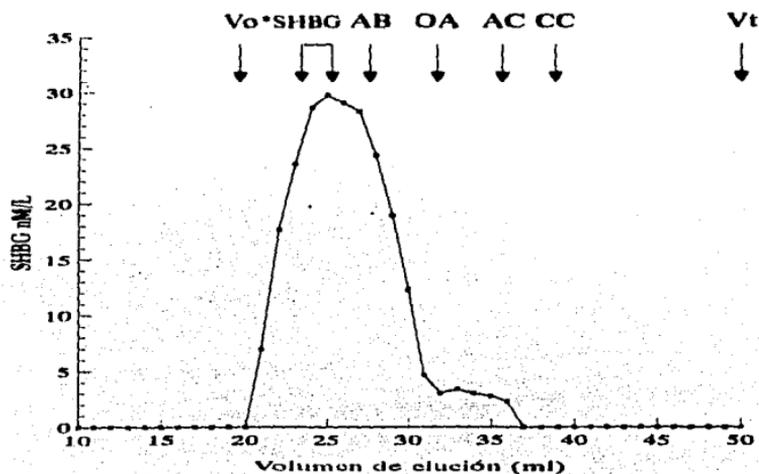


FIGURA 32
PERFIL DE LA SHBG EN MUJERES MENOPAUSICAS
 (Con tratamiento hormonal)

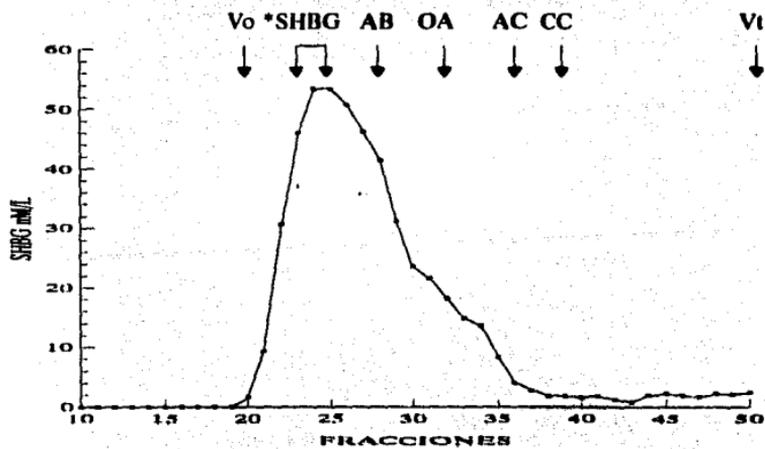
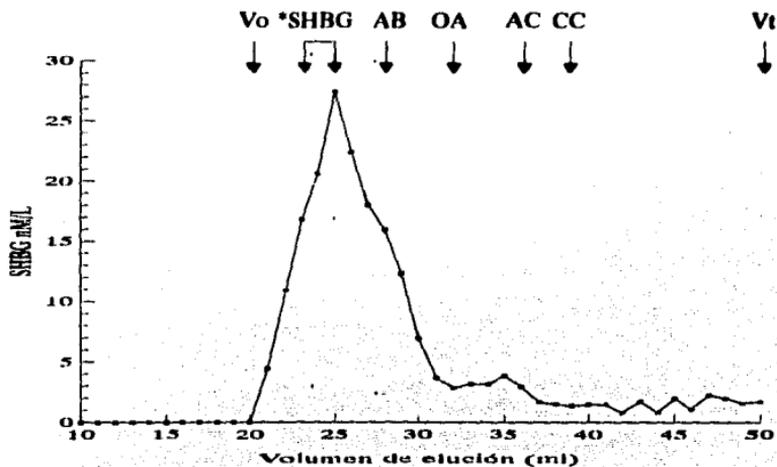


FIGURA 33
PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA SHBG EN MUJERES
 (Embarazo)

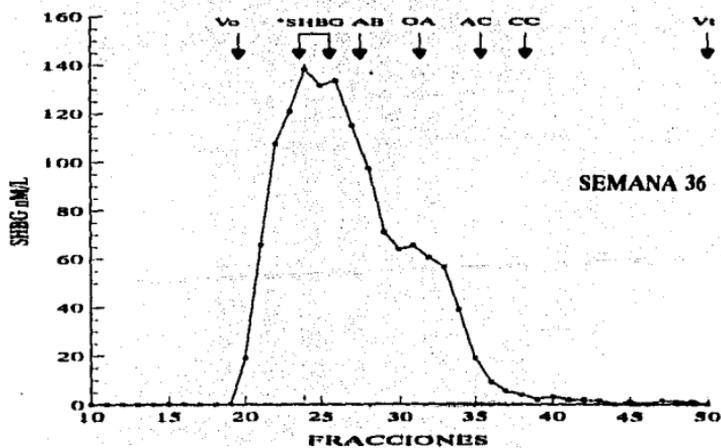
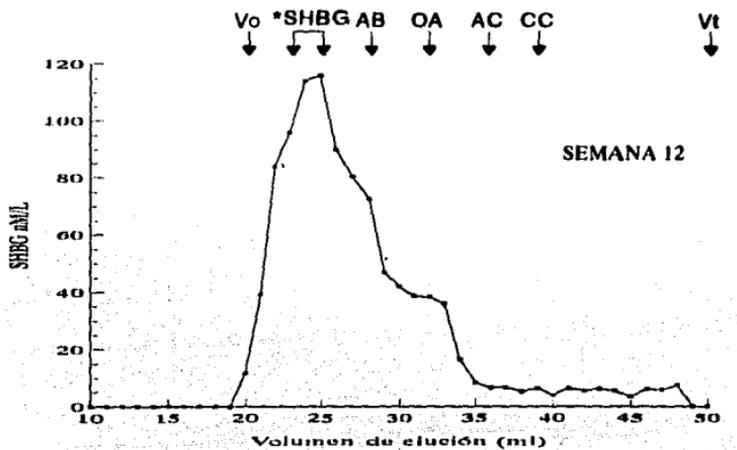


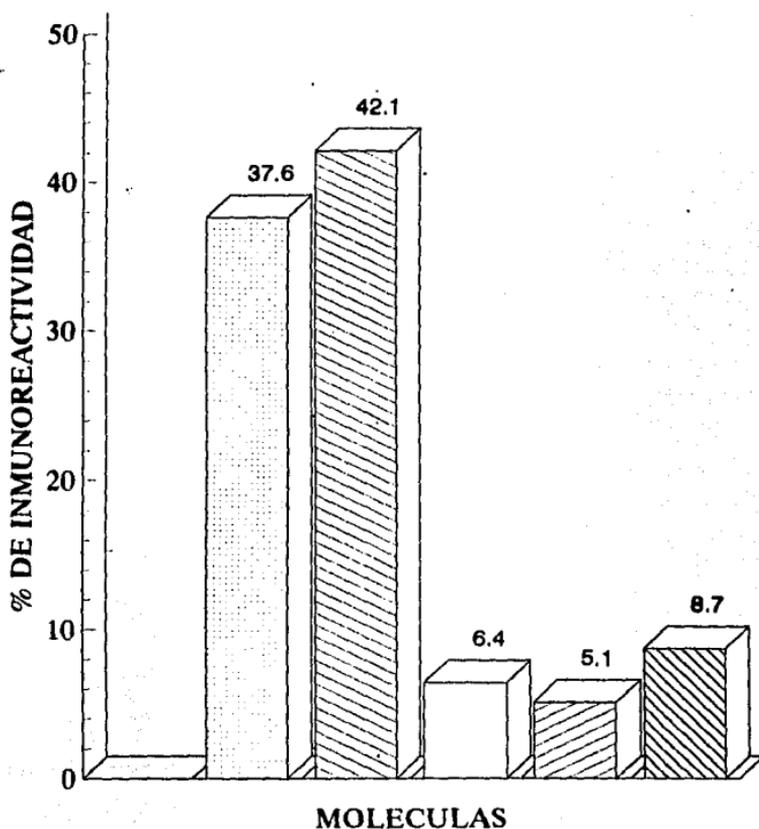
TABLA 9.-CARACTERIZACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN LAMUJER

MOLECULA	1	2	3	4	5	6	7	8
Ve (ml)	21 - 23	24 - 26	27 - 30	31 - 33	35 - 36	37 - 40	41 - 43	44 - 50
Kav	0.06 - 0.12	0.16 - 0.19	0.22 - 0.35	0.37 - 0.42	0.46 - 0.55	0.55 - 0.74	0.70 - 0.74	0.86 - 0.93
PM (kDa)	150 - 115	90	46	36	24	18 - 16	12	< 8
	OLIGOMEROS	DIMERO	MONOMEROS		FRAGMENTOS			

TABLA 10.- INMUNOREACTIVIDAD DE LAS MOLECULAS DE SHBG (%) DURANTE EL CICLO MESTRUAL

MOLECULA	1 135 - 115 kDa	2 90 - 78 kDa	3 54 - 46 kDa	4 36 kDa	5 24 kDa	FRAGMENTOS 18 - < 8 kDa
FASE:	---	---	---	---	---	---
PRE OVULATORIA	---	37.4	51.9	9.9	---	0.81
POST-	---	46.4	16.3	10.4	4.3	22.5
F. LUTEA	---	33.3	50.2	2.7	8.0	7.7

FIGURA 34
PERFIL DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
(Ciclo menstrual)

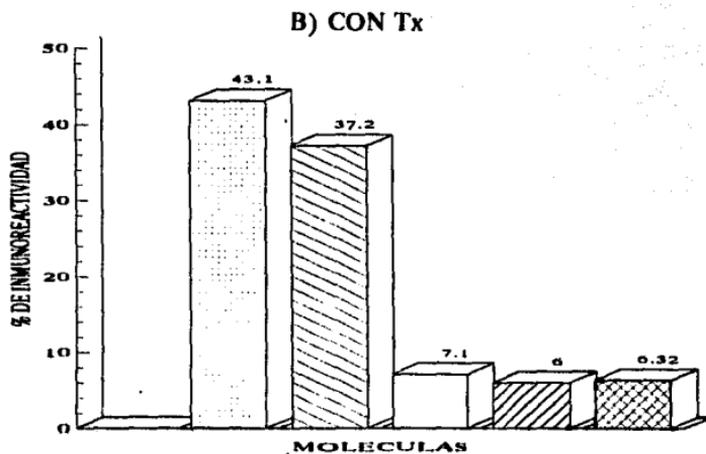
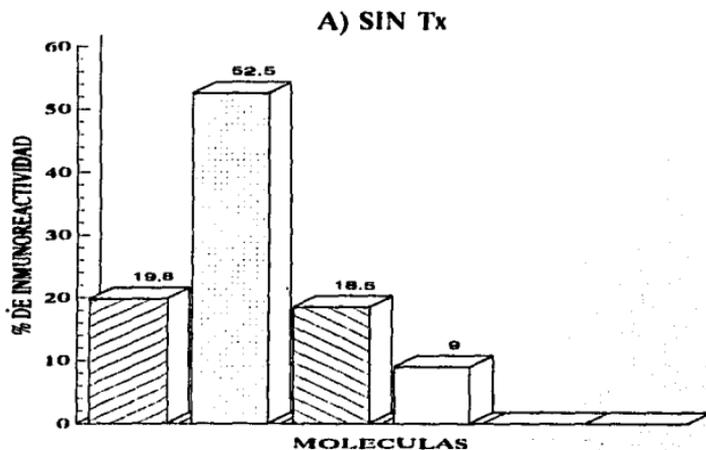


▨ 150 - 115 KD □ 90 - 78 KD ▨ 54 - 46 KD
□ 36 KD ▨ 24 KD ▨ 16 - < 8 KD

TABLA 11.-INMUNOREACTIVIDAD DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN LA MUJER (%)

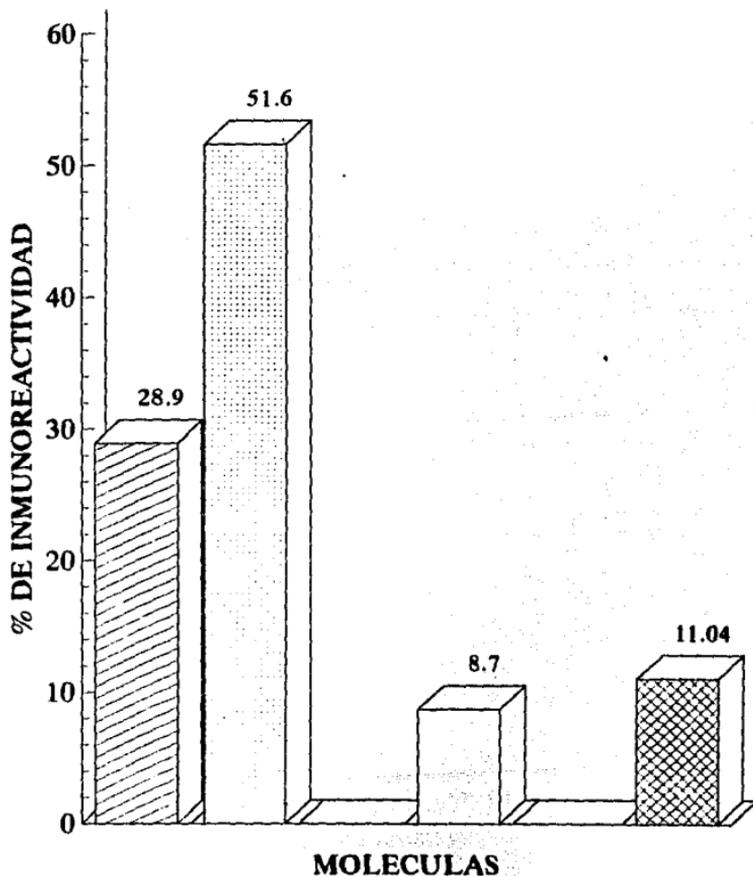
MOLECULA	1	2	3	4	5	6-8
PM	150 - 115 kDa	90 - 78 kDa	54 - 46 kDa	36 kDa	24 kDa	16 - < 8 kDa
CICLO						
MENSTRUAL	—	37.6 ± 6.4	42.1 ± 15.6	6.4 ± 4.2	5.1 ± 4.8	8.7 ± 3.2
MENOPAUSIA:						
SIN Tx	19.8 ± 19	52.5 ± 4.2	18.5 ± 18	9.0 ± 3.0	—	—
Tx CON E2	—	43.1 ± 6.6	37.2 ± 12	7.1 ± 5.4	6.0 ± 0.15	6.32 ± 0.88
OVARIOS						
POLIQUISTICOS	28.9 ± 12.4	51.6 ± 0.67	—	8.7 ± 0.7	—	11.04 ± 3.9
EMBARAZO	—	49.1 ± 5.6	30 ± 5.9	16.5 ± 2.8	—	4.2 ± 1.4
LOS VALORES REPRESENTAN LA M ± DE DEL PORCENTAJE DE INMUNOREACTIVIDAD.						

FIGURA 35
PERFIL DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN LA
MENOPAUSIA



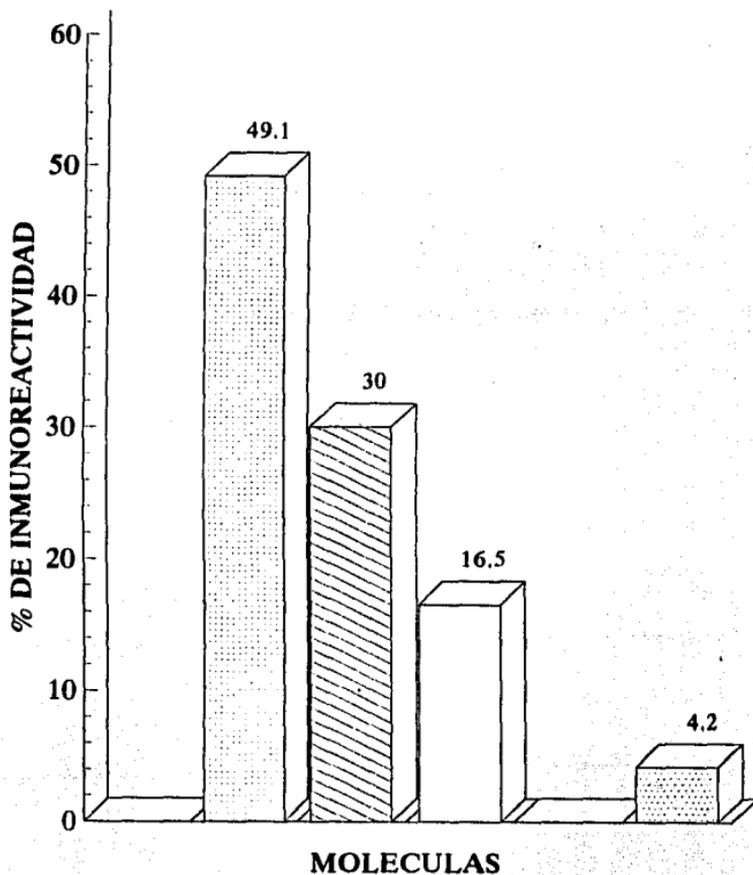
150 - 115 KD
 90 - 78 KD
 54 - 46 KD
 36 KD
 24
 16 - < 8

FIGURA 36
PERFIL DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
(Síndrome de ovarios poliquísticos)



■ 150 - 115 KD ■ 90 - 78 KD ■ 54 - 46 KD ■ 36 KD ■ 24 ■ 16 - < 8

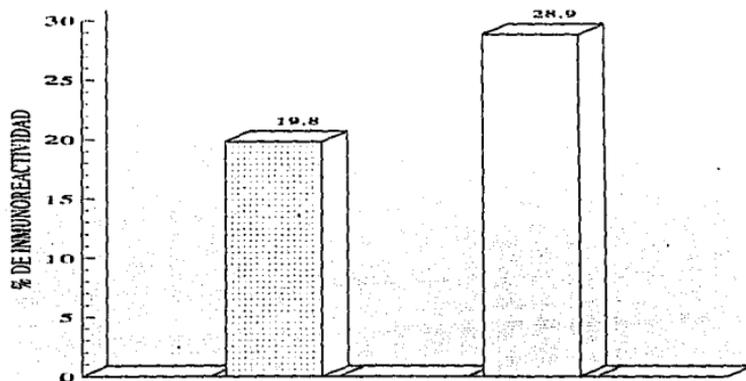
FIGURA 37
PERFIL DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
(Embarazo)



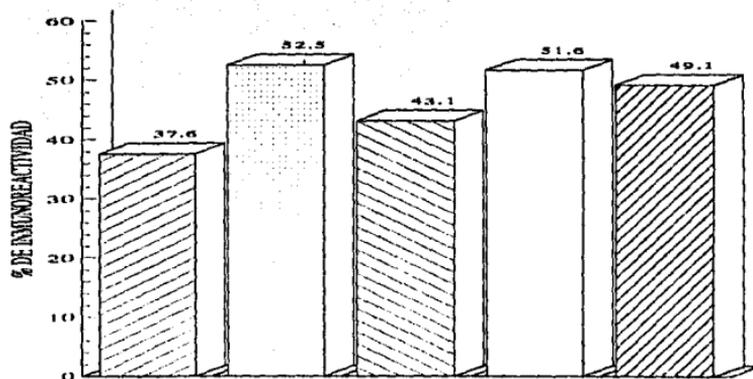
■ 150 - 115 KD □ 90 - 78 KD ▨ 54 - 46 KD □ 36 KD ▩ 24 ▤ 16 - < 8

FIGURA 38
FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN LA MUJER

150 - 115 KD



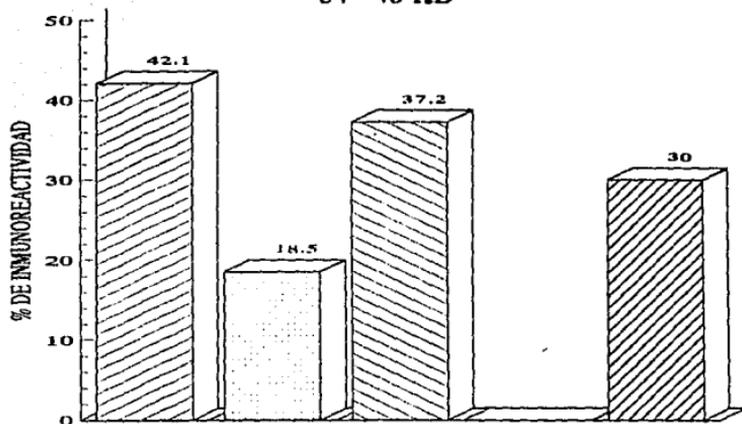
90 - 78 KD



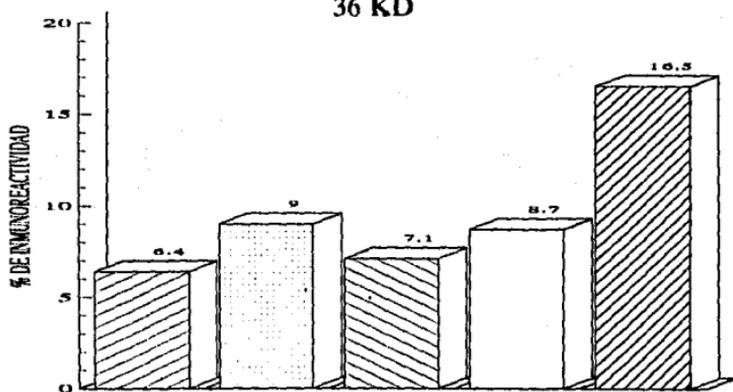
- CICLO MENSTRUAL
 MENOPAUSIA SIN Tx
 MENOPAUSIA CON Tx
 OVARIO POLIQUISTICO
 EMBARAZO

FIGURA 39
FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN LA MUJER

54 - 46 KD



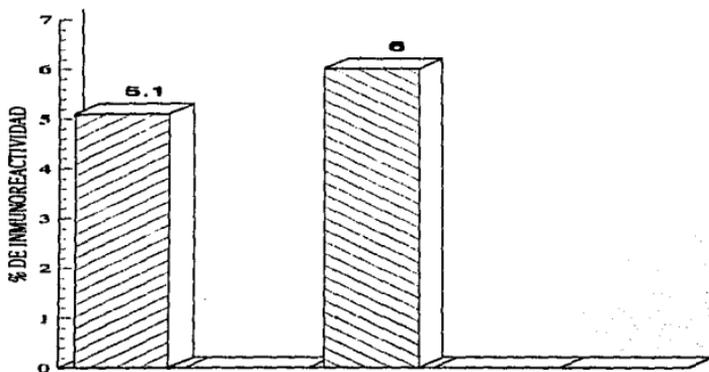
36 KD



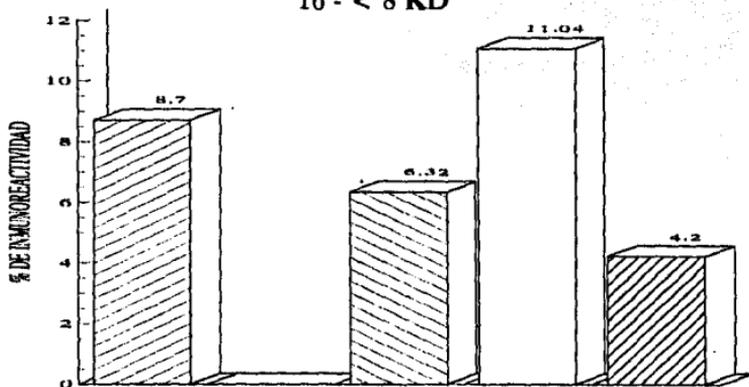
CICLO MENSTRUAL
 MENOPAUSIA SIN Tx
 MENOPAUSIA CON Tx
 OVARIO POLIQUISTICO
 EMBARAZO

FIGURA 40
FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN LA MUJER

24 KD



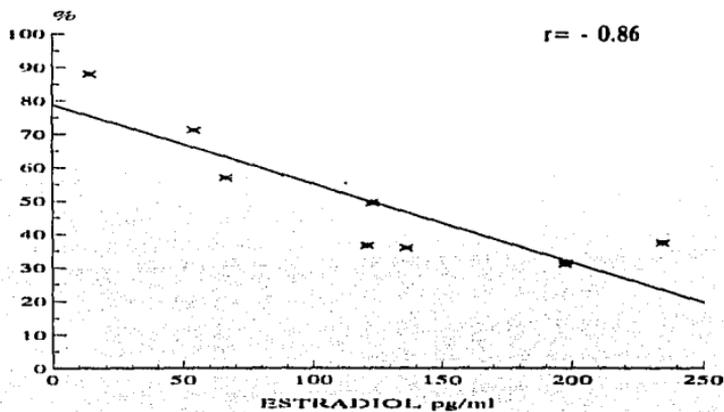
16 - < 8 KD



- CICLO MESTRUAL
 MENOPAUSIA SIN Tx
 MENOPAUSIA CON Tx
 OVARIO POLIQUISTICO
 EMBARAZO

FIGURA 41
CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
CON LA CONCENTRACION DE ESTRADIOL

90 - 78 KD



54 - 46 KD

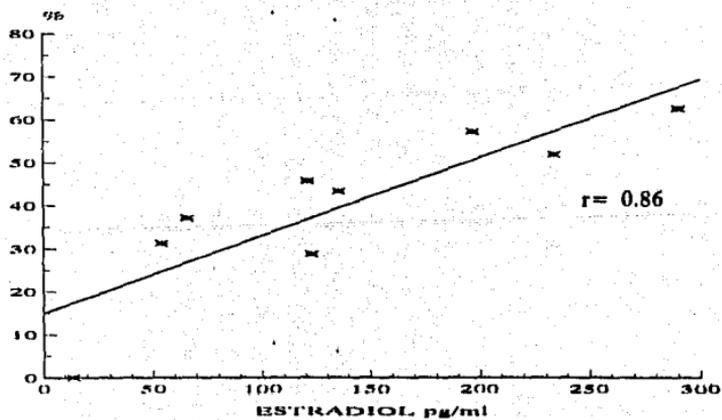
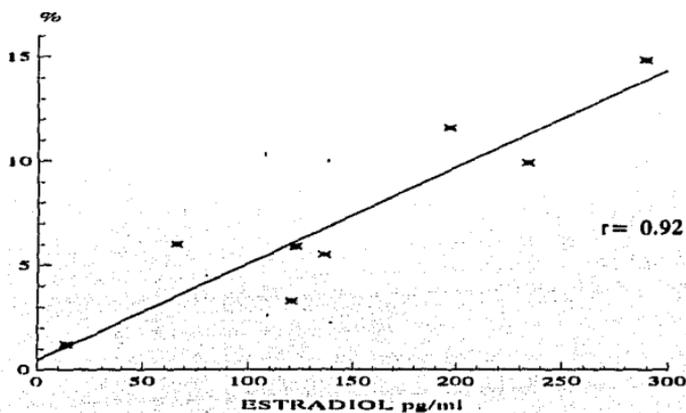
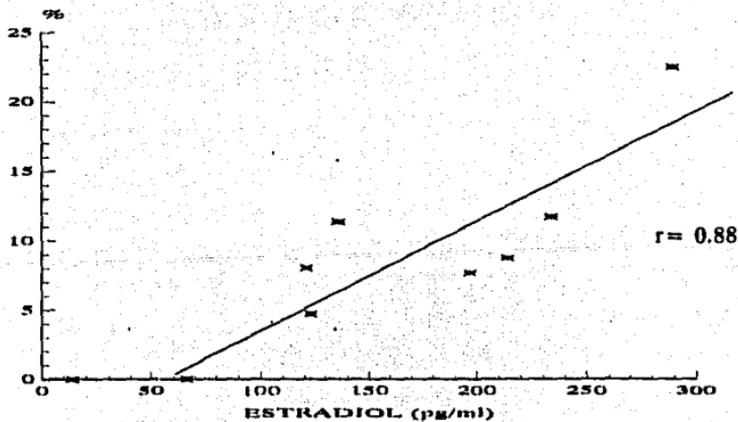


FIGURA 42
CORRELACION DE LAS FORMAS MOLECULARES DE SHBG
CON LA CONCENTRACION DE ESTRADIOL

36 - 24 KD



16 - <8 KD



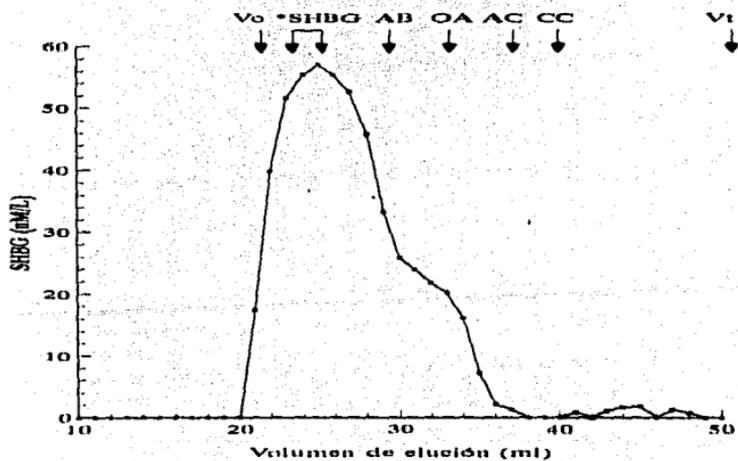
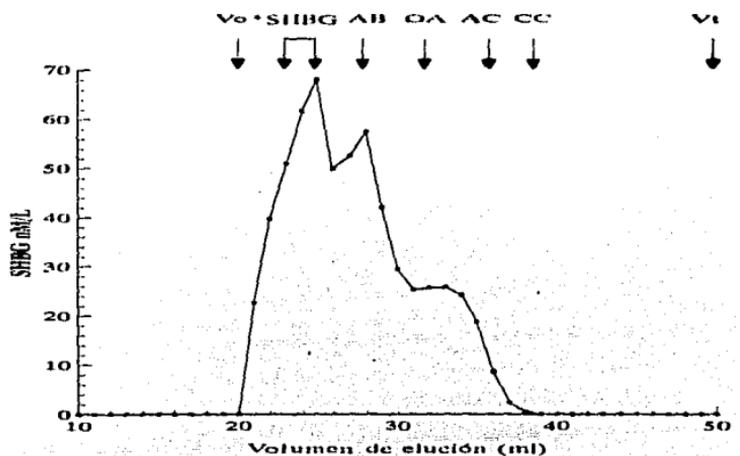
VII.-PERFILES MOLECULARES DE LA SHBG EN PACIENTES CON ALTERACIONES DE LA GLANDULA TIROIDES.

En los pacientes con hipertiroidismo (del sexo masculino), los perfiles de elución (figura 43) fueron diferentes a los de otros casos estudiados, debido a la ausencia de la molécula de 135-115 kDa y una marcada elevación de las formas monoméricas de 54-46 y 36 kDa eluidos en las fracciones 28 y 32 respectivamente en cambio la molécula de 24 kDa no fué detectable.

En el hipotiroidismo (figura 44) predominó el dímero de la globulina y los monómeros están disminuidos, en comparación con los observados en los casos de hipertiroidismo.

La distribución cuantitativa de las diferentes formas moleculares en el suero de estos pacientes se encuentra en la tabla 12, en comparación con su proporción en los sujetos normales, siendo pertinente aclarar que en los casos de hipotiroidismo los sueros cromatografiados fueron de mujeres, mientras que los de hipertiroidismo correspondieron a pacientes del sexo masculino. La representación gráfica de estos valores se muestran en la figura 45 y 46 respectivamente.

FIGURA 43
PERFIL DE ELUCION DE LA SHBG EN PACIENTES CON
HIPERTIROIDISMO



· FIGURA 44
PERFIL DE ELUCION DE LA SHBG EN PACIENTES CON
HIPOTIROIDISMO

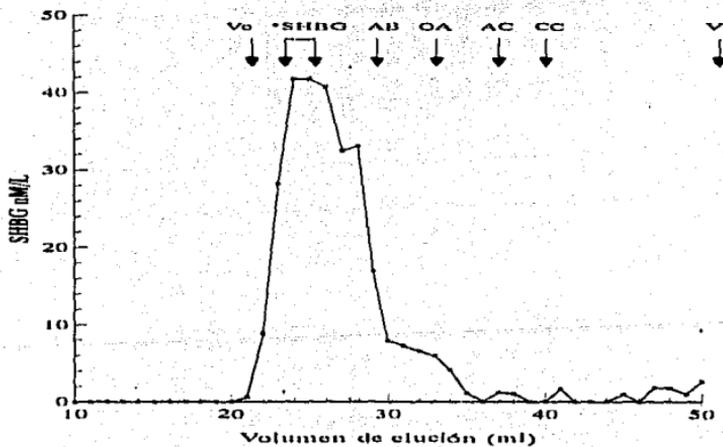
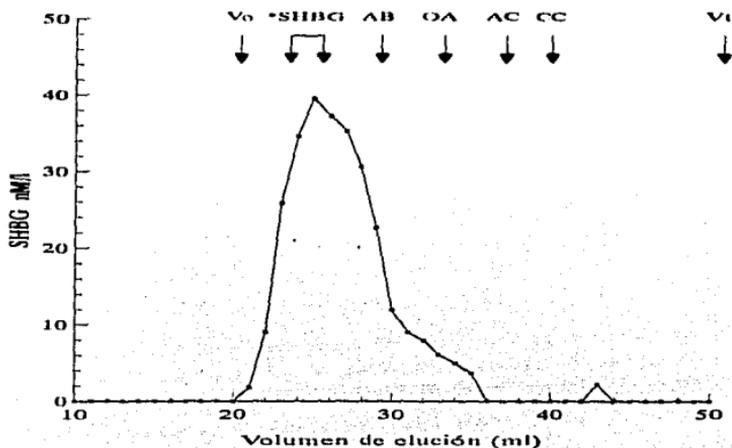


TABLA 12.-FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN AL TERACIONES DE LA TIROIDES
(% DE INMUNOREACTIVIDAD)

MOLECULA PM	1 150 - 115 kDa	2 90 kDa	3 46 kDa	4 36 kDa	5 24 kDa	FRAGMENTOS 16 - < 8 kDa
HIPOTIROIDISMO	—	54.5 ± 1.7	33.4 ± 2.4	9.85 ± 1.48	—	2.19 ± 2.1
NORMAL (MUJERES)	—	37.6 ± 6.4	42.1 ± 15.6	6.4 ± 4.2	5.1	8.7 ± 3.2
HIPERTIROIDISMO	—	50.02 ± 1.67	31.78 ± 2.4	17.38 ± 0.08	—	0.76 ± 0.7
NORMAL (HOMBRES)	28.8 35	42.5 ± 30	10 ± 7.5	7.7 ± 6.7	—	9.8 ± 3.14

FIGURA 45
FORMAS MOLECULARES DE SHBG EN ALTERACIONES DE LA TIROIDES
(Mujeres)

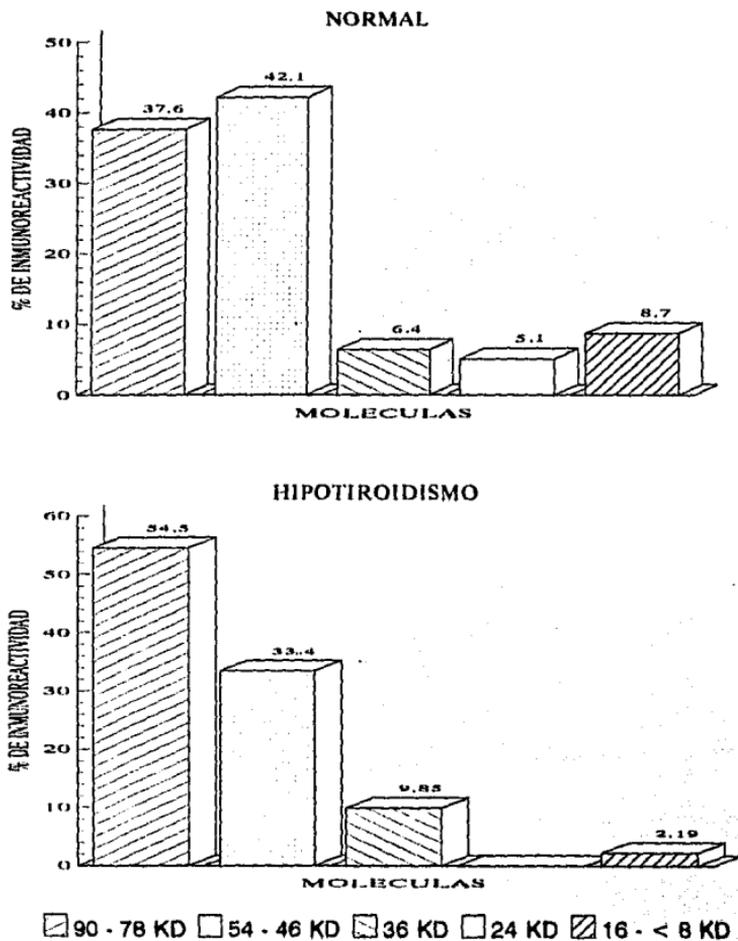
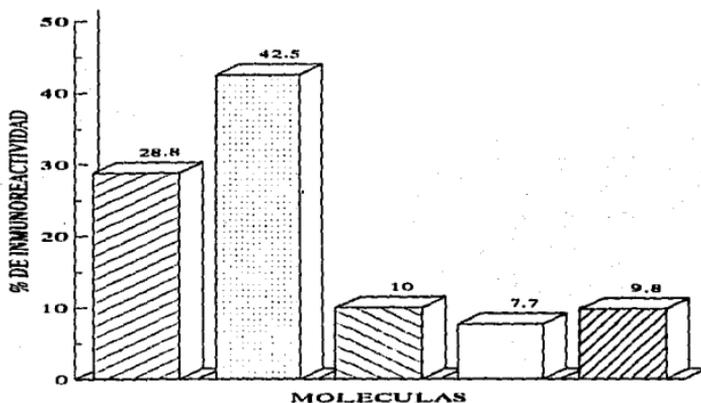
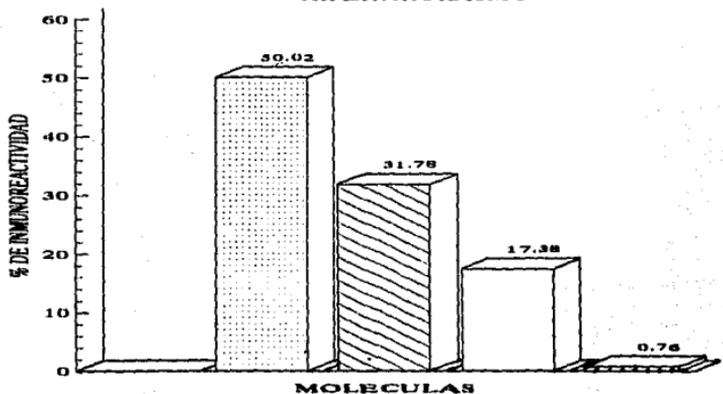


FIGURA 46
FORMAS MOLECULARES DE LA SHBG EN ALTERACIONES DE LA TIROIDES
(Hombres)

NORMALES



HIPERTIROIDISMO



□ 150 - 115 KD □ 90 - 78 KD ▨ 54 - 46 KD □ 36 - 24 KD ▩ 16 - <8 KD

VIII.- ESTUDIO DEL ACIDO SIALICO.

1.-Cuantificación.

La concentración de ácido siálico, determinada para conocer el grado de glicosilación de los sueros en los pacientes estudiados, se indican en la tabla 13.

A) En el hombre.

Puede observarse que la menor concentración de ácido siálico se encontró en los sueros de hombres normales, estando significativamente más elevada en los sueros de hombres con hipogonadismo ($p < 0.001$). Cuando los hombres normales e hipogonadales fueron sometidos a la prueba de estimulación testicular con hCG, se observó una respuesta diferente en los dos grupos. En los hombres normales, el contenido de ácido siálico se elevó en forma importante (72 % sobre las cifras basales) mientras que en los hombres hipogonadales disminuyó un 20 %.

B) En las mujeres.

- Ciclo MestruaL.

La más alta concentración se obtuvo, en aquellas en edad reproductiva durante el ciclo mestruaL normal, siendo los niveles de la fase ovulatoria (día 13 del ciclo) ligeramente más elevados que en la fase lútea (día 21), 1779 y 1729 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, las diferencias no son significativas. En cambio en la fase post-ovulatoria (día 15) la concentración de ácido siálico fue 1001.39 $\mu\text{g/ml}$, significativamente menor que en la fase ovulatoria y la fase lútea ($p < 0.001$)

La media de concentración de SHBG de todas las determinaciones efectuadas durante el ciclo mestruaL fué de $1503 \pm 355 \mu\text{g/ml}$.

- Menopausia.

En mujeres menopáusicas, la concentración de ácido siálico fue 35 % menor que en las mujeres jóvenes, y ligeramente más elevada que en los hombres, sin embargo cuando las mujeres fueron sometidas a tratamiento con estrógenos (350 μg diarios de estrógenos conjugados) el contenido de ácido siálico se elevó, alcanzando cifras similares a las observadas durante el ciclo mestruaL normal (tabla 13).

- Embarazo.

En los sueros de embarazo correspondientes al primero y tercer trimestre de la gestación, la concentración media del ácido siálico fué de $1093 \pm 260 \mu\text{g/ml}$.

- Ovario Poliquistico (SOP).

Los sueros de las pacientes con SOP tuvieron una concentración baja de ácido siálico en relación a los sueros de las mujeres normales, similares a las observadas en la menopausia no tratada, y ligeramente más elevada que en los hombres.

- Alteraciones de la función tiroidea.

En los sueros de mujeres con hipotiroidismo, el contenido de ácido siálico, fué 15 % menor que en las mujeres normales, mientras que en los casos de hipertiroidismo (todos ellos hombres) la concentración de ácido siálico se encontró significativamente más elevada ($p < 0.001$) que en los normales.

2.-PERFIL DE GLICOSILACION DEL ACIDO SIALICO EN LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS DE LA SHBG.

1.- En el hombre.

La figura 47 es un ejemplo representativo del perfil de elución del ácido siálico en el suero de los hombres normales. En la gráfica superior se muestra, el perfil obtenido en condiciones basales, mientras que la figura inferior corresponde al perfil cromatográfico del ácido siálico post-estimulación. En las ordenadas se indica la concentración del ácido siálico y en las abscisas el volumen de elución, llamando la atención que los perfiles del ácido siálico y la SHBG presentan una gran similitud y coinciden respecto a su V_e . Los números entre paréntesis sobre los picos corresponden al PM de las isoformas de la SHBG que normalmente eluyen en el sitio donde aparecen los picos de ácido siálico, a fin de relacionarlos.

Por la altura de las escalas puede verse que la concentración de ácido siálico fué ligeramente mayor post-estimulación con hCG, lo que ya se había observado al determinar el contenido total de ácido siálico en los sueros tabla 13.

En condiciones basales, los picos de mayor contenido de ácido siálico se localizaron, en el volumen de elución de los oligómeros, el dímero 90 kDa y en los monómeros de 54 y 36 kDa, con menor proporción en las isoformas de 24 y 18 kDa, y solo trazas de siálico en los fragmentos de muy bajo peso molecular.

- Post-estimulación con hCG.

Destaca la notable disminución del contenido de ácido siálico en la región del dímero de SHBG (90 kDa), de la isoforma de 38-36 kDa y el fragmento 18-16 kDa incrementando en cambio su proporción en la región del monómero de 54 kDa y el fragmento de 12 kDa. El hecho de que disminuye el monómero de 38 y aumenta el de 54 kDa probablemente implica que el monómero ligero se está glicosilando y transformando en el monómero pesado.

La figura 48 muestra el perfil de elución del ácido siálico en un hombre con hipogonadismo, pre y post estimulación con hCG, en los que se observa en relación a los perfiles normales, la baja glicosilación de la molécula de 90 kDa, sobre todo post-estimulación con hCG, así como un incremento en la región de los fragmentos. La figura 49 compara el perfil normal de glicosilación con el del hipogonadismo, para hacer notar las diferencias en las fracciones correspondientes al dímero de 90 kDa y los monómeros de 54 kDa a 46 kDa así como la disminución de la glicosilación en la isoforma de 36 kDa; además ligera elevación en el área de los fragmentos.

La figura 50 corresponde a los perfiles de glicosilación obtenidos post-estimulación con hCG en el suero de un hombre normal, en comparación con uno de hipogonadismo; se observan fácilmente los cambios mencionados anteriormente para la figura 49, destacando la marcada disminución de ácido siálico en la región del oligómero y el dímero (sobre todo de este último), así como un recambio del contenido de ácido siálico de los monómeros de 54 a 46 kDa y de 36 a 24 kDa, ya observado en los perfiles de elución de la SHBG lo que indica una posible deglicosilación.

La proporción cuantitativa de ácido siálico ($M \pm DE$) en las fracciones correspondientes al sitio de elución de las diferentes moléculas de la SHBG, se presenta como un porcentaje de la concentración total en la tabla 14. En condiciones normales cerca del 20 % se encontró en la región

del oligómero, 30 % en el dímero, aproximadamente 40 % en los monómeros y un 10-15 % en los fragmentos. Post-estimulación con hCG el contenido de ácido siálico disminuyó en la región del dímero y aumentó en los monómeros y en los fragmentos. En los hombres con hipogonadismo se hizo más notable la disminución del ácido siálico en el oligómero y en el dímero, aumentando significativamente en los fragmentos.

3.- ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LA SHBG.

1.-En el hombre.

Conociendo la concentración de la SHBG y del ácido siálico en cada una de las fracciones de la cromatografía, se calculó el contenido de ácido siálico/nM de SHBG, obteniéndose así los perfiles como el de la figura 51 que correspondió a la actividad específica del ácido siálico en las diferentes isoformas de la SHBG en el suero de un hombre normal, pre y post estimulación con hCG.

En condiciones basales, la actividad específica del ácido siálico osciló en las diferentes formas moleculares de 10-40 µg de ácido siálico/nM de SHBG, presentando la mayor actividad en el oligómero y en un fragmento de bajo peso molecular (< 8 kDa) con menor actividad en el dímero (90 - 78 kDa) y los monómeros de 54 y 36 kDa, así como en un fragmento de 24 kDa. Después de la estimulación la actividad específica del ácido siálico en las isoformas cambió, disminuyendo drásticamente en el oligómero y el dímero de la SHBG, mientras que su contenido se elevó considerablemente (5 - 6 veces) en los monómeros de 54 y 36 kDa, así como en el fragmento de 24 kDa.

La figura 52 muestra los resultados del suero de un hombre con hipogonadismo. Se observa el contenido de ácido siálico en el oligómero (135-115 kDa) y el monómero de 36 kDa, llamando la atención la baja actividad específica del ácido siálico en la región del dímero y el monómero de 54 kDa en las fracciones 24, 25 y 27-29 respectivamente. En cambio la actividad específica fue elevada en los fragmentos de 18-16 y < 8 kDa. Posterior al tratamiento con hCG (figura inferior) contrario a lo que ocurrió en el grupo control, la actividad del ácido siálico aumentó en el oligómero y disminuyó

significativamente en los monómeros (54 y 36 kDa) incrementándose en los fragmentos de 24, 8 y < 8 kDa.

Estos datos parecen indicar que en condiciones normales, el dímero de la globulina, la forma molecular probablemente más activa, se encuentra poco glicosilada en comparación con el oligómero y que en ambos el contenido de ácido siálico disminuye post estimulación con hCG, no así los monómeros, que incrementan su actividad específica en especial el de 36 kDa, al igual que los fragmentos. Esto parece no ser igual en los casos de hipogonadismo en los que el dímero y el monómero de 54 kDa están poco glicosilados, disminuyendo su contenido de ácido siálico post estimulación con hCG.

TABLA 13.- CONCENTRACION DE ACIDO SIALICO

**A) EN EL SUERO DE HOMBRES
PRE Y POST-ESTIMULACION CON hCG**

GRUPO		ACIDO SIALICO ($\mu\text{g/ml}$)
NORMAL	BASAL	807.15 \pm 454.3
	POST HCG	1394.81 \pm 165.8
HIPOGONADISMO	BASAL	1317.54 \pm 341
	POST HCG	1044.05 \pm 284.15

B) EN EL SUERO DE LAS MUJERES

	ACIDO SIALICO ($\mu\text{g/ml}$)
CICLO MESTRUAL	1503 \pm 355
MENOPAUSIA SIN Tx	984 \pm 415
MENOPAUSIA CON Tx	1437 \pm 46.7
EMBARAZO	1093 \pm 260
OVARIO POLIQUISTICO	924 \pm 260

**C) EN EL SUERO DE PACIENTES CON ALTERACIONES DE LA TIROIDES
($\mu\text{g/ml}$)**

HIPOTIROIDISMO (MUJERES) 1313.8 \pm 104.30	NORMAL (MUJERES) 1503 \pm 355
HIPERTIROIDISMO (HOMBRES) 1715 \pm 39.8	NORMAL (HOMBRES) 807.15 \pm 454

FIGURA 47
PERFIL DE GLICOSILACION EN HOMBRES NORMALES
 (Pre y post-estimulación con HCG)

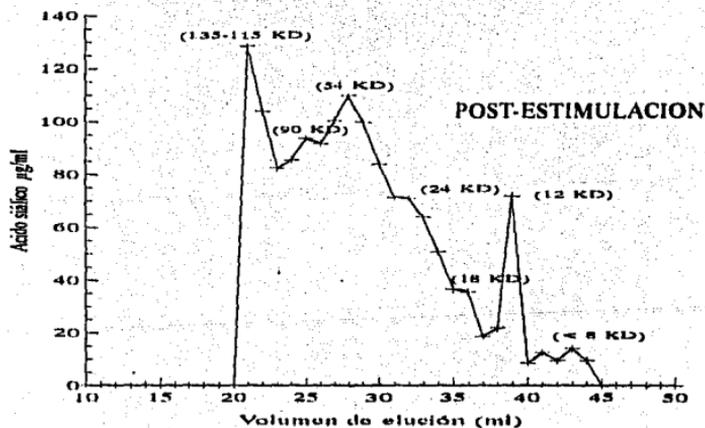
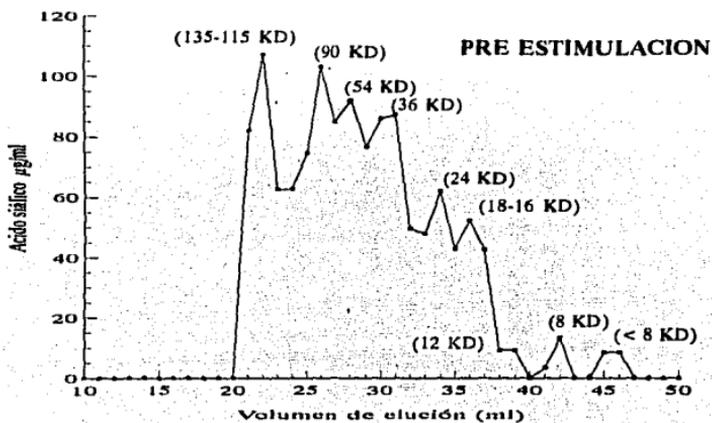


FIGURA 48
PERFIL DE GLUCOSILACION EN HOMBRES CON HIPOGONADISMO
 (Pre y post-estimulación con HCG)

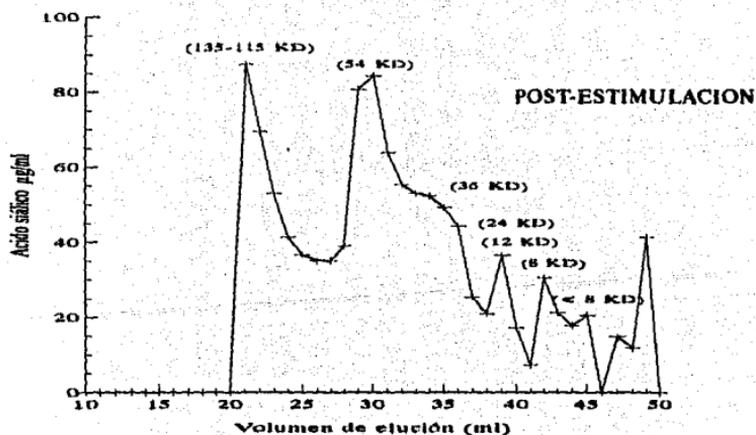
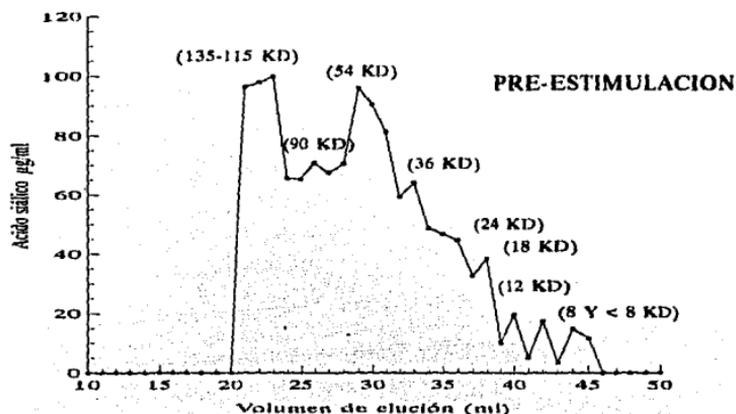


FIGURA 49
PERFIL DE GLICOSILACION EN HOMBRES
 (Pre-estimulación con HCG)

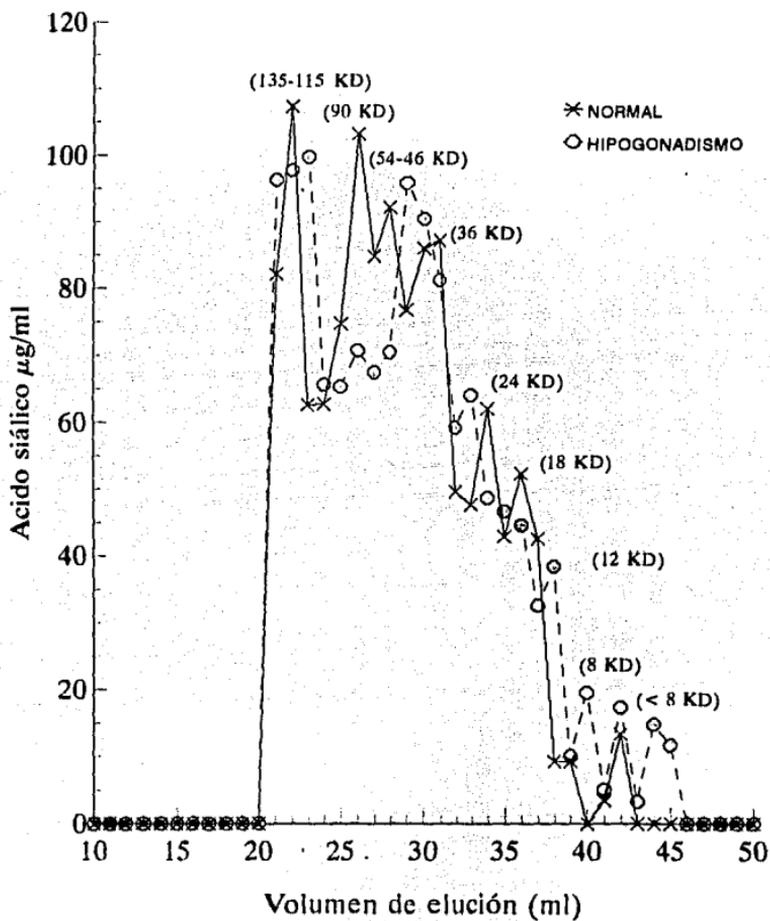


FIGURA 50
PERFIL DE GLICOSILACION EN HOMBRES
 (Post-estimulación con HCG)

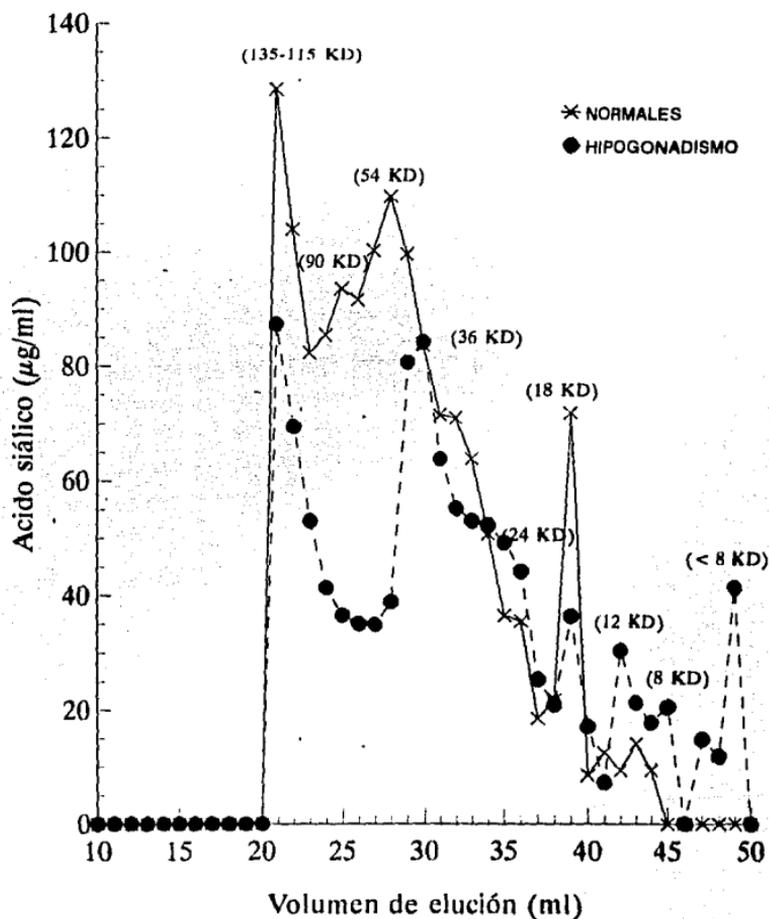
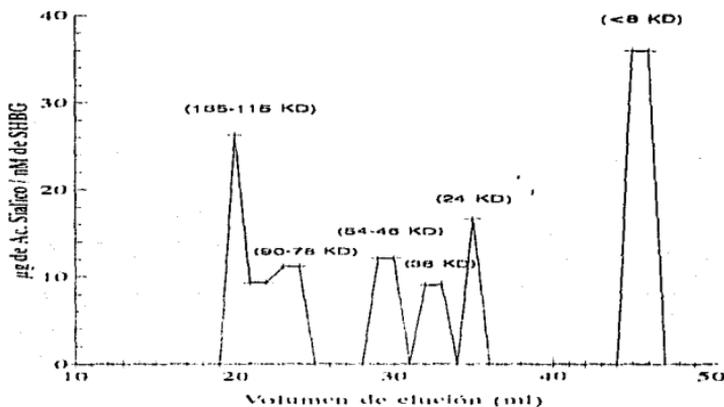


TABLA 14.- DISTRIBUCION DEL ACIDO SIALICO (%) EN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A LAS ISOFORMAS DE LA SHBG EN EL HOMBRE

MOLECULA		OLIGOMERO	DIMERO	MONOMEROS	FRAGMENTOS
PESO MOLECULAR (kDa)		(135 - 115)	(90 - 70)	(54 - 46) (38 - 36)	(24 - < 8)
	BASAL	20 ± 11.9	29.3 ± 4.0	35.0 ± 15.2	14.6 ± 8.1
NORMALES	POST HCG	22.4 ± 0.7	21.4 ± 6.5	43.4 ± 6.3	12.8 ± 9.1
	BASAL	21.4 ± 3.4	20.9 ± 1.96	38.6 ± 3.8	19.8 ± 5.5
HIPOGONADISMO	POST HCG	19.8 ± 0.8	14.9 ± 2.6	39.6 ± 9.1	26.4 ± 8.6

FIGURA 51
ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL ACIDO SIALICO EN LA
CROMATOGRAFIA DE SHBG EN HOMBRES NORMALES
 (Estimulación con HCG)

A) PRE-ESTIMULACION



B) POST-ESTIMULACION

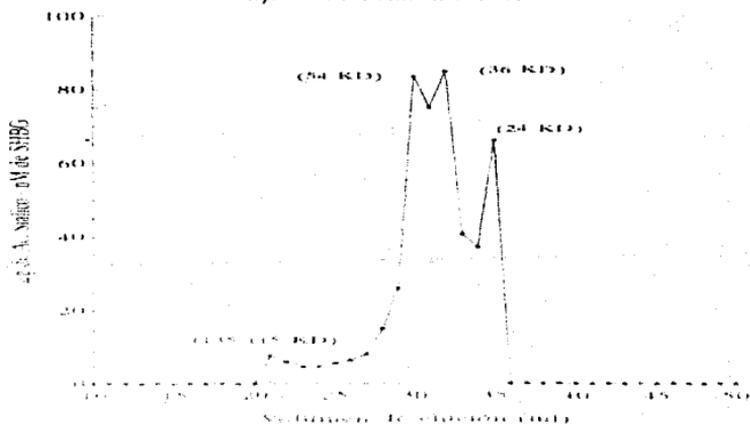
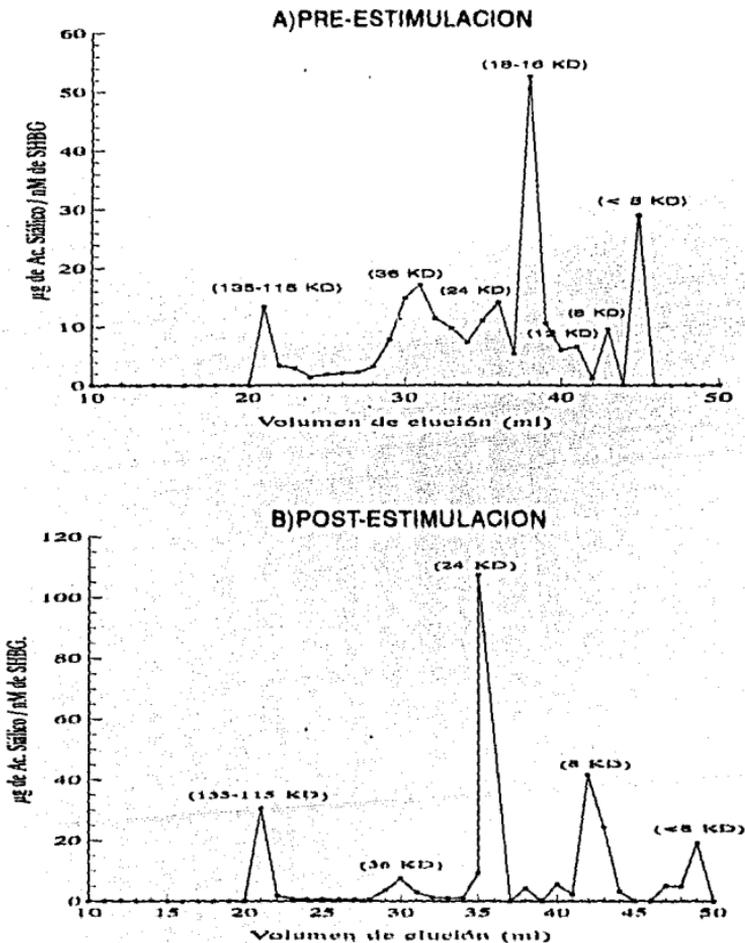


FIGURA 52
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ACIDO SIALICO EN LA
CROMATOGRAFIA DE SHBG
 (Hombres con hipogonadismo estimulados con HCG)



II.-En la mujer.

a) Ciclo Mestrua Normal.

Un ejemplo representativo de los perfiles cromatográficos del ácido siálico en los sueros de mujeres en diferentes fases del ciclo mestrua normal se presenta en la figura 53, en la que puede verse la distribución del ácido siálico en las fracciones cromatográficas correspondientes a las diferentes formas moleculares de la SHBG (las que se indican por el número que se localiza sobre los picos del ácido siálico, número que corresponde al peso molecular de las isoformas que eluyen en las fracciones indicadas).

En la figura de la parte superior se representan los perfiles de elución del ácido siálico en los días 13 (•) y 15 (+) del ciclo mestrua normal, en fase ovulatoria y post-ovulatoria respectivamente. Puede observarse que en el día 13 el contenido del ácido siálico en las diferentes isoformas de la SHBG fue mayor que en el día 15, con picos de ácido siálico en las fracciones correspondientes al oligómero (135-115 kDa) y al dímero (90-78 kDa) en una proporción importante, después en las fracciones del monómero de 54 kDa el pico predominante, seguido de otro en la región del monómero ligero (36 kDa) y en los fragmentos de 24 y 12 kDa.

En el día 15 del ciclo, el perfil cambió disminuyendo notablemente el contenido de ácido siálico en el oligómero, el dímero y los dos monómeros y solo se incrementó ligeramente en los fragmentos pequeños (8 y < 8 kDa) por lo que puede decirse que en la fase post-ovulatoria la glicosilación de las moléculas de la SHBG está disminuida.

En el día 21 del ciclo (figura inferior) el contenido del ácido siálico en las isoformas volvió a incrementarse a concentraciones similares a las de la fase preovulatoria, sobre todo en el oligómero y el monómero de 54 kDa y menor proporción en el dímero y el monómero ligero (36 kDa) así como en los fragmentos de 24 kDa y otros de menor peso molecular.

b) Ovario Poliquístico (SOP).

Los perfiles de glicosilación o distribución del ácido siálico en las fracciones cromatográficas del suero de una mujer con ovarios poliquísticos, se presentan en la figura 54; en la parte superior el

perfil de elución en el día 7 y en la parte inferior el correspondiente al día 21. Ambos son similares respecto a los picos que se observan, sin embargo el contenido de ácido siálico fue menor en el día 21, y también menor que la concentración de ácido siálico en el día 21 del ciclo menstrual normal; no obstante los perfiles de elución del ácido siálico también son semejantes a los normales, aunque en los casos de ovario poliquístico la proporción de las formas grandes (oligómero y dímero) está aumentada ligeramente pero las diferencias no son significativas.

c) Perfil de Glicosilación en la Menopausia.

Durante la menopausia no tratada, el perfil de elución del ácido siálico presentado en la figura 55 (gráfica superior) aunque también similar al perfil de glicosilación del ciclo menstrual normal, mostró algunas diferencias, consistentes en una elevación del contenido de ácido siálico en el oligómero de la globulina (135 - 115 kDa) y de los monómeros, con una disminución importante de la proporción de ácido siálico en los fragmentos de bajo peso molecular. Después que las pacientes fueron tratadas con estrógenos, el perfil de glicosilación cambió disminuyendo el contenido de ácido siálico en las formas grandes, y en los monómeros, incrementándose en los fragmentos de 18 - 16, 12 y 8 kDa.

d) Embarazo.

Los perfiles de elución del ácido siálico en los sueros de dos pacientes embarazadas se muestran en la figura 56. En uno de ellos (figura superior) aunque el mayor contenido de ácido siálico se localizó en el dímero (90 - 78 kDa) con menor proporción en el oligómero y el monómero de 36 kDa, que no obstante tuvo una proporción elevada y el fragmento de 24 kDa, no detectándose glicosilación en los fragmentos de menor peso molecular; pero el hecho sobresaliente es la elevada proporción de ácido siálico en los monómeros con picos claramente visibles sobre todo en el monómero de 36 kDa.

En otro de los casos estudiados (figura inferior) el mayor contenido de ácido siálico se tuvo en el oligómero y el dímero de la SHBG, en menor proporción en los monómeros y los fragmentos.

Los porcentajes de ácido siálico para cada una de las isoformas de la globulina en la mujer en las diferentes situaciones clínicas estudiadas se encuentran en la tabla 15, donde además se indica en la última columna del lado derecho, la concentración total de ácido siálico/ml de suero.

III.- Perfil de glicosilación en Alteraciones de la Función Tiroidea.

El perfil representativo de la glicosilación de la SHBG en los casos de la mujeres con hipotiroidismo que se analizaron (figura 57 gráfica superior) se caracterizó por presentar una elevada proporción de ácido siálico en los monómeros de 54 y 36 kDa y ligeramente menor en el oligómero y el dímero, con baja proporción en los fragmentos de bajo peso molecular.

En los casos de hipertiroidismo (figura 57) el perfil de glicosilación de la SHBG fué muy diferente de todos los anteriores con elevado contenido de ácido siálico en prácticamente todas las isoformas de la SHBG sobre todo en las formas grandes y los monómeros. Los porcentajes de ácido siálico en las diferentes formas moleculares de la SHBG en estos pacientes se presentan en la tabla 16 para su análisis.

FIGURA 53
 PERFIL DE ACIDO SIALICO EN EL CICLO MESTRUAL NORMAL

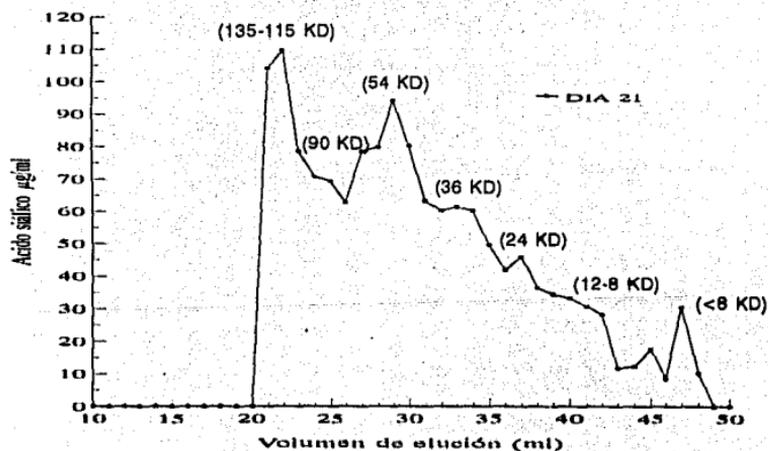
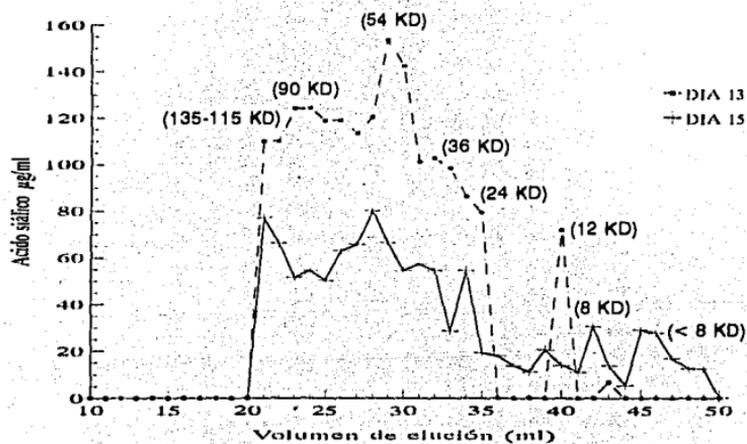


FIGURA 54
PERFIL DE GLICOSILACION EN MUJERES
 (Ovarios poliquísticos)

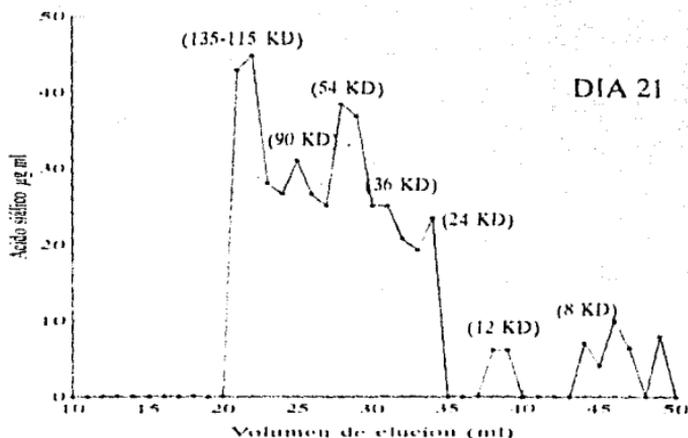
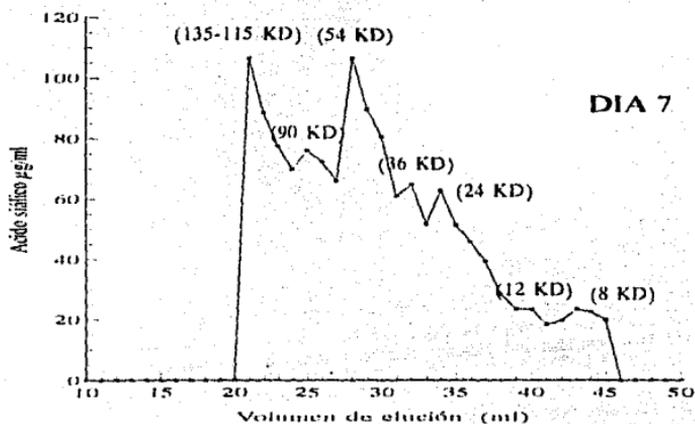


FIGURA 55
 PERFIL DE GLICOSILACION EN MUJERES MENOPAUSICAS

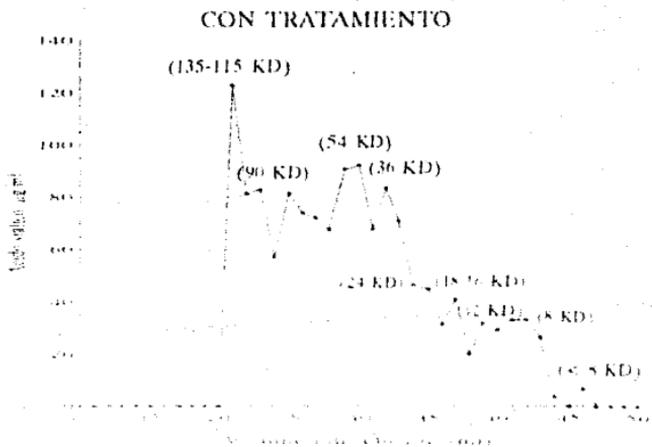
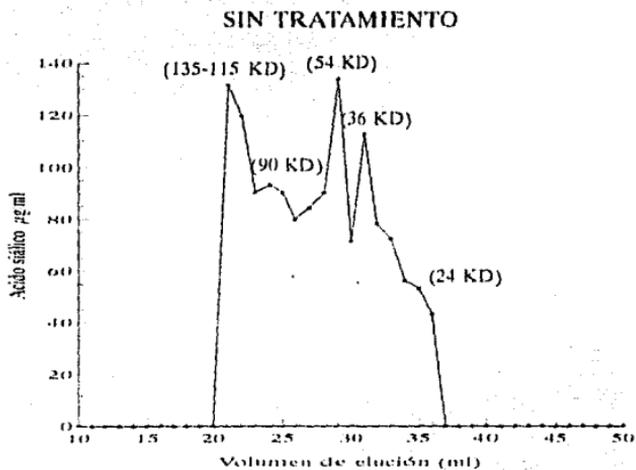


FIGURA 56
PERFIL DE GLICOSILACION EN LA CROMATOGRAFIA DE
SHBG EN EL EMBARAZO

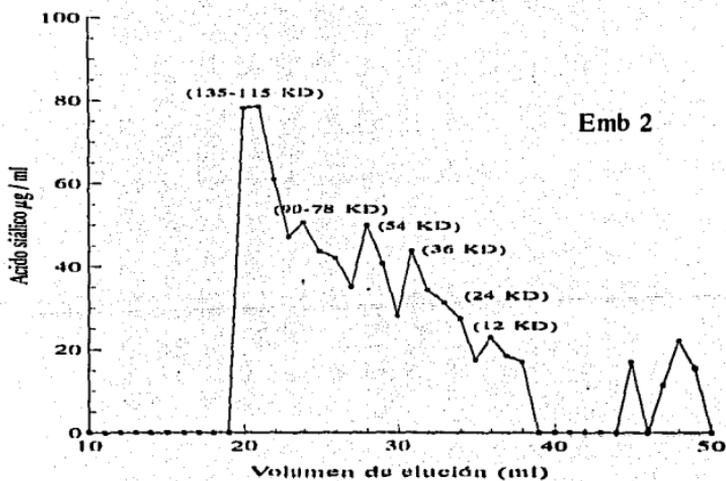
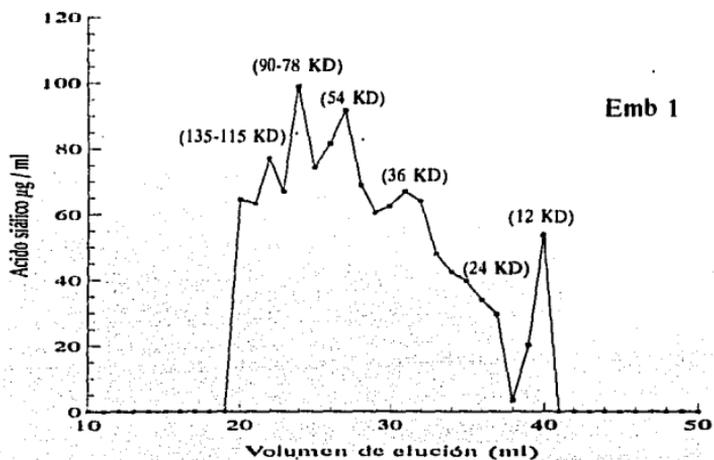
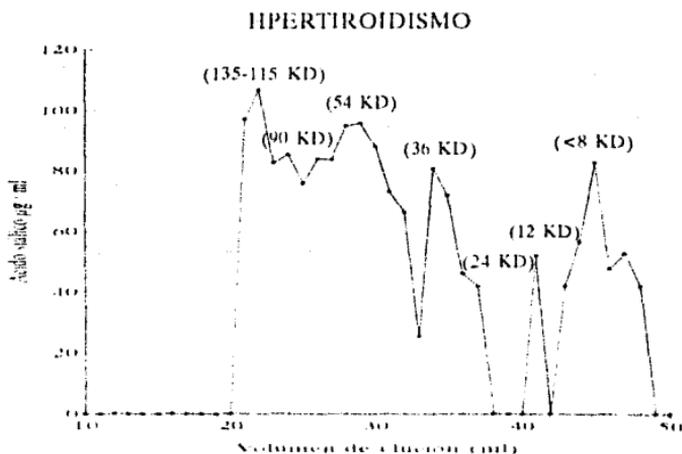
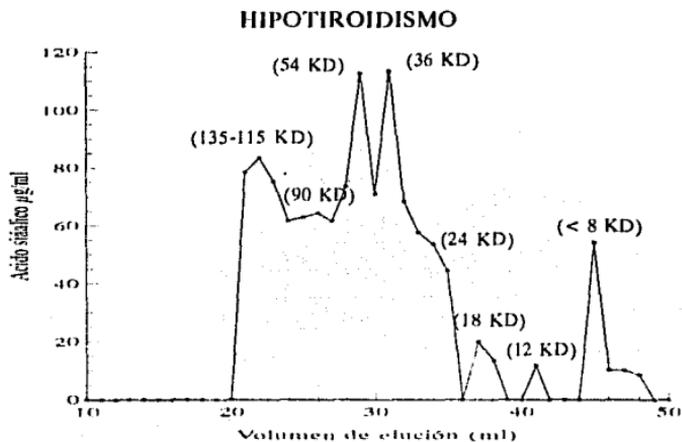


TABLA 15.-ACIDO SIALICO EN LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A LAS MOLECULAS DE SHBG (%) EN MUJERES

MOLECULA PESO MOLECULAR	OLIGOMERO 135 - 115 KD	DIMERO 90 - 78 KD	MONOMERO		FRAGMENTOS		ACIDO SIALICO (µg/ml)
			54 - 46 KD	36 KD	24 KD	< 8 KD	
CICLO MESTRUAL (F. PREEV.) DIA 13 (F. OVUL.) DIA 15 (F. LUTEA) DIA 21	19.3	20.3	29.7	16.9	9.3	4.38	1779.33
	19.4	16.6	18.5	13.9	9.1	21.78	1001.39
	21.3	15.5	21.85	15.95	13.9	12.65	1729.21
OVARIOS POLIQUISTICOS DIA 7 DIA 21	19.6	15.7	24.7	12.8	11.5	15.7	1387.16
	25.0	23.7	27.2	13.7	—	10.2	461.35
MENOPAUSIA SIN Tx CON Tx	24.4	18.3	29.1	13.9	13.75	—	984
	21.9	16.3	32.0	11.2	7.05	11.3	1437
EMBARAZO	23.0	20.3	15.6	17.15	11.5	12.1	1093.78

FIGURA 57
PERFIL DE GLICOSILACION DE LA SHBG EN ALTERACIONES
DE LA GLANDULA TIROIDES



**TABLA 16.-CONTENIDO DE ACIDO SIALICO (%) EN LAS FRACCIONES
CORRESPONDIENTES A LA SHBG EN MUJERES**

MOLECULA PM	OLIGOMERO 150 - 115 KD	DIMERO 90 - 78 KD	MONOMEROS 54 - 46 Y 36 KD	FRAGMENTOS (24, 16, 12 Y < 8 KD)
CICLO MESTRUAL	20 ± 0.9	17.4 ± 2.0	38.95 ± 5.8	23.6 ± 7.3
OVARIOS POLIQUISTICOS (SOP)	22.3 ± 2.7	19.7 ± 4.0	39.2 ± 1.7	18.7 ± 8.4
MENOPAUSIA SIN Tx	24.4 ± 0.2	18.35 ± 0.4	42.9 ± 2.9	13.7 ± 2.9
MENOPAUSIA CON Tx	21.9 ± 1.3	16.3 ± 1.1	44.0 ± 10.2	18.35 ± 0.9
EMBARAZO	23 ± 3.0	20.4 ± 1.6	32.7 ± 1.2	23.6 ± 4.75

estudio. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Kirschner y colaboradores (28) quienes establecieron que el incremento de andrógenos en la mujer, producía una disminución de la SHBG.

Todos estos hallazgos hablan a favor de una regulación positiva de la SHBG por los estrógenos y un efecto negativo por parte de la testosterona y están de acuerdo a lo informado previamente (29). Por otra parte los resultados del estudio realizado en hombres normales y en aquellos que no obstante tener solo una moderada disminución de la concentración de testosterona presentaban datos clínicos de hipogonadismo (n=15) se pensó que una probable elevación de la SHBG podía ser la causa de las alteraciones (razón por la cual fueron seleccionados) sin embargo la concentración de la globulina no fué estadísticamente diferente; en cambio pudo demostrarse que la concentración de E_2 y sobre todo la relación E_2/T se encontraban más elevadas que en los sujetos normales, lo cual puede dar también una explicación razonable a los hallazgos clínicos. Postestimulación con hCG la concentración de la SHBG no se modificó a pesar del incremento significativo de los estrógenos y de la relación E_2/T , debido quizás a que también aumentó simultáneamente la testosterona, pudiendo haberse compensado el efecto de ambas hormonas, hecho que ha sido ya mencionado en la literatura (30).

Respecto a las dos hombres hipogonadales con una concentración normal de testosterona y niveles elevados de ambas gonadotropinas en especial de LH por un cuadro de resistencia a andrógenos a nivel de los receptores la concentración de la SHBG se encontró elevada, debido a que al no poder actuar la testosterona, predominó el efecto positivo de los estrógenos, aumentando la SHBG a cifras similares a las encontradas en el suero de las mujeres normales. En base a esto se ha pensado, que la determinación de la SHBG puede ser una prueba de utilidad para evaluar el grado de resistencia a los andrógenos, ya que su elevación es proporcional al grado de resistencia a la acción de la testosterona.

Por otra parte, los estudios de correlación efectuados entre la concentración de las hormonas y la SHBG pusieron de manifiesto algo no mencionado anteriormente en la literatura, y es la observación de que en la regulación de la globulina por los esteroides sexuales existe un marcado

"dimorfismo sexual" es decir un mecanismo de regulación diferente, dependiente del sexo ya que la respuesta de la SHBG a estradiol y testosterona fué diferente en los hombres y en las mujeres. En el hombre (donde la concentración de T es elevada) la SHBG tuvo una correlación lineal positiva con la concentración de testosterona ($r=0.56$) tanto en condiciones basales como post-estimulación con hCG, mientras que en las mujeres (donde la T se encuentra baja), la relación fué negativa ($r= - 0.66$) disminuyendo la globulina al aumentar la testosterona tal como ocurrió en los casos de ovario poliquístico y menopausia.

A la vez en el hombre, en el que los estrógenos se encuentran normalmente bajos, su concentración mostró una marcada relación negativa ($r= - 0.707$) con la SHBG e igual ocurrió en la relación E_2/T ($r= - 0.724$). Este efecto también se observó en los hombres con hipogonadismo en los que probablemente influyen dos factores: a) por una parte la disminución de la testosterona y b) el incremento de la concentración de E_2 y de la relación E_2/T . A este efecto negativo de los estrógenos sobre la SHBG observado solo en el hombre puede deberse que la concentración de la globulina no se modificara pos-estimulación con hCG, pues si bien la testosterona aumentó en respuesta al estímulo y casi duplicó sus valores, lo mismo ocurrió con el E_2 y la relación E_2/T por lo que el efecto pudo ser compensado.

En la mujer donde la concentración de estradiol es elevada ocurrió lo contrario, la SHBG tuvo una relación lineal positiva con la concentración de estradiol y negativa con la relación E_2/T ($r=0.55$ y $- 0.70$ respectivamente). Este efecto positivo se observó en las diferentes situaciones clínicas estudiadas (ciclo menstrual, menopausia con y sin tratamiento, embarazo y SOP) por lo que la SHBG presentó cifras bajas en la menopausia, debido a la disminución de los estrógenos.

Este marcado "dimorfismo sexual" en la respuesta de la SHBG a los esteroides gonadales, explica porque en la literatura existe tanta controversia o información aparentemente contradictoria respecto al papel de testosterona y estradiol en la regulación de la SHBG, pues como se demostró en este estudio, la respuesta fué diferente en el hombre y en la mujer y este hecho no ha sido mencionado en la literatura. Sin embargo Gordon y colaboradores en un estudio realizado sobre la síntesis de la SHBG en una línea celular de un carcinoma hepático (7) encontraron que el efecto de

los andrógenos sobre la SHBG presentaba una respuesta bifásica, pudiendo tener un estímulo positivo o negativo dependiendo de la dosis utilizada; negativo a bajas concentraciones de T y positivo a concentraciones elevadas (superiores a 0.5 nM) sin embargo la respuesta a E₂ siempre fué estimuladora, independientemente de la dosis utilizada. Esto podría explicar la diferencia de la respuesta a la testosterona en el hombre y en la mujer, pero no explica los resultados respecto a estrógenos.

En relación al efecto de las hormonas tiroideas sobre la SHBG, debe resaltarse que estas hormonas fueron las que mostraron tener mayor relación con los niveles de SHBG, tanto T₃ y T₄ como el índice de tiroxina libre (r= 0.9; - 0.94) lo que hace pensar que estas hormonas deben tener un efecto directo sobre la célula hepática para estimular la síntesis de la SHBG. Esta aseveración también se apoya en los valores tan elevados que alcanzó la globulina en los pacientes con hipertiroidismo y su disminución en los pacientes hipotiroideos; hecho de trascendencia clínica, porque puede explicar las alteraciones que ocurren en la función gonadal en este tipo de pacientes. Las mujeres con hipertiroidismo presentan anovulación y alteraciones menstruales, debido quizás a una menor proporción de E₂ libre, por el exceso de SHBG inducido por las hormonas tiroideas, lo que determina la falla del feed back positivo o efecto estimulador de los estrógenos sobre la LH a la mitad del ciclo, y en consecuencia falla de la ovulación. De manera similar en el hombre hipertiroidico se observan alteraciones del eje hipotalamo hipofisario-testicular e hipogonadismo debido a una menor concentración de testosterona libre, lo que puede disminuir hasta un nivel crítico, en el que es incapaz de suprimir la concentración de LH fallando los mecanismos de retroalimentación negativa. De ahí que en estos pacientes con hipertiroidismo esté indicado efectuar la determinación de los esteroides libres y de la SHBG para establecer el diagnóstico. Por el contrario en el hipotiroidismo, que cursa con concentraciones bajas de SHBG, la proporción de testosterona libre aumenta y esto también puede tener serias implicaciones clínicas, pues el incremento de testosterona puede determinar cambios en el perfil de lípidos y lipoproteínas incrementando el riesgo cardiovascular (31)

Por otra parte, el estudio cromatográfico efectuado con objeto de profundizar en el conocimiento de la estructura y composición de isoformas de la SHBG de los que se sabe poco,

mostró que esta globulina al igual que otras glicoproteínas presenta heterogeneidad molecular que fué detectada, desde que se cromatógrafió el estandar de los laboratorios DPC, observandose varios picos que se atribuyeron originalmente a una posible degradación de la preparación estandar. Sin embargo al cromatógrafiar los sueros de los pacientes y analizar los resultados fué evidente la presencia de por lo menos 8 diferentes variedades moleculares o isoformas, de las cuales destacan por su proporción cuantitativa: dos formas grandes (el oligómero de 135-115 kDa y el dímero de 90-78 kDa) dos monómeros de 54-46 y 38-36 kDa respectivamente y además 4 isoformas de bajo peso molecular de: 24, 18-16, 12 y < 8 kDa probablemente fragmentos resultantes de la degradación de la SHBG. Estas isoformas no se observaron en forma constante en todos los cromatogramas, sin embargo pudieron verse con claridad en algunos de los casos estudiados, y no solo cambios en su proporción cuantitativa sino también el recambio de una forma molecular a otra en diferentes condiciones fisiológicas o en respuesta a un estímulo, lo que indica que las isoformas se encuentran en un equilibrio dinámico modificando su proporción en respuesta al ambiente hormonal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como se demostró en el hombre pre y post tratamiento con hCG o en las mujeres durante el ciclo menstrual normal, en la menopausia con y sin tratamiento, embarazo etc.

Cabe mencionar que la información en la literatura sobre las formas moleculares de la SHBG y su regulación es muy limitada. Se sabe que esta glicoproteína es un homodímero al que se le ha atribuido un PM de 90-135 kDa, formada por dos monómeros idénticos unidos a través de residuos de N-asparagina (32) constituidos por una cadena proteica de un peso molecular (PM) aproximado de 40,000 (33) que difieren únicamente por su contenido de carbohidratos, por lo que presentan un PM diferente dependiendo de su grado de glicosilación siendo este de 52 y 49 kDa según algunos investigadores (10). La cadena monomérica puede aceptar dos bicadenas N-glicosiladas y una O-glicosilada y puede ser muy variable respecto a su contenido de carbohidratos (34). Estos monómeros se unen en presencia de los esteroides para formar un dímero muy estable y difícil de disociar requiriendo utilizar condiciones extremas de fuerza iónica o pH (35).

A la fecha se conoce la estructura primaria de la globulina (36) y el DNA que codifica su síntesis (35) sin embargo es muy poco lo que se conoce acerca de la microheterogeneidad que la caracteriza, la que está determinada por su contenido variable de carbohidratos, y no se conocen los factores que afectan la glicosilación (37).

De acuerdo a los resultados de este estudio el dímero tuvo un PM de 90-78 kDa que está de acuerdo con los resultados de 90-84 kDa obtenidos por Petra et y col. (3) y diferente al reportado por otros estudios (90 - 135 kDa) en los que aparentemente el dímero se consideró en conjunto con el oligómero (115 - 135 kDa), esto puede ser posible porque en ocasiones no se separan totalmente; sin embargo en nuestro estudio, el oligómero pudo detectarse con claridad en el suero de hombres normales, en las mujeres menopáusicas, y en los casos de ovario poliquístico es decir cuando existe un estímulo androgénico o una baja concentración de estrógenos.

Los monómeros de acuerdo a nuestros resultados tienen un PM un poco diferente del reportado, de aproximadamente 54-46 kDa para el monómero pesado (52 en la literatura) y 38-36 kDa para el ligero que puede corresponder a la cadena polipeptídica poco glicosilada, ambos pudieron verse con claridad en algunos cromatogramas de ciclo menstrual, SOP, menopausia, embarazo y en los casos de hipo e hipertiroidismo. También se observaron por lo menos 4 fragmentos diferentes (24, 18-16, 12 y < 8 kDa) sobre todo en los sueros de hombre y en la mujer en la fase post-ovulatoria, en el SOP y en la menopausia tratada con estrógenos. Por el contrario fueron casi no detectables en el embarazo y en los pacientes con hipo e hipertiroidismo.

Pudo demostrarse que en el hombre normal el dímero de la globulina es la variedad molecular predominante (40 - 45 %) con 25 - 30 % de la inmunoreactividad total en la forma oligomérica, por lo que las formas grandes contienen un 70 % de la actividad total de la SHBG. Este predominio de formas grandes parece ser un efecto de los andrógenos, pues como se demostró en los estudios de correlación, el nivel de testosterona tuvo una marcada relación lineal con la proporción de las formas grandes ($r= 0.78$) influyendo en cambio negativamente sobre la proporción de los monómeros de 54 y 36 kDa ($r= -0.78$ y -0.9 respectivamente) y los fragmentos de degradación, por lo que se encuentran en baja proporción. Esto podría deberse a que en presencia de T al estimularse la producción del

dímero, disminuyen los monómeros. Por eso en condiciones normales, en el hombre la proporción de monómeros es muy baja (15 % aproximadamente, sumando la actividad de ambos monómeros) y el 15 % restante en los fragmentos.

En los hombres normales post-estimulación con hCG se incrementó significativamente la proporción del dímero y disminuyeron los monómeros y los fragmentos, por probable efecto del incremento de la testosterona; sin embargo en los hombres hipogonadales en los que el incremento de la testosterona fué menor y mayor la respuesta de los estrógenos no aumentó el dímero, pero sí disminuyó la proporción del monómero de 54-46 kDa, demostrando su sensibilidad al efecto negativo de la testosterona. En cambio el monómero ligero aumentó su proporción al igual que los fragmentos que aumentaron considerablemente, quizás por ser más sensibles al incremento de estrógenos y de la relación E_2/T , lo que normalmente ocurre en las pruebas de estimulación con hCG. Como se demostró en los estudios de correlación el monómero ligero y los fragmentos son altamente dependientes de los niveles de E_2 ($r = 0.92$ y 0.88 respectivamente).

En la mujer la concentración de la SHBG fué más elevada que en el hombre y el estudio cromatográfico mostró, que la proporción de isoformas también es diferente y claramente dependiente del ambiente hormonal como se demostró por los hallazgos en las diferentes fases del ciclo menstrual. Mientras en el hombre el oligómero y el dímero fueron las isoformas predominantes; en la mujer en condiciones normales no se detectó el oligómero, el dímero se encontró en menor su proporción y el monómero de 54 kDa fué la variedad molecular predominante. Así también se pudieron observar cambios importantes en el comportamiento de las isoformas de la SHBG dependiendo de la fase del ciclo menstrual.

Estos datos son interesantes porque en la literatura existen resultados contradictorios al respecto y por lo general se dice que la SHBG no se modifica durante las diferentes fases del ciclo a menos que los estrógenos se encuentren muy elevados, con cifras superiores a 400 pg/ml^{28} . Este estudio demostró que aun con niveles de estrógenos menores que los mencionados, la SHBG sufrió modificaciones tanto en su concentración como en su composición de isoformas, con mayor concentración en la fase ovulatoria y en la fase alta de anidación al cambiar en la concentración de

estrógenos, lo que indica que las formas moleculares son reguladas por los cambios en el ambiente hormonal.

En los casos de ovario poliquístico a diferencia del ciclo menstrual normal, pudo detectarse el oligómero y el dímero que fue la isoforma cuantitativamente más importante, de manera similar al comportamiento cromatográfico de los sueros de los hombres; la disminución de estrógenos y el hiperandrogenismo que caracteriza a este síndrome, puede ser la causa de los cambios observados, ya que como se demostró previamente, las formas grandes de la SHBG se incrementan por andrógenos o por la deficiencia de estrógenos. En la menopausia donde la concentración de estrógenos es muy baja (<25 pg/ml) el oligómero y el dímero se encontraron elevados, poniendo de manifiesto la importancia de los estrógenos en el control negativo de las formas grandes, tal como se observó en los estudios de correlación.

De estos resultados podríamos decir que cuando los estrógenos están elevados, el monómero de 54 kDa es la forma molecular más importante, estando el oligómero y el dímero disminuidos. Cuando los estrógenos disminuyen o se elevan los andrógenos las formas grandes se incrementan por un doble mecanismo: por una parte la elevación de testosterona (efecto positivo) y por otra la falla del mecanismo de control, tal como ocurrió en la menopausia o en los casos de ovario poliquístico.

En los cromatogramas del suero de mujeres embarazadas, el hecho sobresaliente fué la notable elevación del monómero ligero (36 kDa) prácticamente al doble de la proporción que tuvo en las otras situaciones clínicas estudiadas. Este monómero de acuerdo a los estudios de correlación, es fuertemente estimulado por el incremento de estrógenos ($r = 0.92$) y de las hormonas tiroideas, las cuales se encuentran muy elevadas durante la gestación; sin embargo llama la atención la baja proporción del monómero pesado y la elevación del dímero, para lo cual no se tiene una explicación satisfactoria, a no ser por la presencia de un feto masculino.

En el hipertiroidismo el análisis de los perfiles cromatográficos mostró marcada elevación de ambos monómeros, en relación a su proporción en los pacientes normales, no siendo detectable el oligómero de 135-115 kDa. Esto es importante, porque los sueros cromatografiados eran masculinos.

con niveles normales de los estrógenos, por lo que la elevación de los monómeros, parece ser un efecto específico de las hormonas tiroideas. La concentración total de la SHBG en estos pacientes fué también más elevada y congruente con los estudios de correlación, en los que las hormonas tiroideas mostraron una elevada correlación lineal con los niveles de la SHBG ($r = 0.92$) siendo el incremento fundamentalmente en los monómeros, lo que parece indicar una acción directa de las hormonas tiroideas sobre la célula hepática, para estimular la síntesis de la cadena proteica de la globulina; esto se infiere por el incremento del monómero de 38 kDa, aunque también deben inducir la glicosilación como lo demuestra el incremento del monómero pesado.

En las pacientes con hipotiroidismo, con niveles de T_3 y T_4 muy bajos y estrógenos también disminuidos, el perfil cromatográfico mostró como era de esperarse, una elevación del dímero de la SHBG y una disminución del monómero ligero, en relación a su proporción en los pacientes con hipertiroidismo, cambios congruentes con la disminución de las hormonas tiroideas y los estrógenos que tienen un efecto inductor sobre la síntesis de la globulina.

En resumen podría decirse, como resultado del análisis de los perfiles cromatográficos y del estudio de las moléculas en las diferentes condiciones fisiopatológicas, que la proporción de las formas grandes es el resultado del equilibrio entre la concentración de los andrógenos y los estrógenos; los andrógenos con un efecto estimulador y por el contrario fuertemente inhibidor por parte de los estrógenos. En cambio el control de los monómeros es dependiente de la concentración de los estrógenos y las hormonas tiroideas; los andrógenos parecen tener un efecto inhibidor sobre la proporción de monómeros, sin embargo esto puede deberse a que en presencia de testosterona, se induce dimerización, por lo que disminuye su proporción. Por otra parte mientras que la acción estimuladora de los estrógenos es básicamente sobre el monómero pesado, la de las hormonas tiroideas fundamentalmente es sobre el ligero y siendo la única diferencia entre ellos, su grado de glicosilación, se puede inferir que las hormonas tiroideas estimulan la síntesis del monómero y los estrógenos su glicosilación; de ahí el recambio que se observa frecuentemente de una forma molecular a otra, dependiendo del ambiente hormonal.

El papel de los estrógenos y las hormonas tiroideas en la glicosilación de los monómeros puede comprobarse, al analizar los resultados del estudio del ácido siálico, que demostró que de todos los sueros estudiados, los de pacientes con hipertiroidismo y los de mujeres durante el ciclo menstrual normal, fueron los de mayor concentración de ácido siálico.

En el ciclo menstrual normal la concentración de ácido siálico mostró variaciones en función de la concentración de estrógenos; se encontró más elevado en la fase periovulatoria, y en la ovulación disminuyendo en la etapa post-ovulatoria, para volver a incrementarse en la fase lutea de acuerdo a la concentración de estrógenos. En la menopausia tratada con estrógenos su concentración fué sensiblemente mayor que en la menopausia sin tratamiento y que en los casos de ovarios poliquisticos, en los que el ácido siálico se encontró muy disminuido, con niveles similares a los observados en los sueros de los hombres, que fueron los que tuvieron la concentración más baja de ácido siálico. Estos datos apoyan el papel de los estrógenos y las hormonas tiroideas sobre la glicosilación de las moléculas.

Analizando los perfiles de glicosilación de los sueros se observó que los picos de ácido siálico se presentaron prácticamente en las mismas fracciones donde eluyeron las moléculas de la SHBG permitiendo hacer algunas inferencias. En el hombre normal cerca del 50 % del ácido siálico se localizó en las formas grandes (dímero y oligómero) donde se encontraba la mayor proporción de SHBG, 35 % en los monómeros y de 5 - 15 % en los fragmentos. Post-estimulación con hCG (en la que se incrementan los estrógenos) la glicosilación del dímero disminuyó, aumentando la proporción de ácido siálico en el monómero de 54 kDa con una disminución simultánea del monómero ligero, lo que se puede explicar, porque este último al glicosilarse se transforma en el monómero de 54 kDa.

En los hombres con hipogonadismo el perfil de glicosilación fué diferente del normal, mostrando menor porcentaje de ácido siálico en el dímero y una proporción aumentada en ambos monómeros; esta alteración se hizo más evidente post-estimulación con hCG, en la que el contenido de ácido siálico en el dímero fué significativamente menor que en condiciones normales.

A la fecha se sabe muy poco respecto al papel de los carbohidratos para la acción biológica de la SHBG, sin embargo en hormonas como hCG, FSH y LH se ha visto que son importantes para la

unión de la hormona a sus receptores y la traducción del mensaje, a fin de que pueda manifestarse la acción biológica; cabe pensar que la glicosilación deficiente del dímero, en los hombres con hipogonadismo, podría afectar la bioactividad de la globulina y el transporte de la testosterona a los tejidos.

En el caso de las mujeres, los perfiles de glicosilación diferentes de los de los hombres, se caracterizaron por un menor contenido de ácido siálico en el dímero y mayor proporción en los monómeros, sobre todo en la fase ovulatoria y en la fase lútea, lo que está de acuerdo con la distribución de las isoformas durante el ciclo, reafirmando el papel de los estrógenos en la glicosilación de los monómeros. En la fase post-ovulatoria al disminuir los estrógenos, disminuye el contenido de ácido siálico en los monómeros, incrementándose en los fragmentos de bajo peso molecular, lo que puede indicar su degradación o su deglicosilación.

En los casos de ovario poliquístico y de menopausia, los resultados conforme a lo esperado, mostraron mayor contenido de ácido siálico en las formas grandes y su disminución en los monómeros, de acuerdo al perfil de las isoformas de la SHBG, mientras que en la menopausia tratada y en el embarazo aumentó la glicosilación de los monómeros, así como también en los casos de hipertiroidismo. No obstante no concuerdan los perfiles de glicosilación en la menopausia no tratada y en los casos de hipotiroidismo, en los que contrario a lo esperado, la proporción de ácido siálico se encontró elevada, para lo cual no se encuentra una explicación satisfactoria, a no ser que las pacientes tuvieran tratamiento sustitutivo.

El contenido de carbohidratos de la SHBG, es 18 % de acuerdo a Mickelson (39) 32.1 % en los estudios de Rosner y Smith (40), 34 % en los resultados de Iqbal y Johnson y 14 % de acuerdo con Petra y colaboradores (3). En nuestros datos considerando la diferencia de peso molecular entre el monómero pesado y el monómero ligero, parece ser de 22-33 %. Aunque los resultados son similares a algunos de los reportados, las diferencias pueden deberse a los sueros utilizados para el análisis, pues como se demostró la glicosilación es variable dependiendo del ambiente hormonal y el estado fisiopatológico.

Ignoramos cual puede ser la importancia o trascendencia de la glicosilación diferencial en hombres y mujeres, en respuesta a los diversos estímulos hormonales; pues se ha dicho que tanto las formas glicosiladas como deglicosiladas pueden unir a los esteroides solo se sabe, que a esta se debe la microheterogeneidad molecular que caracteriza a la SHBG

Del contenido de carbohidratos, por lo menos una tercera parte es ácido siálico que se localiza en la parte terminal de las cadenas de oligosacáridos (dos residuos por cadena). A las diferencias en el contenido de ácido siálico se han atribuido las diferencias de carga eléctrica y peso molecular que presentan las isoformas de la SHBG, y estas diferencias de carga o peso son los que se han aprovechado para su separación por electroforesis o isoelectroenfoque, o por filtración en gel, como en este estudio.

Existen pocos reportes respecto a las isoformas de la SHBG, casi todos ellos por electroforesis (SDS-PAGE) o por isoelectroenfoque, y en ellos se ha informado la presencia de 8-10 diferentes variedades moleculares. Aunque el fundamento de los métodos es diferente, es posible comparar nuestros resultados, ya que los pesos moleculares asignados al dímero y al monómero por electroforesis son similares a los obtenidos en este estudio, por filtración en gel. Los niveles de SHBG y las formas moleculares, pudieron determinarse con exactitud, gracias a la elevada sensibilidad del RIA y la especificidad de los anticuerpos utilizados, lo que permitió observar las diferencias durante las fases del ciclo menstrual y en las otras situaciones clínicas estudiadas. Sin embargo nuestro estudio tiene un inconveniente, mide la "Inmunoreactividad" de la globulina, pero nada nos dice respecto a su bioactividad, por lo que pudieron haberse determinado fragmentos inmunoreactivos carentes de acción biológica, como pueden ser los fragmentos de bajo peso molecular. No obstante la información obtenida respecto al comportamiento de las isoformas y su mecanismo de regulación hormonal es muy importante y por ello consideramos que es necesario continuar este estudio, para averiguar la afinidad de cada una de las isoformas, por los esteroides sexuales, como dihidrotestosterona, testosterona, estradiol y sus derivados, a fin de poder conocer su papel en el transporte de los esteroides sexuales. Es de esperarse de acuerdo a los resultados obtenidos con otras glicoproteínas biológicamente importantes, que las diferentes isoformas de la SHBG

manifiesten una afinidad y especificidad diferente para cada uno de ellos, lo que es importante determinar. Partridge y colaboradores separaron las isoformas de SHBG por electroforesis (41) y observaron que las formas moleculares en el suero de hombres, migraban de un pH de 4.3 a 5.8, mientras que los sueros de las mujeres lo hacían a un rango de pH de 5.4 a 5.8, indicando que las isoformas en el hombre son más ácidas, o más básicas en las mujeres. Cuando estas isoformas se incubaron con los esteroides tritados (^3H E₂ y ^3H T) aquellas que unieron con mayor afinidad a la ^3H T, fueron las más ácidas (pH 4.3 a 4.9) mientras que las que unieron estradiol fueron más básicas (pH 5.4 a 5.8) lo que está en relación directa con su contenido de ácido siálico. Esto es importante, porque implica que el contenido de carbohidratos y el grado de glicosilación regulan la interacción "específica y diferencial" de la testosterona o el estradiol con las diferentes formas moleculares.

Extrapolando estos resultados de la electroforesis a la filtración en gel, las formas ácidas por su peso molecular corresponden a las formas grandes que son las que unen T con mayor afinidad y que en nuestro estudio son las que predominaron en el suero de los hombres; las formas más básicas de menor peso molecular, tuvieron mayor avidez por estradiol y son las que predominaron en el suero de las mujeres. Estos resultados tienen una gran trascendencia, porque cuestionan seriamente la teoría clásica y simplista, mantenida por muchos años, de que solo el dímero de la SHBG se une a los esteroides y de que tanto la testosterona como el estradiol ocupan un mismo sitio de unión en la globulina.

Esta teoría de Partridge da sentido a la presencia de las isohormonas como determinantes de la especificidad de la SHBG para unir a los diferentes esteroides sexuales, es congruente con nuestros resultados y permite explicar porque en algunos tejidos se transporta específicamente un esteroide y no otros, como ocurre en el endometrio donde la SHBG une y transporta específicamente al estradiol (42) mientras que en la próstata la SHBG transporta fundamentalmente testosterona hasta los receptores de membrana, donde de acuerdo a recientes investigaciones el complejo SHBG-esteroide se une también en forma específica (43).

Así la heterogeneidad molecular y el contenido de carbohidratos pueden ser importantes reguladores de la especificidad de la SHBG, no solo para transportar los esteroides a los tejidos sino para que pueda llevarse a cabo su unión a los receptores específicos, determinando también su metabolismo y velocidad de depuración, que como se sabe es mayor para las hormonas libres.

Esta nueva hipótesis, aunque aún no aceptada totalmente, hecha por tierra otro viejo dogma, de que la fracción libre de los esteroides es la biológicamente activa, pues implica que el esteroide debe ser unido a la SHBG para poder ser transportado a los tejidos y este unido a los receptores de membrana que reconocen en forma específica al complejo (SHBG-esteroide).

Recientes estudios experimentales han demostrado que tales receptores existen y que el complejo SHBG-esteroide debe unirse a la membrana, a fin de que el esteroide sea introducido al compartimento citoplasmático y alcance el núcleo para poder actuar, siendo así la fracción unida, la biológicamente activa. Estos resultados dan sentido a la heterogeneidad molecular y a la especificidad en el transporte de los esteroides, gracias a la especificidad de las isoformas de la globulina y explican la importancia de la glicosilación diferencial de las variantes moleculares, en función del ambiente hormonal, abriendo un interesante campo de estudio, para aclarar las incógnitas que aún existen respecto a la manera como la SHBG manifiesta su acción biológica; la que sin duda es de gran trascendencia, como determinante de la acción de los esteroides en los diversos tejidos en condiciones normales y patológicas.

ANEXO I

ESTANDARIZACION DEL RIA DE LA SHBG.

Cuando surgió el radioinmunoanálisis, fué la sensibilidad del procedimiento, lo que permitió introducirlo como una técnica analítica de incalculable valor, para determinar compuestos presentes en los líquidos biológicos, en muy baja concentración. No obstante, para muchos compuestos importantes no se requiere una elevada sensibilidad, ya que los niveles en los fluidos biológicos están en una concentración más arriba de los límites de detección del ensayo; siendo importante ajustar las condiciones y la curva estandar del ensayo al rango de interés fisiopatológico.

En el caso de la SHBG, aunque el RIA tiene una sensibilidad adecuada para medir los niveles circulantes, las muestras de suero se cromatografiaron, con la consiguiente dilución de las mismas (60 fracciones) por lo que fué preciso incrementar la sensibilidad del estuche utilizado, optimizando las condiciones del mismo. Para esto se modificó el RIA, de acuerdo a los principios básicos ya establecidos, sobre el efecto que tienen el tiempo y la temperatura de incubación así como la dilución del anticuerpo sobre la sensibilidad del método.

a) Tiempo de incubación. Aún cuando incrementar el tiempo de incubación no es en sí mismo un medio para incrementar la sensibilidad, sin embargo prolongarlo un poco cuando es muy corto, puede ayudar a alcanzar el equilibrio de la reacción, sobre todo si se considera que los reactivos se utilizaron en concentraciones bajas. Por ello se decidió incubar la muestra con el trazador radiactivo y el anticuerpo durante 3 horas en lugar de 1 hora. De esta forma como puede apreciarse en la FIG. 1 la pendiente del ensayo (m) se incrementó considerablemente con respecto a las condiciones originales marcadas en el instructivo del estuche que son: anticuerpo sin diluir, curva estandar de 10 a 250 nM/L y 1 hora de incubación a temperatura ambiente. En este caso, al incrementar el tiempo de reacción se afectaron los puntos bajos de la curva, modificándose la sensibilidad del ensayo.

No obstante, aún cuando el incremento del tiempo de incubación mejoró la pendiente del ensayo, ésta modificación no fue suficiente debido a que el punto de 5 nM/L (que se adicionó para checar la sensibilidad) indicó exceso de anticuerpo y poca sensibilidad a ese nivel y no tuvo buena correlación con los demás puntos, es decir se salió de la curva, no obstante que el estuche indica un límite de detección de 5 nM/L.

b) Dilución del anticuerpo. Por lo anterior se decidió diluir el anticuerpo, con lo cual generalmente se modifica la curva hacia abajo y a la izquierda afectando la unión total (B_0), el rango y la pendiente (m) incrementando la sensibilidad del ensayo. Con tal objeto se probó el anticuerpo: sin diluir, diluido al 75 % (1 : 0.75) y diluido al 100 % (1 : 1) manteniendo el tiempo de incubación en 3 horas a temperatura ambiente. Esta variación (FIG. 2) alteró ligeramente la pendiente de la curva, pero mejoró la tendencia de los puntos; por los resultados obtenidos se consideró que la dilución del 100 % del anticuerpo era la más aceptable, ya que es la que muestra mejor correlación en la gráfica ($r = 0.99$) y una pendiente más adecuada, más cercana a la pendiente ideal (2.3 ± 0.15).

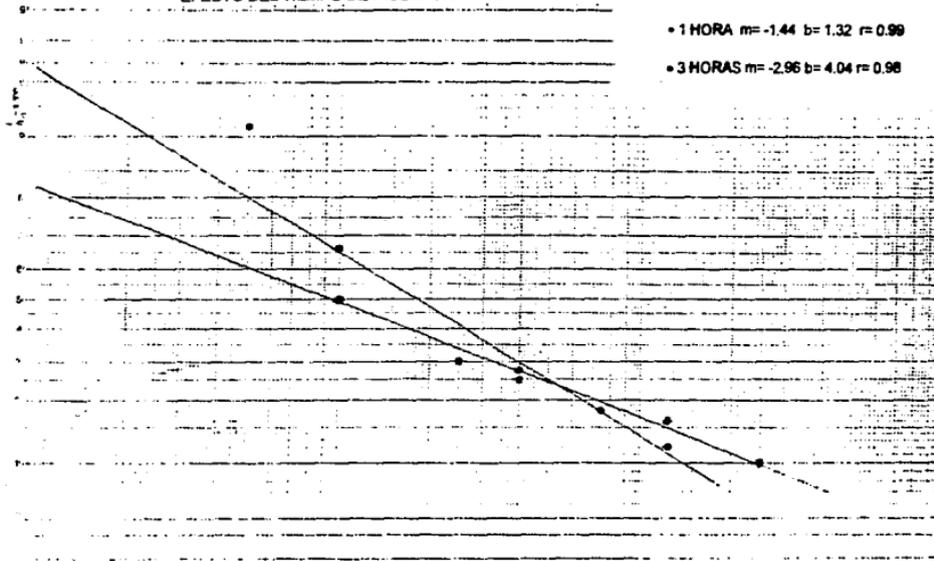
Por otra parte, teniendo conocimiento de que la temperatura de incubación también afecta los resultados del ensayo, se decidió modificar la temperatura de incubación, de temperatura ambiente, a 4°C con un tiempo de incubación de 18 horas probando dos diluciones del anticuerpo. Los resultados de estos ensayos se muestran en la FIG. 3 y como puede apreciarse, las modificaciones realizadas no mejoraron los resultados anteriores, sino que por el contrario fueron claramente desfavorables en términos de la pendiente, que se elevó notablemente afectandose los puntos de más elevada concentración. Por lo cual se consideró que esta última modificación no era conveniente.

Una vez estudiados los diversos factores que pueden alterar la sensibilidad del ensayo, se seleccionaron las condiciones más adecuadas para realizar el radioinmunoanálisis de acuerdo a el rango de concentración de nuestros experimentos; de este modo el ensayo se estandarizó a las siguientes condiciones: anticuerpo diluido 100 % y 3 horas de incubación a temperatura ambiente. Con estas condiciones la curva de calibración tuvo una pendiente de - 2.7 que proporcionó una sensibilidad de 0.3 nM/L la cual es adecuada, para cuantificar las pequeñas concentraciones de la

SHBG en las fracciones de la cromatografía y así poder conocer los perfiles de elución de esta proteína y las formas moleculares presentes. La reproducibilidad de la curva de calibración fué evaluada mediante el valor de la pendiente (m), el intercepto en b y la correlación de los puntos de la misma los resultados obtenidos en dos ocasiones diferentes se muestran en la FIG. 4. La precisión determinada por los coeficientes de variación (CV) de los sueros control utilizados para el control de calidad también fué adecuada (CV intra e interensayo $< 10\%$) lo que nos permite utilizar el método con seguridad en forma rutinaria.

FIGURA 1

ESTANDARIZACION DEL RIA DE LA SHBG
EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA PENDIENTE



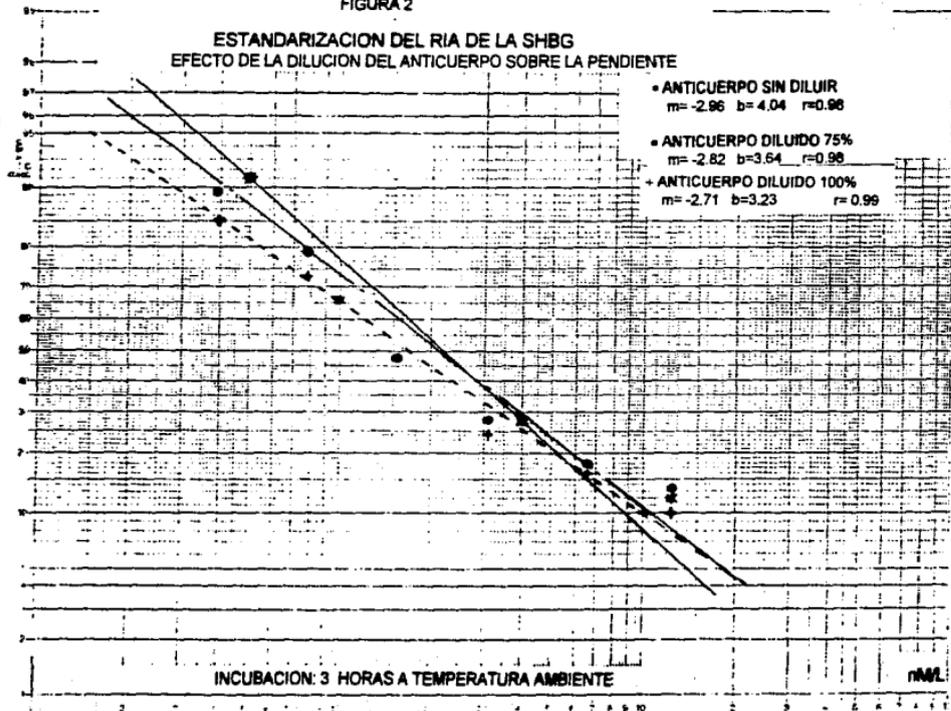
ANTICUERPO SIN DILUIR. INCUBACION A TEMPERATURA AMBIENTE

RM/L

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 2

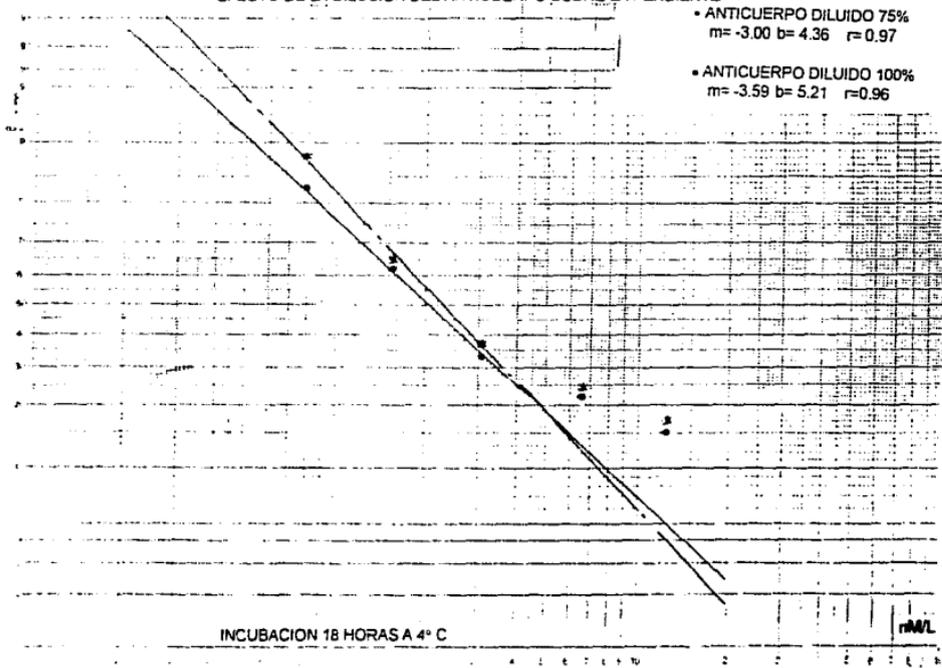
ESTANDARIZACION DEL RIA DE LA SHBG
EFECTO DE LA DILUCION DEL ANTICUERPO SOBRE LA PENDIENTE



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 3

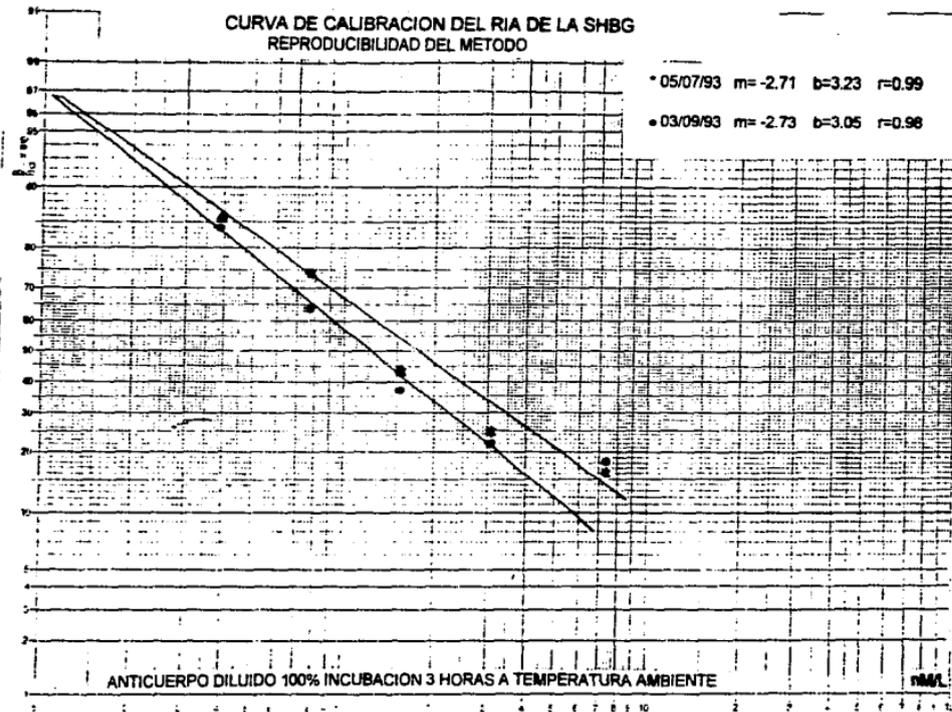
ESTANDARIZACION DEL RIA DE LA SHBG
EFECTO DE LA DILUCION DEL ANTICUERPO SOBRE LA PENDIENTE



FALLA DE ORIGEN

FIGURA 4

CURVA DE CALIBRACION DEL RIA DE LA SHBG
REPRODUCIBILIDAD DEL METODO



FALLA DE ORIGEN

ANEXO II

ESTANDARIZACION DEL METODO DEL ACIDO TIOBARBITURICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO SIALICO.

El método de Warren o del ácido tioarbitúrico usado para la determinación de ácido siálico en los líquidos biológicos, es bastante preciso, exacto y específico; no obstante tener una sensibilidad adecuada, mostró que ésta no era suficiente para evaluar la baja concentración presente en las fracciones de las cromatografías, razón por la cual se decidió estudiar los diversos factores que afectan el ensayo. Considerando esta situación, se propuso modificar el método, con el propósito de incrementar la intensidad y la estabilidad del cromóforo formado en la reacción, a fin de obtener mayor sensibilidad.

El paso inicial del método de Warren es la oxidación del ácido siálico con metaperiodato de sodio; se sabe que la formación de color aumenta con el grado de oxidación, y por lo tanto con el incremento de la concentración de metaperiodato hasta cierto límite, por lo que la primera modificación consistió en variar la concentración de dicho reactivo entre 0.1M y 0.9 M (en el método original es 0.2 M) a fin de establecer la concentración más adecuada para el ensayo. En la figura 1 se puede apreciar que el color se incrementa notablemente a partir de la concentración 0.5 M y que la concentración de metaperiodato que resulta en una mayor absorbancia fué la de 0.9 M. El producto de la oxidación se hace reaccionar posteriormente con ácido tioarbitúrico en un baño en ebullición para formar el cromóforo; el tiempo de incubación en el método original es de 15 minutos, en este trabajo se modificó incubando de 10 a 60 minutos, encontrándose que la máxima absorbancia fue obtenida después de una incubación de 60 minutos (Fig. 2).

A continuación del desarrollo de color se añade una solución de HCl al 5 % v/v, porque se ha establecido que la adición de solventes orgánicos o ácidos miscibles en agua intensifican el color de la reacción. Considerando lo anterior se adicionaron distintos volúmenes de HCl al 5 % (1 a 4 ml) encontrando que la máxima absorbancia del cromóforo se obtuvo cuando se adicionaron 3 ó 4 ml del

reactivo (figura 3). Posteriormente se incubó nuevamente a 25 ° C durante 15 minutos. En un trabajo previo, una modificación que se realiza al método de Warren, es mantener los tubos durante esta segunda incubación no a 25 ° C sino a 50 ° C después de adicionar la solución de HCl, en el presente trabajo se probaron 3 diferentes temperaturas para este paso 25, 37 y 50 ° C, resultando una mayor intensidad del color cuando la temperatura fue de 37° C, pues como se puede observar a 50 ° C disminuye notablemente la absorbancia (Fig. 4).

También se comprobó la estabilidad del cromóforo para lo cual se realizó el ensayo incubando todas las modificaciones anteriores, es decir con el método ya estandarizado determinando la estabilidad a diferentes tiempos (10 a 60 minutos). Los resultados muestran, que a partir de los 20 minutos la absorbancia no cambia considerablemente con respecto al tiempo, manteniéndose el color hasta los 60 minutos, por lo cual podemos leer dentro de este periodo, sin tener alteraciones importantes (Fig. 5).

Se determinó también el espectro de absorción del cromóforo del ácido siálico en HCl/etanol al 5 % y como se observa en la Fig. 6, éste muestra una máxima absorbancia a una longitud de onda de 550 nm, siendo la utilizada para la lectura del ensayo. La figura 7 muestra la curva estandar del ensayo estandarizado, que se corrió con concentraciones de ácido siálico de 1.25 - 10 µg/ml; puede verse que la producción de color varía en relación lineal con la concentración del ácido siálico en todo el rango utilizado. En estas condiciones el procedimiento alcanzó mayor sensibilidad que el método original, siendo 0.3 µg la concentración mínima detectable. Así el ensayo tiene la sensibilidad suficiente para medir las pequeñas concentraciones de ácido siálico en las diferentes fracciones de las cromatografías que se realizaron en este estudio.

FIGURA 1
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Variación de la concentración de Metaperiodato de sodio)

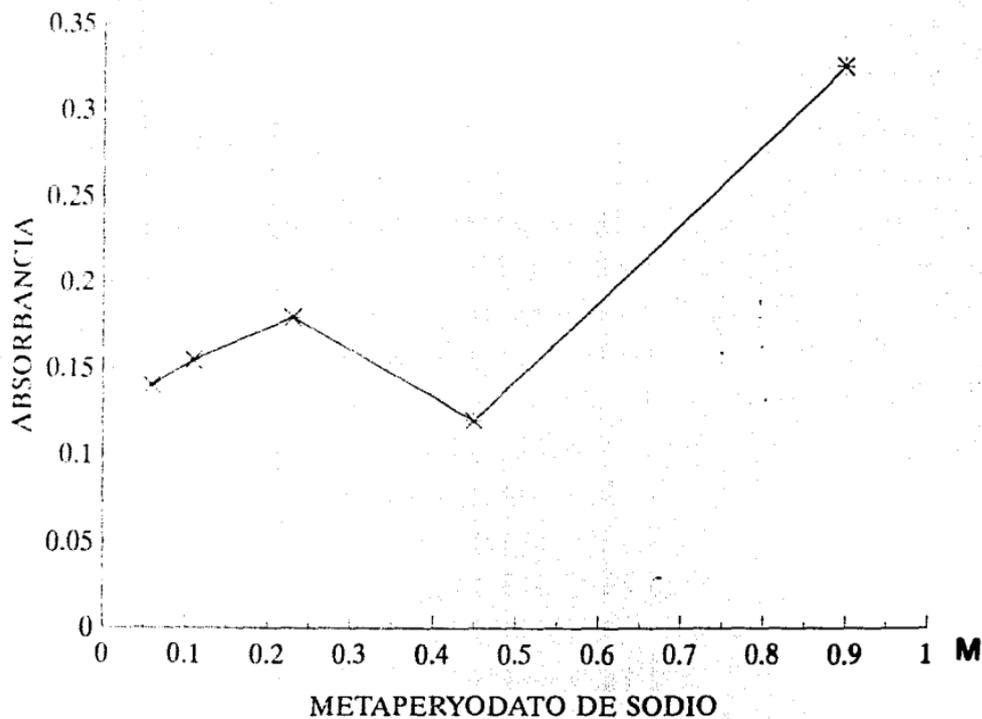


FIGURA 2
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Variación del tiempo de incubación)

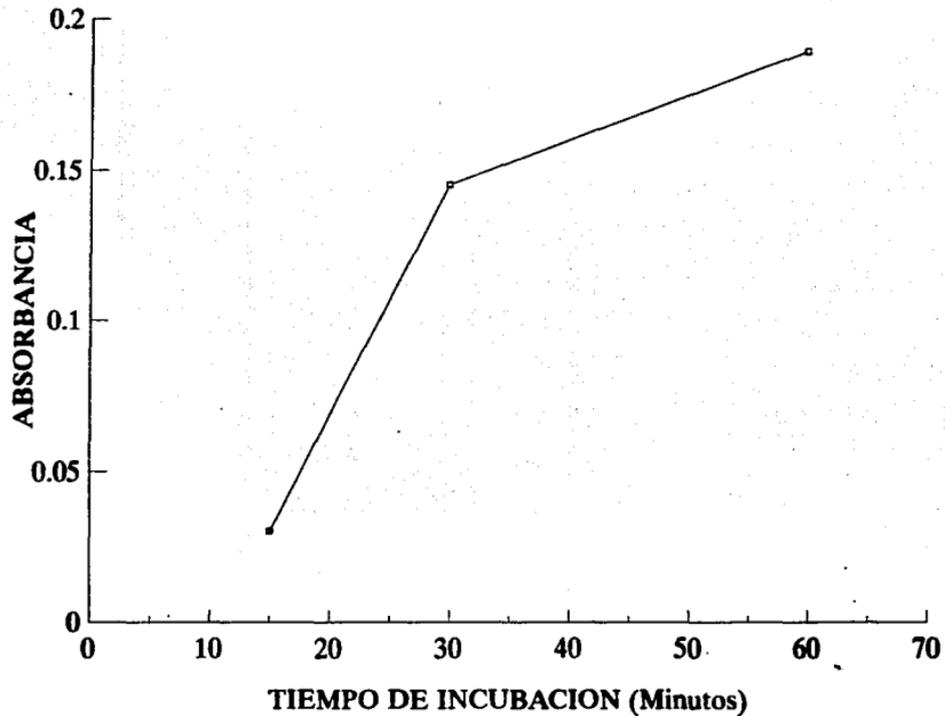


FIGURA 3
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Variación del volumen de HCl, 5%)

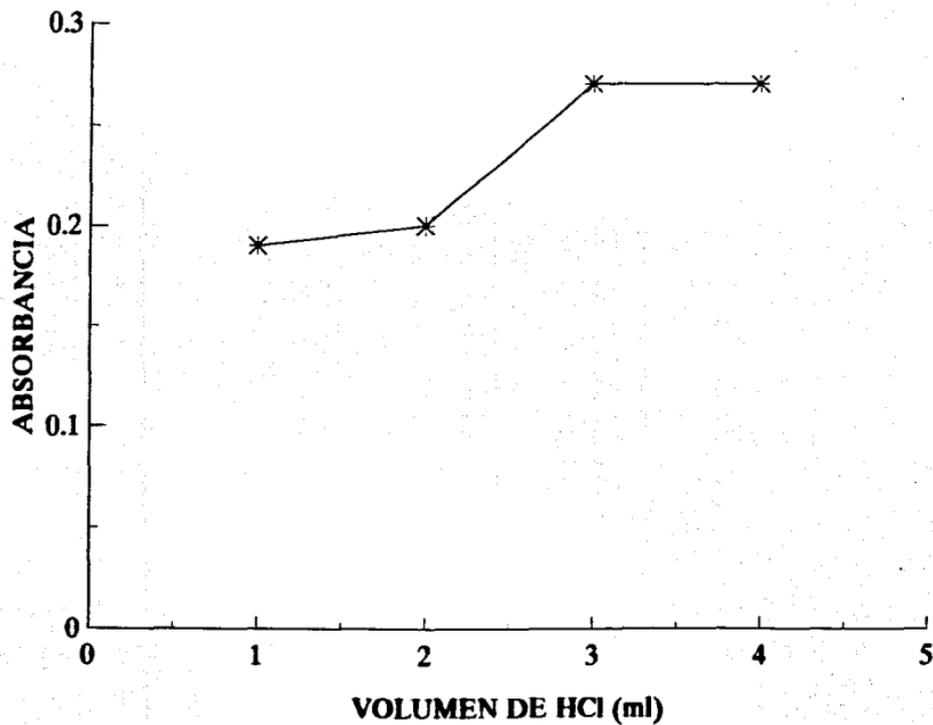


FIGURA 4
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Variación de la temperatura, segunda incubación)

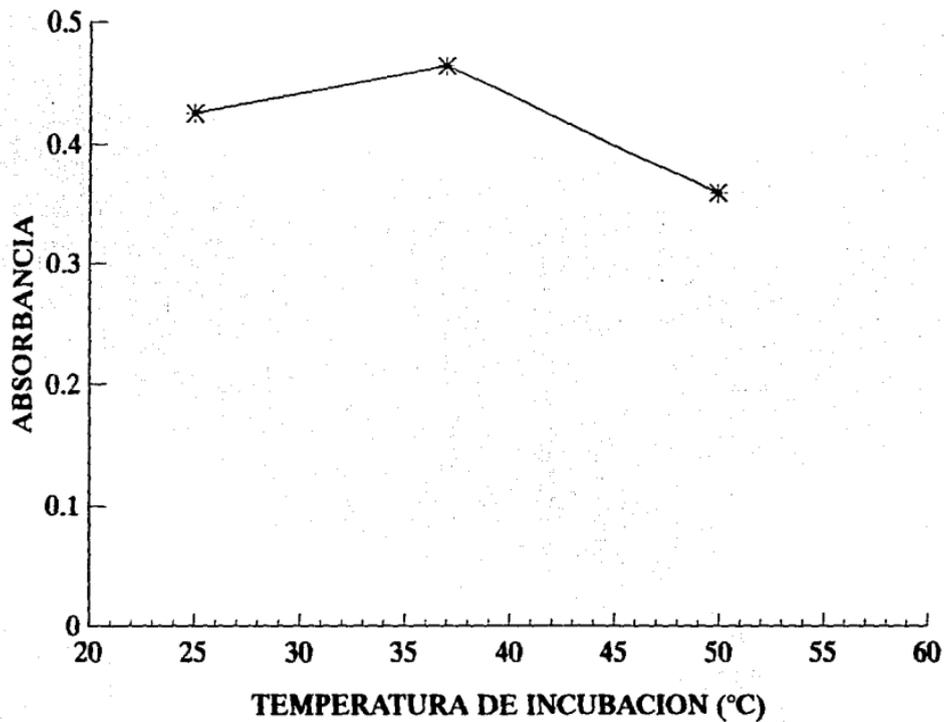


FIGURA 5.
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Estabilidad del cromoforo formado)

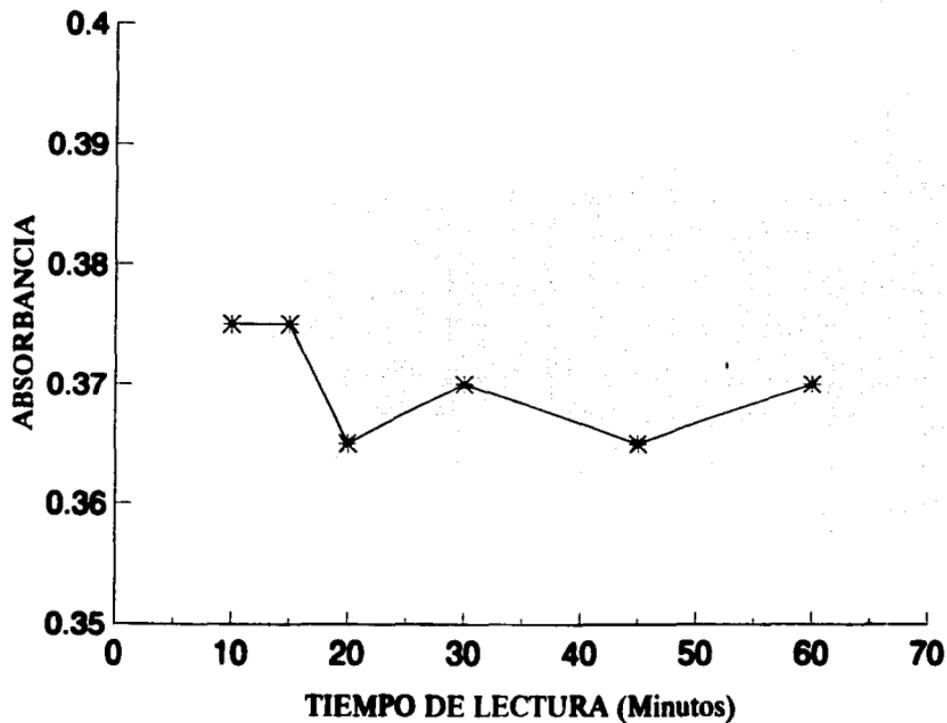


FIGURA 6
DETERMINACION DE ACIDO SIALICO
(Espectro de absorción del cromoforo)

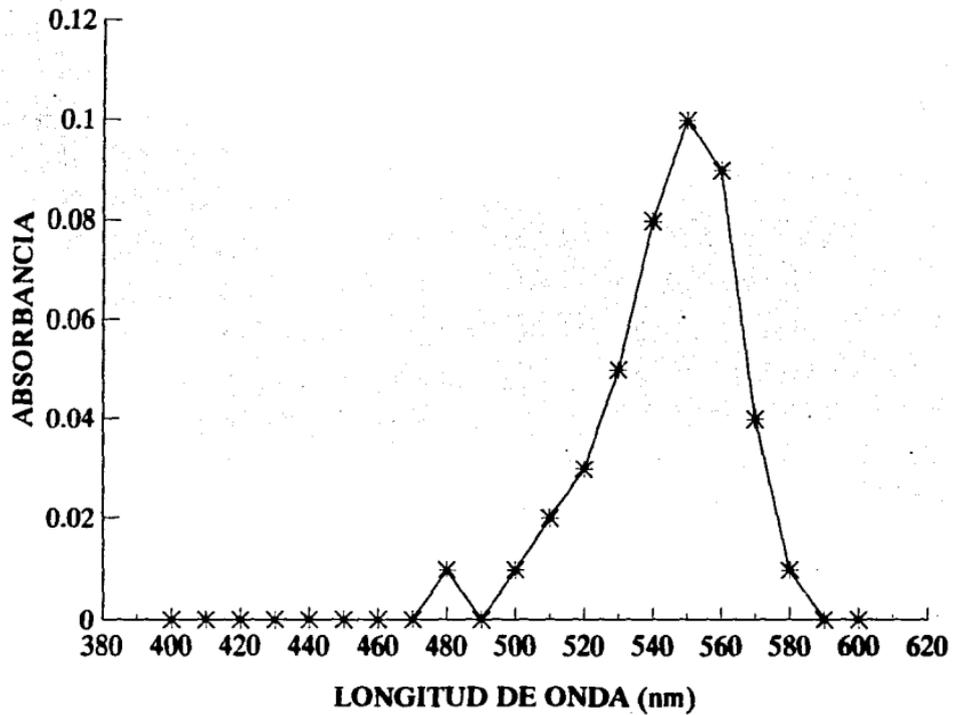
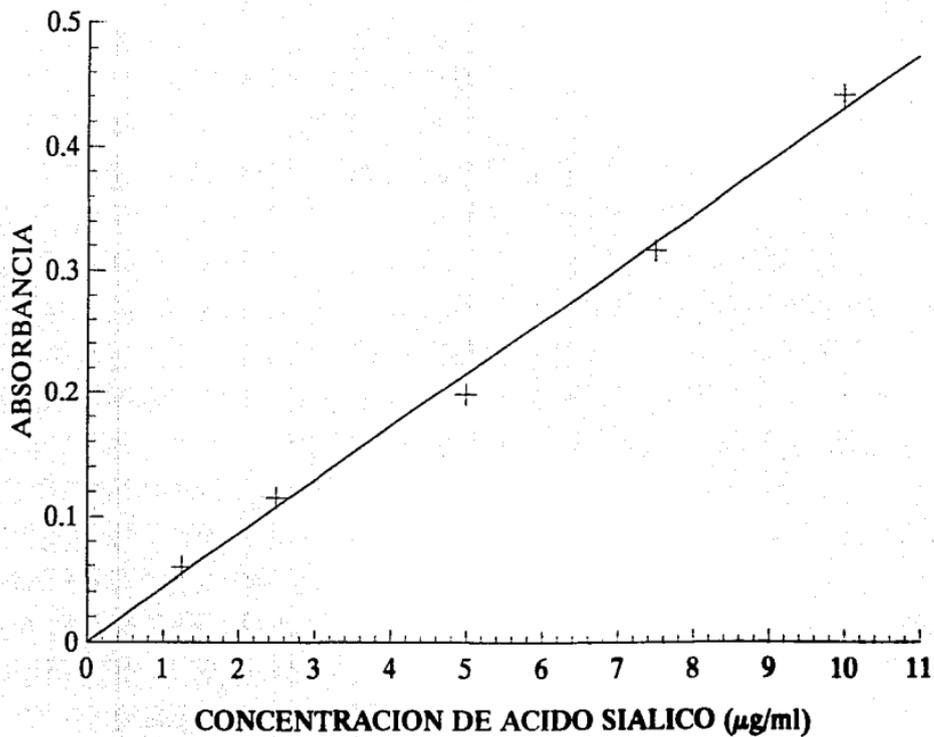


FIGURA 7
CURVA ESTANDAR DE ACIDO SIALICO



BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Wilson D J, Foster W D. **Endocrinología**. Tomo I; 7a ed., Ed. Médica Panamericana. Argentina, 1988: 315-380.
- 2.- Bond A. and Collin P., **Sex hormone binding globulin in clinical perspective**, Acta Obstet. Gynecol. Scand., 1987, 66(3):255-62.
- 3.-Petra H. P., **The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent development on the structure, molecular biology and function**; J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1991, vol 40 No 4-6:735-753.
- 4.-Avvakumov N. I., Zhuk and Strelchenok, **Biological function of the carbohydrate component of the human sex steroid-binding globulin**, Biokhimiya, 1988, May.; vol. 53 No 5: 838-841.
- 5.-Gershagen S. et al, **Subunits of human sex hormone binding globulin. Interindividual variation in size**, The Journal of Biological Chemistry, 1987, vol. 262 No 17:8430-8437.
- 6.-Sinnecker G., **Stability of sex-hormone-binding globulin in serum and plasma**, Clin. Chem; 1989, Jun 35(6): 1253-4.
- 7.-Edmunds S.E. et al., **Estrogen and androgen regulation of sex hormone binding globulin secretion by a human liver cell line**, J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 1990, Dec. 37 (5): 733 - 9.
- 8.-Vermeulen A., **Physiology of Testosterone-Binding Globulin in man**, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1988, 538:103-111.
- 9.-Yang Cheng C., Musto A.N. et al., **Demonstration of heavy and light protomers of human testosterone-estradiol-binding globulin**, J. Steroid Biochem., 1983, 19(4):1379-1389.
- 10.-Danzo J. B. et al, **Analysis of the oligosaccharides on androgen-binding proteins: Implications concerning their role in structure/function relationships**, J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 1991, vol. 40 No 4-6:821-831.
- 11.-Hicks J.J., Díaz Zagoya J., **Bioquímica e Inmunología**, Editado por la Facultad de Medicina de la UNAM, México, 1988:149-155.

12.-Thijssen H.H., **Hormonal and nonhormonal factors affecting sex hormone-binding globulin levels in blood**, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1988, 538:280-286.

13.-Moore K. L., **Embriología Clínica**, 3a ed., Ed. Interamericana S.A., México, 1988:21-28.

14.-Blake R.E. et al; **Dexamethasone suppresses sex-hormone binding globulin**, Fertil Steril., 1988, 49(1): 66-70.

15.-Zárate A., Macgregor C., Castelazo L.; **Endocrinología ginecológica y del embarazo**; Ed. La Prensa Medica Mexicana, México 1973. pp 124-133.

16.-Greenspan S.F., Forsham H.P., **Endocrinología básica y clínica**, Ed. Manual Moderno; México, 1988, :142-160.

17.- Kaplan A.,Lawrence, Pesce J.A. **Química Clínica.Técnicas de laboratorio, fisiopatología & Métodos de análisis**, Ed. Médica Panamericana; Argentina, 1988: 159-177, 245-270 y 867-884.

18.-Rose, N.R.; Freedom H.; **El Laboratorio en inmunología clínica**, 2a ed., Ed. Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1984. pp 388 - 413.

19.-RaithL., **Introduction to Radioimmunoassay Methods**, Frankfurt, West Germany, 1975, Ed.Kern & Birner: 9-30.

20.-T. Chard; **An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques**. 2a ed., Ed Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, Netherlands. 1982. pp 169 - 185.

21.-Fisher L., **Introducción a la cromatografía en gel**, Ed. El Manual Moderno, México, 1975:6-17 ss.

22.-Chaplin M.F. and Kennedy., **Carbohydrate analysis a practical approach**, IRL Press Oxford England 1987. pp 143 ss.

23.-Voet D., Voet G. J., **Biochemistry**, Ed. John Wiley and sons. USA 1990. pp 260 - 267.

24.-Warren L.,**The thiobarbituric acid assay of sialic acids**,The Journal of Biological Chemistry;1959,vol.234 No 8:1971-1975.

25.-Kinsella A. V., Berns J. G. & O'Kennedy R., **A modified thiobarbituric acid method for the determination of N-Acetylneuraminic acid**, Biochemical Society Transactions, Feb., 1991, Vol.19 No 1:56s.

- 26.-Anderson D C, **Sex hormone binding globulin**. Clinical Endocrinol, (Oxf) 1974, 3:69.
- 27.-Cheng CY, Bardin CW, Musto NA, Gunsalus GL, Cheng SL, Ganguly M. **Radioimmunoassay of testosterone-estradiol-binding globulin in humans: a reassessment of normal values**. J Clin Endocrinol Metab. 1983; 56: 68-75.
- 28.-Kirschner MA, Samojlik E, Silber D. **A comparison of androgen production and clearance in hirsute and obese women**. J Steroid Biochem. 1983; 19: 607-14.
- 29.-Longcope C, Goldfield SR, Brambilla DJ, Mckinlay J. **Androgens, estrogens, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men**. J Clin Endocrinol Metab. 1990; Dec.71(6):1442-6.
- 30.-Pax HBW, Dirk TS. **No change in plasma free testosterone ratio and plasma sex-hormone-binding-globulin concentration during HCG stimulation**. J Clin Endocrinol Metab 58(6): 1193-96.
- 31.-Haffner SM, Katz MS, Stern MP, Dunn JF. **Association of decreased sex hormone binding globulin and cardiovascular risk factors**. Arteriosclerosis. 1989; 9: 136-43.
- 32.-Danzo BJ and Black JH. **Structure of asparagine-linked oligosaccharides on human and rabbit testosterone-binding globulin**. Biol Reprod. 1990; 42: 472-82.
- 33.-Ryan RJ, Keutmann HJ, Charlesworth MG, McCormick DJ, Miluis RP et al. **Structure-function relationships of gonadotrophins**. Rec Prog Horm Res. 1987; 43: 383-429.
- 34.-Strel'chyonok OA and Avvakumov GV. **Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function**. J Steroid Biochem. 1990; 35: 519-34.
- 35.-Hammond GL, Underhill DA, Smith CL, et al. **The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of the steroid-binding domain**. FEBS Lett. 1987;215: 100-4.
- 36.-Walsh KA, Titani K, Kumar S, Hayes R and Petra PH. **Amino acid sequence of the sex steroid-binding protein (SBP) of human blood plasma**. Biochemistry. 1986; 25: 7584-90.
- 37 -Danzo BJ, Black JH, and bell BW. **The microheterogeneity of rabbit testosterone-binding globulins due to differential glycosilation of its single protomer**. 1989; 41: 957-65.
- 38 -Burton R M, Westphal U **Steroid hormone binding protein in blood plasma**. Metabolism 1972, 21 253-76

39.-Iqbal M J and Johnson M W. **Purification and characterization of human sex hormone binding globulin.** J Steroid Biochem 1979; 10: 535-40.

40.-Gordon G G, Olivo J, Raffi F, Southren A I. **Conversions of androgens to estrogens in cirrhosis of the liver.** J Clin Endocrinol Metab 1975; 40: 1018.

41.-Tetsuya T, Dawn M N and Partridge M W. **Differential binding of testosterone and estradiol to isoforms of sex hormone binding globulin: Selective alteration of estradiol binding in cirrhosis.** J Clin Endocrinol Metab 1988; 67 (4): 639-643.

42.-Avvakumov G V, Zhuk N I and Strel-chynok O A. **Subcellular distribution and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium.** Biochim Biophys Acta 1986; 881: 489-498.

43.-Hryb D J, Khan M S, Romas N A and Rosner W. **Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate.** J Biol Chem 1989; 264: 5378-5383.