

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LAS
DIVERSAS ISOFORMAS DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE EN SUJETOS CON
OBESIDAD EXTREMA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
BIOLOGA CECILIA CASTRO FERNANDEZ

MEXICO, D. F. 2000

28201



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

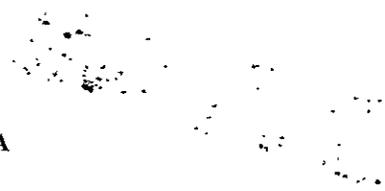


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



DEDICATORIA

A Juan por todo el cariño y apoyo que me has dado y por creer en mi.

A mis papás y hermanos por ayudarme a alcanzar mis metas.

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Juan Pablo Méndez Blanco por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre por fungir como mi co-asesor y por la enseñanza que me ha proporcionado.

A la M. en C. Aleida Olivares Segura por su gran ayuda.

Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Al personal del laboratorio Mecanismos de Acción Hormonal II y al personal de la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA.....	5
SECRECION PULSATIL DE GnRH Y GONADOTROPINAS.....	10
LIBERACION BIFASICA DE GONADOTROPINAS.....	11
MECANISMOS DE REGULACION EN LA SINTESIS DE LH Y FSH.....	12
ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE.....	14
ISOFORMAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE.....	15
OBJETIVOS.....	20
HIPOTESIS.....	20
SUJETOS Y METODOS.....	21
CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD.....	23
CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS SUJETOS CONTROL.....	24
METODOS.....	25
BIOENSAYO <i>in vitro</i> DE LH.....	26
RIA DE AMPc.....	27
RIA DE LH.....	28
CROMATOENFOQUE DE LH.....	29
ANALISIS ESTADISTICO.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSION.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	42

RESUMEN

La síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH) está controlada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica. Ambas gonadotropinas ejercen su acción biológica sobre las gónadas al estimular la eteroidogénesis y la gametogénesis.

Actualmente, se han descrito anormalidades hormonales del eje reproductivo en la obesidad. En los varones, la obesidad extrema se encuentra asociada con concentraciones plasmáticas de testosterona (T) disminuidas y niveles de estrógenos [estrone y estradiol (E₂)] aumentados. Tales cambios en el ambiente endócrino de estos sujetos pueden influir en el proceso celular y/o en uno o más aspectos de la glicosilación terminal de las moléculas de LH y de esta manera afectar sus propiedades tanto biológicas (bioactividad *in vitro*) como fisicoquímicas (carga electrostática).

En el presente estudio, se analizaron la distribución relativa de las isoformas circulantes de LH tanto en condiciones basales (GnRH endógena) así como después de estímulos repetidos con GnRH exógena en sujetos obesos y los hallazgos se compararon con lo encontrado en individuos de peso normal. Por otra parte, se determinó el impacto de los cambios en la glicosilación terminal de LH en la bioactividad *in vitro* de la gonadotropina. Se incluyeron 7 sujetos obesos con un índice de masa corporal (IMC) entre 35.7 y 45.5 kg/m² y 7 varones normales con un IMC entre 22.5 y 24.2 kg/m². A cada sujeto se le extrajo sangre por intervalos de 10 minutos, durante 10 horas en total, antes y después de la administración i.v. de 10 y 90 µg de GnRH.

Con el fin de evaluar la distribución de las isoformas séricas de LH, se constituyeron 3 pozas por separado para cada sujeto correspondientes a las dos horas basales, las cuatro horas pos 10 µg de GnRH y las cuatro horas pos 90 µg de GnRH y se sometieron a un cromatofoco preparativo, las fracciones eluentes fueron analizadas por RIA. Para evaluar la actividad biológica de la LH, se constituyeron 5 grupos de fracciones para cada sujeto de las muestras colectadas sucesivamente a lo largo de intervalos de dos horas conteniendo la LH liberada bajo condiciones basales y con los estímulos de GnRH exógena, se empleó un bioensayo *in vitro* homólogo que determina la cantidad de AMPc producido por las células

HEK-293 (células humanas renales fetales transfectadas con el cDNA del receptor de LH humano). Los niveles medios de T y E₂ séricos fueron significativamente menores y mayores, respectivamente, en los sujetos obesos que en los sujetos control [T sérica, 13.5 ± 2.4 nmol/L vs 19.4 ± 1.4 nmol/L (media ± ES), p=0.01; E₂ sérico, 0.184 ± 0.01 vs 0.153 ± 0.01 nmol/L, p<0.05]. Los valores basales medios de LH sérica fueron similares en los sujetos obesos y en los controles (13.3 ± 1.3 UI/L y 12.2 ± 1.2 UI/L).

Bajo todas las condiciones estudiadas, pero particularmente durante las condiciones basales y después de la administración de la dosis mayor de GnRH, la abundancia relativa de isoformas básicas (aquellas con valores de pH arriba de 7.0) fue significativamente mayor (p < 0.05) en los sujetos obesos comparado con los controles (porcentajes de inmunoreactividad de LH recuperadas en valores de pH ≥ 7.0: sujetos obesos, 34 a 57%; controles, 22 a 46%). La relación bioactividad-inmunoreactividad (B/I) de LH liberada en condiciones basales y después del estímulo con 10 µg de GnRH fue similar en los sujetos obesos y en los controles (basal, 0.30 ± 0.1 y 0.35 ± 0.1 en los sujetos obesos y en los controles respectivamente; 10 µg GnRH, obesos = 0.90 ± 0.08 y 0.59 ± 0.14, controles = 0.97 ± 0.05 y 0.54 ± 0.10, para la LH liberada entre 10 y 120 minutos y entre 130 y 240 minutos después de la administración de GnRH respectivamente; p NS), mientras que la LH liberada por los sujetos obesos en respuesta a la dosis de 90 µg de GnRH presenta relaciones B/I significativamente menores que las detectadas en los individuos normales (0.62 ± 0.07 y 0.45 ± 0.09 vs 1.01 ± 0.10 y 0.81 ± 0.09 para la LH liberada entre 10 y 120 minutos y la liberada entre 130 y 240 minutos después de la administración de GnRH en obesos y en controles, respectivamente; p < 0.05).

Por lo tanto, estos resultados indican que la alteración en el ambiente endócrino que se presenta en la obesidad extrema, provoca un incremento selectivo en la liberación de isoformas básicas de LH, modificando la intensidad de la señal de LH sérica que es transportada a las gónadas. La glicosilación alterada pudiera estar representando un mecanismo adicional que modula el estado hipogonadal que prevalece en la obesidad mórbida.

INTRODUCCION

Obesidad

Las definiciones existentes de obesidad son arbitrarias, ya que la distribución del peso en la población general describe una curva, más que el segregar poblaciones diferentes de obesos y de no obesos (Simopoulos, 1987). En la mayoría de los casos, la obesidad se desarrolla en ausencia de un proceso patológico primario, aunque existen entidades patológicas que la pueden condicionar como por ejemplo, el síndrome de Cushing. Es sencillo comprender que la obesidad se genera cuando existe un mayor aporte energético que el gasto del mismo; lo que no se ha podido determinar con precisión es cuáles son los factores determinantes de este desbalance energético. Es difícil establecer criterios precisos para evaluar la obesidad ya que desafortunadamente, los diversos modelos existentes no dan las mismas respuestas al ser comparados directamente (Lukaski, 1987). Existen técnicas directas para estimar dicha condición como son la densitometría, el estimado de agua total, la cuantificación del potasio corporal (Lukaski, 1987; Bray, 1987). Existen otros métodos que se clasifican como indirectos como son la medición de los pliegues subcutáneos, el índice peso/talla y el índice cintura/cadera (Durnin y Womersley, 1974; Black et al, 1983; Kissebah y Peiris, 1989). Estos últimos son considerados como los más precisos para poder clasificar a determinados individuos como obesos.

El desarrollo de la obesidad generalmente comienza en la infancia, algunos estudios retrospectivos han sugerido que existe progresión directa de un niño obeso a un adulto obeso. Se ha estimado que un 30% de los adultos que son obesos lo fueron durante la niñez y un 80% de adolescentes obesos son adultos obesos (Price et al, 1990).

Recientemente, se ha demostrado que factores genéticos están involucrados en el desarrollo de la obesidad. En estudios realizados en ratas y ratones, se han encontrado genes que pueden causar obesidad extrema, observándose la existencia de genes homólogos en el humano (Zhang et al, 1994). Uno de los genes principales, que intervienen en los mecanismos involucrados con el desarrollo de la obesidad en el humano es el gen *ob*. El producto de este gen, la leptina, es una hormona de 16 kilodaltones que circula en el suero, es producida en el tejido adiposo blanco. Dicha hormona, se une a receptores específicos en el hipotálamo los cuales alteran la expresión de algunos neuropéptidos que regulan la función neuroendócrina y el consumo energético (Mantzoros, 1999; Elmquist, et al, 1998). Las concentraciones de leptina en suero se encuentran elevadas en sujetos obesos en comparación con sujetos de peso normal. El incremento de dichas concentraciones parece estar correlacionado con el porcentaje de grasa corporal. Los mecanismos responsables de esto, involucran la inducción del gen *ob*, ya que se ha encontrado una mayor cantidad de mRNA *ob* en los adipocitos de sujetos obesos que en aquellos de sujetos de peso normal. Los cambios en la grasa corporal se traducen en cambios en las concentraciones de leptina sérica a nivel de la expresión del gen *ob*. La pérdida de peso resulta en una disminución de los niveles plasmáticos de leptina (Beales y Kopelman, 1996); las altas concentraciones de leptina encontradas en el suero de sujetos obesos sugieren una disminución en la sensibilidad a la leptina (Hamilton et al, 1995; Lonnqvist et al, 1995).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

En 1949, Everet y cols, propusieron que la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas era mediada por la acción que el sistema nervioso central (SNC) ejercía sobre la hipófisis anterior. Mc Cann y cols, (1960) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de ambas gonadotropinas por la hipófisis anterior y en 1971 los trabajos tanto de Matsuo et al, como de Schally et al, confirmaron que un decapeptido era el directamente responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Las neuronas controladoras de la secreción de GnRH reciben inervación de otras neuronas capaces también de estimular o inhibir la función gonadal. Ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina modifican la secreción de GnRH (Barraclough y Wise, 1982). Por ejemplo, la inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal de la rata desencadena la liberación de GnRH y consecuentemente de hormona luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH); los bloqueadores alfa adrenérgicos previenen la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y alteran la ovulación en la mujer. Las endorfinas influyen también en la secreción de GnRH y consecuentemente de gonadotropinas durante la pubertad (Ulloa-Aguirre et al, 1988). Asimismo, se ha observado que la administración de naloxona (antagonista opiode) induce la ovulación en pacientes con diagnóstico de hiperprolactinemia, amenorrea o anorexia nervosa (Tay et al, 1993; Larrea et al, 1995; Matera et al, 1995).

El SNC se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico (Marshall et al, 1988). Este péptido es secretado, siempre en forma pulsátil,

por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media; una vez que alcanza la circulación porta-hipofisiaria es transportado hacia la hipófisis anterior, estimulándose la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (Bergland y Page, 1978). Se ha demostrado que los pulsos de frecuencias altas (pulsos rápidos) favorecen la síntesis y secreción de LH, mientras que los pulsos de frecuencias bajas (pulsos lentos) favorecen la secreción de FSH (Turgeon y Waring, 1982; Dalkin et al, 1989).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión estimula la hidrólisis de fosfoinosítoles de membrana y moviliza el calcio de los depósitos intracelulares. La GnRH activa a su receptor estimulando la activación de las proteínas G, las cuales estimulan a la fosfolipasa C (PLC) para que se produzca la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). El rol del IP₃ en este mecanismo es poco claro, pero el DAG actúa activando la protein kinasa C (PKC). La activación de la PKC en forma directa puede estimular la liberación de la LH (Clayton y Catt, 1981; Catt y Stojilkovic, 1989; Conn, 1989; Hawes y Conn, 1993). La GnRH también induce un incremento del calcio intracelular el cual actúa como un segundo mensajero en la liberación de LH inducida por GnRH (Hawes y Conn, 1993). Estas acciones, provocan un aumento bifásico de la concentración de calcio citosólico y consecuentemente inducen la liberación de las gonadotropinas (Catt y Stojilkovic, 1989). Los mecanismos dependientes de calcio, son los responsables de la liberación inmediata de las gonadotropinas contenidas en los gránulos secretorios y éstos también contribuyen en la síntesis de las subunidades de las gonadotropinas. Un mediador intracelular de la señal de calcio en el gonadotropo es la calmodulina, la cual

después de unirse al calcio altera la actividad de varias enzimas y proteínas del citoesqueleto que están implicadas en los procesos secretorios (Conn et al, 1995). Asimismo, se ha propuesto que la activación de un elemento proteico existente en el complejo contráctil citoesqueleto-vesícula, se presenta después de la fosforilación, induciéndose entonces la extrusión de los gránulos que contienen a las hormonas (Conn, 1989).

El número de receptores hipofisarios para GnRH puede ser incrementado farmacológicamente mediante la exposición de la glándula a GnRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una respuesta mayor de la glándula a la estimulación con GnRH (Hazum y Conn, 1988; Laws et al, 1990).

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la tirotropina, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades unidas por fuerzas no covalentes denominadas subunidad alfa y subunidad beta, unidas por fuerzas no covalentes. La alfa es idéntica entre estas glicoproteínas, y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos (Boothby et al, 1981; Fiddes y Goodman, 1981; Godine et al, 1982; Fiddes y Talmadge, 1984; Gordon et al, 1988); mientras que la beta es única para cada una de ellas y les confiere su especificidad biológica (Chappel et al, 1983; Fiddes y Talmadge, 1984; Ulloa-Aguirre et al, 1995b). La actividad biológica de las glicoproteínas hipofisarias sólo se observa si ambas subunidades se encuentran unidas (Tsatsoulis et al, 1991).

Ambas gonadotropinas hipofisarias ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios) al estimular la secreción de esteroides sexuales, así como la maduración de los gametos (Chappel et al, 1983). En los testículos, la LH induce la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, el principal de éstos es la

testosterona (T); en la mujer la LH estimula la esteroidogénesis ovárica. En el varón, el sitio primario de acción de la FSH es el epitelio de los túbulos seminíferos, uniéndose a la cara basal de las células de Sertoli con la consecuente estimulación de la espermatogénesis y de la síntesis de diversos compuestos de naturaleza proteica [inhibina, activina, proteína fijadora de andrógenos (ABP)] y del complejo enzimático de aromatasas que convierte a la T en estradiol (E₂); en el ovario, la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa para estimular el desarrollo folicular (Ulloa-Aguirre et al, 1985; Veldhuis, 1991).

La LH se une a receptores específicos localizados en la membrana de la célula blanco. En el testículo, interactúa con sus receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células de Leydig (Dufau y Catt, 1978). En el ovario, el receptor de LH se localiza en las células de la granulosa (Richards, 1994). El receptor de LH es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Simoni et al, 1997; Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998); consiste de una cadena única de aminoácidos que posee un gran dominio extracelular para la unión del ligando, siete regiones transmembranales conectadas entre sí por asas intra y extracelulares y un dominio intracelular asociado con la activación de una o más proteínas transductoras de señal que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (Minegishi et al, 1991; Kelton et al, 1992). En conjunto, las siete regiones transmembranales forman una estructura tridimensional semejante a un cilindro, el cual se encuentra orientado perpendicularmente al plano de la membrana celular. El dominio extracelular está compuesto por 338 residuos de aminoácidos, exhibe alta afinidad y especificidad por sus ligandos aún cuando el receptor sea expresado en ausencia de los dominios transmembranales o cuando se exprese en una forma quimérica con los dominios

transmembranales y el dominio carboxilo terminal de otros receptores de proteínas G (Bhowmick et al, 1996; Moyle et al, 1991; Segaloff et al, 1990; Thomas et al, 1996). Este dominio extracelular presenta múltiples segmentos repetidos (n=14) ricos en Leu (Segaloff et al, 1990; Thomas et al, 1996). En particular, las regiones ricas en Leu 1-6 determinan la existencia de alta afinidad y especificidad de unión (Thomas et al, 1996). Algunos estudios que emplean receptores mutantes han demostrado la existencia de un sitio adicional importante para la afinidad de unión de la LH localizado en el segundo dominio transmembranal (Asn383), así como un sitio de unión del ligando de baja afinidad en una región específica de la tercer asa extracelular (Lys583) (Gilchrist et al, 1996; Ryu et al, 1996). Aparentemente, este sitio de unión es crítico para activar conductores transmembranales específicos que eventualmente llevan a la generación de señales intracelulares particulares, tales como AMPc (Gilchrist et al, 1996).

El gen que codifica al receptor de LH/hCG en el humano se encuentra localizado en los brazos cortos del cromosoma 2, específicamente en la banda p21 (Rousseau et al, 1990). Este gen, tiene una región codificante de más de 60 Kb, constituida por 11 exones y 10 intrones, que produce una proteína de 699 aminoácidos. Los exones 2-8 y 10 son muy similares en tamaño, midiendo de 70 a 80 pares de bases (pb), los exones 1 y 9 son de aproximadamente 200 pb, mientras que el exón 11 está constituido por más de 1000 pb. En la región flanqueante 5' se encuentran secuencias que regulan la respuesta transcripcional del gen a algunas hormonas, factores de crecimiento y análogos de segundos mensajeros. Los primeros 10 exones codifican al gran dominio extracelular del receptor, mientras que el exón 11 es el encargado de codificar al dominio intracelular de la proteína.

Secreción pulsátil de GnRH y gonadotropinas

La GnRH, liberada en forma pulsátil condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El tónico, es el patrón de secreción observado en los varones y también uno de los mecanismos existentes en la mujer, mientras que la secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente es pulsátil en todas las etapas de la vida, bien que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto). Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, existe dificultad para detectar los pulsos cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (Spratt et al, 1988) y en sujetos con obesidad (Vermeulen et al, 1993).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, pues al exponer a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (Lalloz et al, 1988; Conn y Crowley, 1991). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada induce una respuesta hormonal disminuida. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobre-estimulación de la célula (Ascoli, 1982). Asimismo, ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria, además de que la frecuencia en la pulsatilidad de GnRH es modificada de acuerdo con el ambiente endocrino existente; por ejemplo, esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (Marshall et al, 1991).

Liberación bifásica de gonadotropinas

Al igual que otras hormonas proteicas, las gonadotropinas son almacenadas en gránulos liberándose en forma bifásica (Lacy et al, 1973; Bremner y Paulsen, 1974). Esta liberación se caracteriza por un aumento agudo inicial, presentándose posteriormente un período de estabilización seguido por una segunda fase de incremento en la tasa de secreción. El fenómeno de la liberación bifásica se ha explicado mediante la existencia de dos pozas metabólicas de hormona liberable. Se ha considerado que la primera poza metabólica es sintetizada en gránulos cercanos a la membrana celular y es fácilmente liberable. La segunda, originada en gránulos no tan cercanos a la membrana celular, posiblemente requiere de la síntesis *de novo* de hormona en respuesta a un aumento sostenido de calcio, lo cual ocasiona la migración de los gránulos hacia la membrana celular y la subsecuente liberación de la hormona (Leong y Thorner, 1991; Conn et al, 1995). Se ha demostrado que durante la infusión de GnRH (por cuatro horas) en varones normales, las concentraciones de LH sérica presentan un patrón bifásico de elevación. Este patrón es caracterizado por un aumento agudo durante los primeros 30 minutos, seguido por una meseta hasta los 90 minutos aproximadamente, momento en el cual se inicia el segundo incremento el cual continúa hasta el final de la infusión (Bremner y Paulsen, 1974). Se ha sugerido que las dos fases de liberación de LH representan una evidencia clara de la existencia de dos pozas metabólicas funcionales en la hipófisis humana, una que es rápidamente liberable y otra que requiere de una estimulación más prolongada para su liberación (Bremner y Paulsen, 1974; Beitins et al, 1977). Este mismo patrón de liberación ha sido descrito para la FSH ya que se ha observado que después del estímulo con GnRH

existe una respuesta aguda a los 20 minutos y una segunda respuesta a los 120 minutos (Rebar et al, 1973; Ulloa-Aguirre et al, 1988).

La administración de dosis submáximas de GnRH por un período de varias horas, bien sea mediante inyecciones repetidas o por infusión continua, permite llevar a cabo tanto la evaluación de la poza metabólica de gonadotropinas que se libera de forma aguda como aquella que se libera tardíamente. Cada poza metabólica representa distintas condiciones fisiológicas, pues la primera refleja la sensibilidad del gonadotropo y la segunda la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos pozas metabólicas hipofisarias de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisaria. Si la estimulación con GnRH es breve y pequeña (5-10 μ g), el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisaria, requiere de una duración más prolongada del estímulo o de una mayor cantidad de GnRH (90-100 μ g). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje, la cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100-150 μ g), no se pueden apreciar por separado los componentes de sensibilidad y reserva, ya que la existencia de una acción más potente ocasiona la liberación de ambas pozas de manera conjunta (Wang et al, 1976).

Mecanismos de regulación en la síntesis de LH y FSH

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas (Winters et al,

1979; Winters y Troen, 1985; Gharib et al, 1987; Winters et al, 1992). Los receptores esteroideos han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde se han relacionado además con la regulación de la conducta sexual y la diferenciación del cerebro (Urban et al, 1991).

La secreción de LH es controlada por la acción de retroalimentación negativa ejercida por la T y el E₂. La T o sus metabolitos actúan en el SNC para retardar el generador de pulsos hipotalámico y consecuentemente disminuir la frecuencia de liberación pulsátil de LH (Matsumoto y Bremner, 1984). La aplicación de infusiones agudas de E₂ disminuye los niveles de LH asociándose con un incremento en la frecuencia y una disminución en la amplitud de los pulsos de LH (Santen, 1975). Los opioides endógenos desempeñan un rol en las acciones de retroalimentación negativa de andrógenos y estrógenos en la secreción pulsátil de LH en el varón (Veldhuis et al, 1984).

Existen otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas a nivel central. La prolactina inhibe directamente la secreción de GnRH (Milenkovic et al, 1994; Calogero et al, 1996). La dopamina, que bajo algunas circunstancias directamente inhibe la secreción de LH (Quigley et al, 1981). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar en el hipotálamo al modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) mientras que a su vez la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (Marshall y Kelch, 1986).

Actividad biológica de la hormona luteinizante

La acción biológica de las hormonas no está necesariamente determinada por los niveles inmunoactivos de las mismas, sino por la actividad biológica específica que posee cada una de estas hormonas. Con base en lo anterior, podemos señalar que la determinación de la actividad biológica será la que finalmente indicará con mayor precisión las acciones *in vivo* que tendrá dicha hormona. Los primeros ensayos para determinar la actividad biológica de LH fueron realizados *in vivo*. (Matteri et al, 1990; Storrington et al, 1988). Sin embargo el realizar ensayos *in vivo*, en condiciones variadas, no es factible desde el punto de vista biológico. Asimismo, estos ensayos en muchas ocasiones no poseen una especificidad completa son imprecisos y poco sensibles. En años recientes se han diseñado ensayos biológicos *in vitro*, para valorar la actividad biológica de la LH. Estos se han llevado a cabo en tejidos endocrinos, membranas, cultivos primarios de células dispersas, o en líneas celulares permanentes. Debido a que un gran número de sustancias pueden potenciar o inhibir la respuesta en el bioensayo, siempre se deberá de elegir el bioensayo más específico para cada caso. Uno de los bioensayos más sensibles y específicos es el desarrollado por Jia et al, (1993), en el cual se utilizan líneas celulares, transfectadas con el receptor recombinante de LH humano (hLHR). Las líneas celulares con el receptor recombinante, tienen una estabilidad del cultivo por mayor tiempo, responden de una manera dosis dependiente a la LH y no a otras hormonas glicoproteicas, permiten que el bioensayo tenga especificidad de especie, no se requiere de un cultivo primario y puede ser completado en 24 horas después de la adición de la hormona. La alta sensibilidad y especificidad de dicho bioensayo facilita la medición de la bioactividad en muestras de suero que contienen bajas concentraciones de gonadotropina como

sucede en los sujetos obesos (Strain et al, 1987; Kley et al, 1981; Strain et al, 1982; Dunaif et al, 1988).

Isoformas de la hormona luteinizante

La hormona luteinizante, al igual que otras glicoproteínas, no es una hormona de estructura única sino que está constituida por un grupo de isoformas. La presencia de variaciones en la estructura y en la distribución de oligosacáridos sializados y sulfatados en la hormona, constituye la base química para la formación de las isoformas (Pantel et al, 1998). Los oligosacáridos desempeñan un rol importante en el plegamiento, ensamblaje de subunidades y secreción de la molécula, además de que determinan la tasa de depuración metabólica así como la interacción de la hormona con su receptor (Sairam, 1989; Ulloa-Aguirre et al, 1995b; Ruddon y Bedows, 1997). Cada isoforma posee características biológicas particulares como son su capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades *in vitro* e *in vivo*, características éstas que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas (Ulloa-Aguirre et al, 1991).

Los residuos de ácido siálico y de sulfato, presentes en los oligosacáridos de las gonadotropinas determinan su tasa de depuración metabólica, así como la potencia biológica *in vivo* de la molécula (Morell et al, 1971; Wide, 1986; Wide y Hobson, 1986; Fiete et al, 1991; Timossi et al, 1998b). Los sulfatos terminales favorecen la remoción de las gonadotropinas de la circulación en su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor específico (Fiete et al, 1991); por el contrario, el ácido siálico disminuye la captación hepática (Morell et al, 1971). Estudios llevados a cabo mediante la utilización de isoformas de LH hipofisarias humanas altamente purificadas, han corroborado que los

carbohidratos y en particular el contenido de ácido siálico de éstas isoformas es determinante para la unión al receptor y para la actividad biológica *in vivo*, ya que las isoformas con menor contenido de ácido siálico son rápidamente depuradas de la circulación (Burgon et al, 1996). Wilson et al, (1990) demostraron que al tratar a la LH hipofisiaria de rata con enzimas que remueven los residuos de ácido siálico, identificaron un mayor contenido de isoformas básicas, las cuales incrementaron su potencia biológica *in vitro* al incrementar su punto isoelectrónico.

Los residuos de ácido siálico y los de sulfato, determinan la distribución por carga de las isoformas de la LH (Baenzinger y Green, 1988). Se han aislado múltiples isoformas por carga en extractos de hipófisis anterior, suero y orina de varias especies animales, incluido el hombre (Robertson et al, 1977a,b; Van Damme et al, 1977). Los cambios en la actividad biológica de LH a consecuencia de su glicoheterogeneidad, se expresan según la relación o el cociente actividad biológica/actividad inmunológica (B/I). Este cociente varía según el sistema celular utilizado para valorar ambas actividades (Ulloa-Aguirre et al, 1995a,b; Zambrano et al, 1995; 1996; Timossi et al, 1998a).

La estructura de los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas se encuentra regulado por varios factores. La GnRH, además de ser el factor más importante en la regulación y síntesis de gonadotropinas, también modula la glicosilación de la LH (Wide et al, 1996).

La mayor resolución para la separación de isoformas se obtiene mediante técnicas que separan por carga como el isoelectroenfoque (IEF) o el cromatofoco (CF). Este último método ofrece la ventaja adicional de que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana del pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y nuevamente procesadas a través de un intervalo de pH

diferente, sin que exista pérdida significativa de la actividad (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982). Ha sido demostrado, que las isoformas de LH tienen predominantemente carga positiva (pI que corresponden a valores de 6.5 a 10.0), en contraste con lo que ha sido descrito para las isoformas de FSH (Robertson et al, 1977a,b; Van Damme et al, 1977).

La rata y el hámster han sido los modelos experimentales más utilizados para la caracterización del pleomorfismo de la LH. Por medio del IEF o del CF, varios grupos de investigadores han caracterizado detalladamente la distribución de las diversas isoformas de LH tanto *in vitro* como *in vivo* durante diversas condiciones fisiológicas y experimentales (Robertson et al, 1982). En extractos hipofisarios de hámsters y ratas, hembra y macho, se ha demostrado la presencia de 6 a 7 isoformas inmunoactivas de LH (Keel y Grotjan, 1985; Ujihara et al, 1990). Otras especies utilizadas para estudiar el pleomorfismo de la LH han sido los ovinos, bovinos y porcinos observándose que los puntos isoeléctricos de las isoformas de éstos se encuentran en un intervalo de pH que va de 5.12 a 10.58 (Nomura et al, 1989; Zalesky y Grotjan, 1991). Se ha demostrado que las isoformas de la LH intrahipofisaria y sérica presentan un intervalo de pH de <4.0 a 10.0, a diferencia de algunas preparaciones de LH urinaria que presentan un intervalo de 6.71 a 8.14. En dichos estudios también se ha evaluado la actividad biológica, y se ha observado que la mayor actividad la presentan las isoformas más básicas (Robertson et al, 1977a,b; Ropelato et al, 1999; Van Damme et al, 1977). Sin embargo, en otros estudios (Widc, 1985; Wilson et al, 1990; Mitchell et al, 1994) se ha observado que las isoformas de LH ácidas son las que presentan una mayor actividad biológica.

Diversos estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de T y de la globulina transportadora de esteroides sexuales se encuentran disminuidas en

varones obesos (Glass et al, 1977; Stanik et al, 1981; Strain et al, 1987; Zumoff et al, 1990; Pasquali et al, 1991). A pesar de que los mecanismos internos responsables de esta disminución son en la actualidad desconocidos, se ha demostrado que la pérdida de peso puede revertirlos lo que ha confirmado que son secundarios al desarrollo de la obesidad (Pasquali et al, 1988). Asimismo, se ha demostrado que la respuesta de las células de Leydig a la estimulación farmacológica con hCG se encuentra dentro de los valores de referencia en los sujetos obesos, sugiriéndose con ello que la causa primaria de la disminución de las concentraciones de T no se encuentra a nivel testicular (Glass et al, 1977; Amatruda et al, 1982). Por otro lado, existe controversia en cuanto a las concentraciones basales de gonadotropinas en los sujetos obesos, ya que en algunos estudios se han encontrado concentraciones dentro de los valores de referencia (Glass et al, 1977; Amatruda et al, 1978), mientras que en otros se han observado concentraciones, de LH y FSH, subnormales (Strain et al, 1987; Kley et al, 1981; Strain et al, 1982; Dunaif et al, 1988). Esto último ha sugerido que la alteración en la secreción de T en los sujetos obesos es secundaria a una alteración hipotálamo-hipofisiaria. Un estudio practicado por Vermeulen et al, (1993) demostró que las concentraciones de LH son significativamente menores en los obesos que en los no obesos; además de que la amplitud en los pulsos de LH y la cantidad total de LH secretada también se encuentran disminuidas en estos individuos.

Las concentraciones de E_2 y estrona se encuentran incrementadas en los sujetos obesos (Schneider et al, 1979; Stanik et al, 1981). Este incremento se debe, en gran parte, a la conversión extraglandular de precursores de andrógenos a estrógenos, pero también puede haber un incremento en la secreción de E_2 en los testículos (Schneider et al, 1979). La aromatización de andrógenos a estrógenos se presenta en varios tejidos, principalmente en el tejido adiposo; esta aromatización extraglandular

se incrementa con la edad y con la obesidad (Siiteri y MacDonald, 1973). El E_2 secretado tanto por los testículos como aquel producido por la aromatización central y periférica puede influenciar la secreción de gonadotropinas por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel central (Winters y Troen, 1985). El E_2 puede influir también en el proceso celular y/o en uno o más aspectos de la glicosilación terminal de las moléculas de LH (Veldhuis y Dufau, 1987). La administración de estrógenos en el humano induce la secreción de isoformas básicas de LH; no está claro si este es un efecto directo o indirecto del estrógeno sobre la hipófisis (Wide et al, 1996). De igual manera, se sabe que la T aumenta los niveles de sialización en la hipófisis. Mitchell et al, (1994) observaron que al encontrarse concentraciones de T disminuidas éstas pueden inducir una síntesis y liberación preferencial de formas de LH más básicas.

Con base en todo lo anterior se puede inferir que los mecanismos responsables para el discreto estado hipogonadotrópico existente en sujetos obesos masculinos pudiesen ser de origen neuroendócrino.

OBJETIVOS

Determinar la actividad biológica *in vitro* de la LH tanto en condiciones basales, como después de estímulos repetidos con GnRH a dosis baja (sensibilidad) y a dosis alta (reserva). Comparar la relación de la actividad biológica con la actividad inmunológica entre los dos grupos de estudio, bajo las diferentes condiciones experimentales.

Caracterizar las diversas formas moleculares de LH secretadas tanto en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH en sujetos obesos y comparar los hallazgos con lo encontrado en individuos de peso normal.

HIPOTESIS

La actividad biológica *in vitro* de la LH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos repetidos con GnRH, es diferente en los sujetos con obesidad con respecto a los sujetos control.

Las isoformas circulantes de LH presentan variaciones en su distribución por carga en sujetos con obesidad, con respecto a lo encontrado en sujetos de peso normal.

SUJETOS Y METODOS

Se incluyeron 7 sujetos obesos y 7 varones de peso normal. A los sujetos obesos participantes en este estudio se les realizó una evaluación clínica completa con el fin de excluir la presencia de cualquier proceso patológico, estos sujetos no recibieron ningún tratamiento o drogas anorexigénicas durante seis meses previos al estudio; asimismo se determinó el índice de masa corporal (IMC) (Tabla 1). Este se define de la forma siguiente: el peso dividido entre el cuadrado de la altura (P/A^2), expresado en kilogramos por metro al cuadrado. Se considera a un IMC de 25 como el límite superior de lo normal, se considera como sobrepeso al índice entre 25 y 29.9, y de 30 en adelante se clasifica a un individuo como obeso. Para realizar el estudio, se obtuvo aprobación tanto del comité de estudios en humanos, así como de los sujetos participantes.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Los pacientes fueron canalizados media hora antes de iniciar el estudio con una mariposa n° 21 en una vena antecubital. El muestreo siempre se inició a las 0800 hrs. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon 0.4 ml correspondientes a la solución salina administrada para mantener la vena permeable.

Inicialmente, se tomaron 3 ml de sangre para cuantificar LH, FSH, T y E_2 basales. Posteriormente, a cada sujeto se le extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron 10 μ g de GnRH sintética (SERONO de México D.F., SA de CV) y se extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 4 horas. Al finalizar dicha etapa, se administraron 90 μ g de GnRH

i.v. y se efectuó el mismo muestreo antes indicado por 4 horas más. En total se extrajeron 93 ml a cada individuo.

Durante las 10.5 horas, los pacientes permanecieron en posición de decúbito e ingirieron una dieta estándar baja en grasas, tanto a las 0900 hrs como a las 1400 hrs.

CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD

1. Sujetos masculinos entre 20 y 32 años de edad.
2. Índice de masa corporal mayor o igual a 35 kg/m².
3. Hemoglobina mayor de 13 gr/dl y hematocrito mayor del 40 %, tres días antes del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD

1. Presencia de cualquier tipo de enfermedad endocrina asociada o crónica debilitante después de una evaluación clínica detallada.
2. Presencia de cualquier tipo de sangrado.

CRITERIOS DE ELIMINACION PARA LOS SUJETOS CON OBESIDAD

1. Alteración de los signos vitales durante el muestreo.
2. Reacción de cualquier tipo atribuible a la GnRH administrada en la prueba de estimulación.

CRITERIOS DE INCLUSION PARA LOS SUJETOS CONTROL

1. Sujetos masculinos entre 20 y 32 años de edad.
2. Encontrarse entre las percentilas 25 y 75 de peso.
3. Hemoglobina mayor de 13 gr/dl y hematocrito mayor del 40 %, tres días antes del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION PARA LOS SUJETOS CONTROL

1. Presencia de cualquier tipo de enfermedad endocrina asociada o crónica debilitante después de una evaluación clínica detallada.
2. Presencia de cualquier tipo de sangrado.

CRITERIOS DE ELIMINACION PARA LOS SUJETOS CONTROL

1. Alteración de los signos vitales durante el muestreo.
2. Reacción de cualquier tipo atribuible a la GnRH administrada en la prueba de estimulación.

MÉTODOS

Para la determinación de las concentraciones hormonales basales, los reactivos fueron donados por el Programa Especial de Investigación, Desarrollo y Entrenamiento en Investigación en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ginebra, Suiza). Las concentraciones de LH y FSH, fueron determinadas mediante RIA de doble anticuerpo y los resultados se encuentran expresados en UI/L de acuerdo con la segunda preparación de referencia internacional (2^oIRP-HMG) (Tabla 2). Los coeficientes de variación inter e intra análisis fueron de 11 % y 6 % para LH y de 10 % y 7 % para FSH respectivamente. Los coeficientes de variación inter e intra análisis para T fueron menores al 7.0 % y al 8.0 % mientras que para E₂ fueron menores al 7.0 % y al 7.5 %.

Cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se coagulase. Posteriormente, fueron centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 15 minutos. El suero resultante de cada muestra (aproximadamente 900 µl) se separó en 2 alícuotas.

- 1) Una alícuota de 400 µl que se utilizó para constituir los grupos de fracciones para el bioensayo.
- 2) Una alícuota de 500 µl utilizada para constituir las pozas para el cromatofoco.

Estas alícuotas se congelaron a -20°C hasta el día en que se llevó a cabo el análisis correspondiente.

Para evaluar la actividad biológica de la LH, se constituyeron 5 grupos de fracciones (GF) para cada sujeto, correspondientes a las 2 horas basales (GF 1), primeras 2 horas pos 10 µg de GnRH (GF 2), siguientes 2 horas pos 10 µg de GnRH

(GF 3), primeras 2 horas pos 90 µg de GnRH (GF 4), y últimas 2 horas pos 90 µg de GnRH (GF 5).

Con el fin de evaluar el patrón de distribución de las diversas isoformas de LH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90 µg de GnRH, se constituyeron tres pozas por separado para cada sujeto, correspondientes a las dos horas basales (poza 1), las cuatro horas pos 10 µg de GnRH (poza 2), y las cuatro horas pos 90 µg de GnRH (poza 3). Cada una de las pozas fue transferida a bolsas de diálisis con una permeabilidad de 12,000-14,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA), dializándose inicialmente durante 24 horas con agua bidestilada desionizada y posteriormente con carbonato de amonio 0.01 M durante 24 horas más. Finalmente cada una de las pozas fue liofilizada con el fin de ser resuspendida en el menor volumen posible para su separación en el cromatofluor.

BIOENSAYO *in vitro* DE LH

La actividad biológica *in vitro* de los concentrados correspondientes a cada uno de los GFs se determinó mediante el empleo de un bioensayo que cuantifica el AMPc en células humanas renales fetales HEK-293, transfectadas con cDNA del receptor recombinante para LH humana (hLH), siguiendo la técnica descrita por Jia et al, (1993) (Figura 1). Estas células fueron donadas por el Dr. Aaron J.W. Hsueh, de la Universidad de Stanford, CA, EUA. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Life Technologies, Gaithersburg, MD), pH 7.3, complementado con 5% de suero fetal de ternera (SFT) (Gibco, BRL), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA), 100 mg/ml de geneticina (Life Technologies), 50 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina

BIOENSAYO CELULAS HEK-293

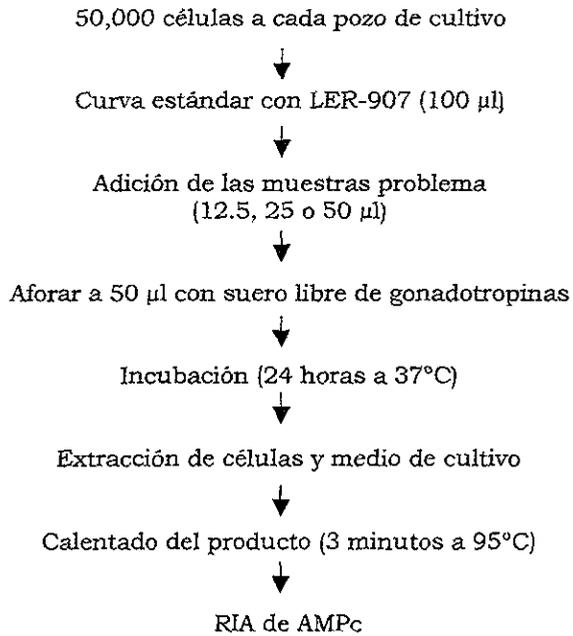


FIGURA 1. Técnica de bioensayo utilizada para la medición de la actividad biológica de la LH.

(Sigma) y se crecieron en cajas de 162-cm² (Coster, Cambridge, MA, EUA). Las células confluentes se rasparon y se sembraron en cajas de 24 pozos de 16 mm (Gibco, BRL) por 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ (5 X 10⁴ células/pozo de cultivo). Posteriormente, las células fueron lavadas y expuestas a diferentes dosis del estándar utilizado (LER-907) o de cada uno de los GFs de LH (12.5, 25 o 50 µl) en presencia de 0.125 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma) disuelto en 450 µl de DMEM complementado por 24 horas a 37°C. Las muestras (desconocidas y estándares) se diluyeron con suero de mujeres tratadas con anticonceptivos orales, que contenían una inmuno y bioactividad de LH no detectable, de tal manera que la concentración final de suero humano en cada muestra no excediera el 10% (50 µl/pozo de cultivo). Después de la incubación, el medio y las células fueron extraídos y calentados a 95°C por 3 minutos y posteriormente se almacenaron a -20°C, hasta el momento de la cuantificación del contenido de AMPc total (intra y extracelular) el cual fue determinado por RIA. La sensibilidad de los ensayos fue de 0.075 mUI/tubo. Todos los GFs de un sujeto fueron estudiados por triplicado en un mismo bioensayo. Los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron de <18% y <10%, respectivamente.

RIA DE AMPc

Se determinaron las concentraciones de AMPc total (intra y extracelular) por RIA, siguiendo la metodología descrita por Zambrano et al, (1999) (Figura 2). El RIA se llevó a cabo utilizándose como estándar, el AMPc (81c-0220) (Sigma). El anticuerpo empleado fue el AMPc CV-27 del National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Bethesda, MD, EUA), a una dilución final de 1:50,000 con acetato de sodio 50mM, albúmina sérica bovina (ASB) al 0.1 %, pH 6.1. Como

RADIOINMUNOANÁLISIS DE AMPc

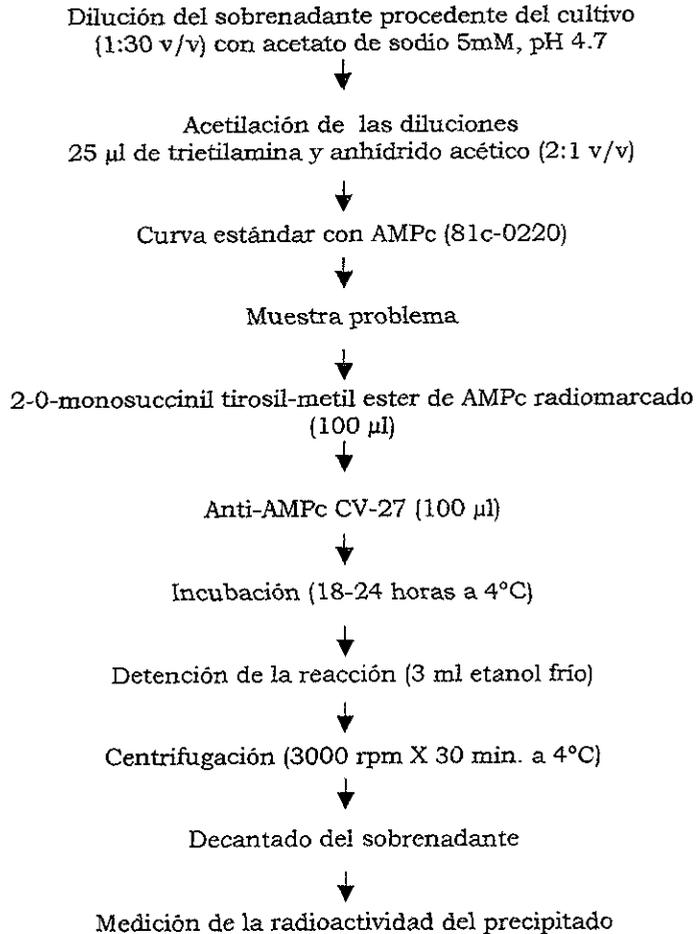


FIGURA 2. Técnica de radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación la producción de AMPc.

marcador se utilizó, 2-0-monosuccinil tirosil-metil éster de AMPc (Sigma) radiomarcado con NaI^{125} (Amersham International Limite, Reino Unido) por el método de Cloramina T (Greenwood et al, 1963). Para incrementar la sensibilidad del ensayo, todas las muestras se acetilaron junto con los estándares, agregándose 25 μl de trietilamina y anhídrido acético en una proporción 2:1 v/v, diluyéndose en acetato de sodio 5mM, pH 4.7. Posteriormente, el ensayo fue incubado a 4°C durante 24 horas, la reacción fue detenida con 2 ml de etanol frío y los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C; por último, se llevó a cabo la decantación y a partir de los inmunoprecipitados se determinó la radioactividad unida al anticuerpo empleándose un contador para radiaciones γ . La sensibilidad del ensayo fue de 4 fmol/tubo y los coeficientes de variación inter e intraensayo fueron de <12% y <6% respectivamente. La actividad biológica fue calculada por interpolación. Los datos fueron expresados como la relación bioactividad/inmunoactividad (B/I), la relación de la actividad *in vitro* en el bioensayo relativa a la del inmunoensayo.

RIA de LH

Para determinar la actividad inmunológica de la LH de cada grupo de fracciones, se llevó a cabo el RIA de LH (Figura 3). Con el fin de que no existieran variaciones interanálisis para un mismo sujeto, todas las muestras de un individuo fueron incluidas en un mismo ensayo.

Los reactivos utilizados fueron donados por el NIADDK utilizándose como estándar de LH a la preparación LER-907 (sensibilidad de 0.26 ng de LH inmunoreactiva), diluida en PBS 0.01M-EDTA-ASB 0.1 %. El anticuerpo utilizado fue el anti-hLH-2, a una dilución final de 1:800,000 en PBS 0.01M-EDTA-ASB 0.1 %.

RADIOINMUNOANÁLISIS DE LH

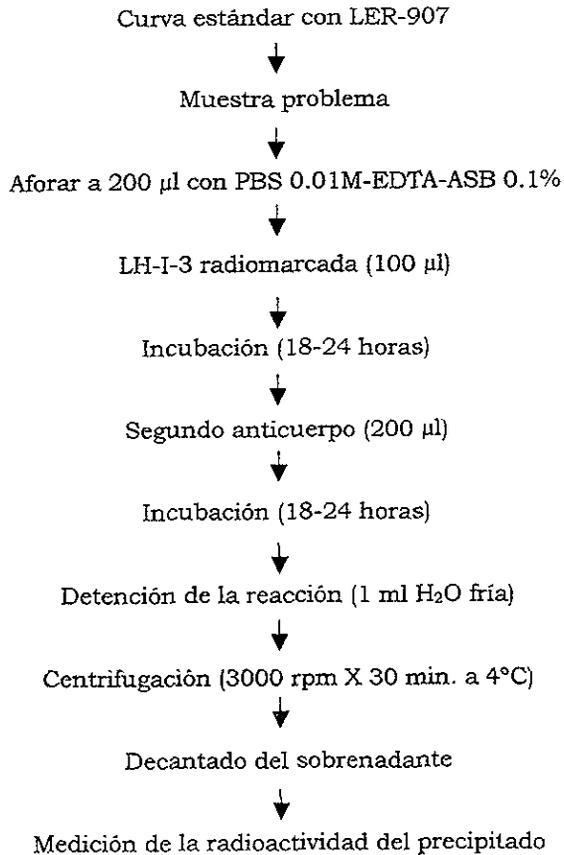


Figura 3. Técnica de radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de la LH inmunoactiva.

Como trazador se utilizó el estándar hLH-I-3 radiomarcado con NaI^{125} (Amersham International Limited, Amersham, Reino Unido) por el método de la Cloramina-T descrito por Greenwood et al (1963). Tanto el estándar como las muestras problema se aforaron a 200 μl con PBS 0.01M-EDTA-ASB 0.1 %, incubándose de 18 a 24 horas a temperatura ambiente, momento en el cual se adicionaron 200 μl del segundo anticuerpo (suero de carnero inmunizado con gamma globulina de conejo) a una dilución 1:10 v/v con PBS 0.01M-PEG 8% y se incubaron durante otras 18-24 horas. Finalmente, la reacción fue detenida agregándose 2 ml de agua bidestilada desionizada fría y las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Posterior a su decantación, se cuantificó la radioactividad del precipitado mediante espectrofotometría utilizando un contador gamma, calculándose la concentración de LH. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron <5% y <8% respectivamente.

CROMATOENFOQUE DE LH

Las diferentes isoformas de LH fueron separadas mediante CF, método por el cual las proteínas son separadas al interaccionar la carga de superficie de la molécula con un soporte de carga inmovilizado. Las isoformas son recuperadas en el eluato cuando el pH del gradiente de elución iguala al punto isoelectrico (pI) de la proteína. El CF ofrece la ventaja adicional sobre otros métodos, en que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo de pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y sometidas nuevamente al procedimiento a través de diferentes gradientes de pH (Ulloa-Aguirre et al, 1990). En este estudio el gradiente de pH utilizado fue de 11.0 a 4.0.

El CF de LH se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Ropelato et al, (1999) (Figura 4). Se empleó como intercambiador iónico la resina PBE-118 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en columnas de 20 x 1 cm, equilibradas con 15 volúmenes del amortiguador de inicio (Trietilamina-HCl 0.025M, pH 11.0). Cada una de las series de sueros liofilizados, fue resuspendida en el menor volumen posible (2.5-5.0 ml) del amortiguador Pharmalyte (Pharmacia) en agua desionizada (1:45 v/v) pH 7.0. Antes de depositar los extractos en la superficie de la columna se corrieron 4 ml del amortiguador de corrimiento (Pharmalyte pH 7.0), con el fin de evitar la exposición de la muestra a valores extremos de pH. Tanto el intercambiador iónico como los amortiguadores empleados en el CF, se degasificaron durante 30 minutos antes de su utilización, con el fin de evitar que los iones de bicarbonato causasen fluctuaciones en el gradiente de pH.

La muestra fue depositada en la columna, y una vez completada su incorporación, se agregó el amortiguador de corrimiento (Pharmalyte pH 7.0). Posteriormente, se colectaron de 64 a 70 fracciones de 2 ml cada una a 4°C. Al detectar en alguna de las fracciones un valor de pH menor o igual a 7.0, el amortiguador de corrimiento pH 7.0 fue sustituido por un segundo amortiguador de corrimiento Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:8 v/v) pH 4.0. Se colectaron de 60 a 70 fracciones hasta detectar un pH menor o igual a 4.0, momento en el cual se cambió dicho amortiguador por una solución de NaCl 1M. Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de recuperar el material que no eluyó dentro del intervalo de pH 11.0 a 4.0 (pico de sal). Hecho esto, se colectaron 20 fracciones adicionales y se procedió a medir el pH de cada una de las mismas. Las fracciones se agruparon por unidad de pH, teniéndose un total de 8 concentrados de fracciones (CDF): mayores de 10 (CDF 1), de 9.99 a 9.0 (CDF 2), de

CROMATOENFOQUE DE LH

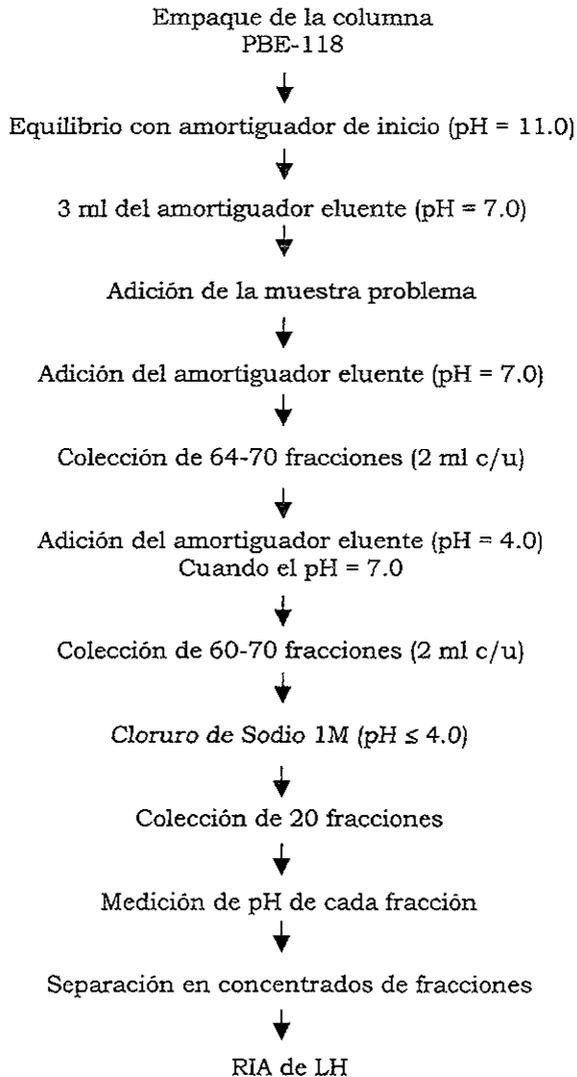


FIGURA 4. Técnica de cromatoenfoque seguida para la separación de las isoformas de la muestra problema.

8.99 a 8.0 (CDF 3), de 7.99 a 7.0 (CDF 4), de 6.99 a 6.0 (CDF 5), de 5.99 a 5.0 (CDF 6), de 4.99 a 4.0 (CDF 7) y el pico de sal (CDF 8, pH < 4.0). Cada uno de estos concentrados, fue dializado por separado con agua bidestilada y desionizada durante 48 horas a 4°C y posteriormente con una solución de carbonato de amonio 0.01M durante 24 horas más. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas para ser resuspendidas en el menor volumen posible de un amortiguador fisiológico salino (0.15 M) de fosfatos (0.05 M), pH 7.4, y de esta forma determinar su concentración de LH por medio del RIA. Las muestras fueron resuspendidas en este amortiguador con el fin de que la mayoría de los CDFs se encontraran dentro de la porción lineal de la curva estándar del RIA de LH (Figura 5). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de recuperación de LH total agregada al cromatoenfoque. Para evitar variaciones inter e intraensayo, todos los CDFs fueron estudiados por triplicado en un mismo ensayo.

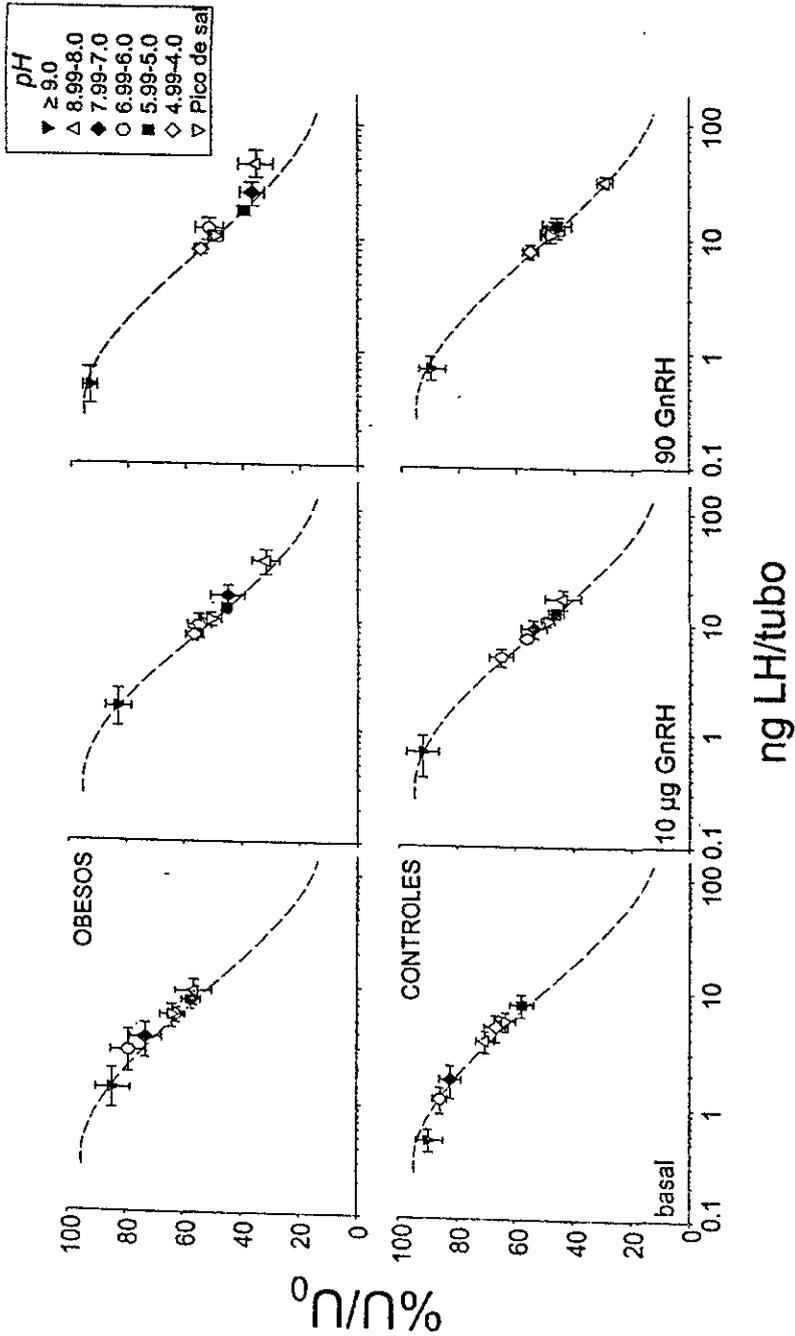


Figura 5. Curvas estándar del RIA de LH empleado en el estudio (línea punteada) y las posiciones de las muestras desconocidas (símbolos). Cada símbolo representa la media ± DE de las dosis y el porcentaje de unión observado en cada serie de muestras basales y estimuladas con GnRH (n=7 por cada grupo de pH; los datos de los grupos de pH de 9.0-9.99 y ≥ 10.0 se combinaron y están representados como pH > 9.0).

ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión paramétrica y no paramétrica según la distribución del grupo en estudio.

Las relaciones B/I de los grupos de fracciones, se compararon por medio de un ANOVA seguido de prueba de *t*. Se utilizó el análisis de regresión lineal para determinar el grado y significancia de las relaciones B/I *in vitro*.

Asimismo, para valorar las diferencias existentes en la distribución de las diversas isoformas de LH entre los dos grupos de estudio tanto en condiciones basales como después del uso de 10 y 90 µg de GnRH se empleó prueba de *t*, o suma de rangos de Mann-Whitney, según fuese el resultado de la prueba de normalidad inicialmente aplicada.

Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La edad y el IMC de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio, se encuentran detallados en la Tabla 1. Todos los sujetos estudiados presentaron concentraciones basales de LH, FSH, T y E₂ dentro de los límites establecidos como normales; los valores de dichas determinaciones se encuentran detallados en la Tabla 2. El valor medio de las concentraciones séricas de T y E₂ fueron significativamente menores y mayores, respectivamente, en los sujetos obesos que en los controles [T: 13.5 ± 2.4 nmol/L vs 19.4 ± 1.4 nmol/L (media ± ES), p = 0.01; E₂: 0.184 ± 0.01 vs 0.153 ± 0.01 nmol/L, p < 0.05]. El valor medio de las concentraciones séricas de LH y FSH fue similar en ambos grupos (LH: 13.3 ± 1.3 UI/L y 12.2 ± 1.2 UI/L; FSH: 7.0 ± 3.2 UI/L y 6.8 ± 3.4 UI/L, respectivamente; p N.S.)

La actividad biológica relativa *in vitro* fue calculada considerando cada dosis (12.5, 25, 50 µl) analizada por RIA, y esto fue expresado como la relación de la actividad B/I. Cada uno de los GFs de los diferentes sueros fueron capaces de inducir la producción de AMPc de forma dosis dependiente, de manera significativa, al ser expuestos a la línea celular HEK-293 (Figura 6). Sin embargo, a pesar de ser uno de los bioensayos más sensibles y específicos, en dos sujetos de cada grupo, los niveles basales de LH bioactiva *in vitro* (GF 1) no fueron detectables, mientras que en los sujetos restantes solamente la dosis de 50 µl del GF 1 mostró bioactividad de LH cuantificable. La relación basal B/I de LH fue de 0.30 ± 0.1 y de 0.35 ± 0.1 para los sujetos obesos y controles, respectivamente (p N.S.). (Tabla 3, Figura 7)

Con respecto a la relación B/I de los GFs restantes pertenecientes a los sujetos obesos, se observaron diferencias significativas (p<0.05) al comparar al GF 2

Tabla 1. CARACTERISTICAS CLINICAS

SUJETO	EDAD	IMC
OBESO		
1	24	37.69
2	32	39.73
3	25	45.48
4	27	36.84
5	28	41.00
6	28	44.24
7	26	35.73
CONTROL		
1	28	23.52
2	25	24.21
3	23	24.22
4	21	22.85
5	23	22.52
6	26	24.30
7	24	22.67

VALORES DE REFERENCIA

OBESOS

IMC = ≥ 35

Tabla 2. CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES

SUJETO	LH* (mUI/ml)	FSH* (mUI/ml)	T (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)
OBESO				
1	2.45	2.05	3.38	47.46
2	2.45	1.65	3.11	56.44
3	5.75	3.00	3.85	58.89
4	4.40	4.15	4.61	51.74
5	4.80	8.25	3.32	41.81
6	5.70	3.80	4.85	50.51
7	1.95	1.55	4.46	44.29
CONTROL				
1	4.00	8.60	4.00	34.92
2	0.75	2.00	5.30	49.95
3	2.05	3.25	3.58	46.87
4	3.55	2.00	6.24	43.47
5	1.30	3.60	7.72	39.80
6	4.25	1.60	6.36	48.83
7	2.30	3.25	5.94	27.98

VALORES DE REFERENCIA EN ADULTOS NORMALES

LH = 3.0-12.0

FSH = 0.5-5.0

T = 3.5-10.0

E₂ = <60

* MEDIA DE DOS MUESTRAS BASALES TOMADAS A INTERVALOS DE 20 MINUTOS.

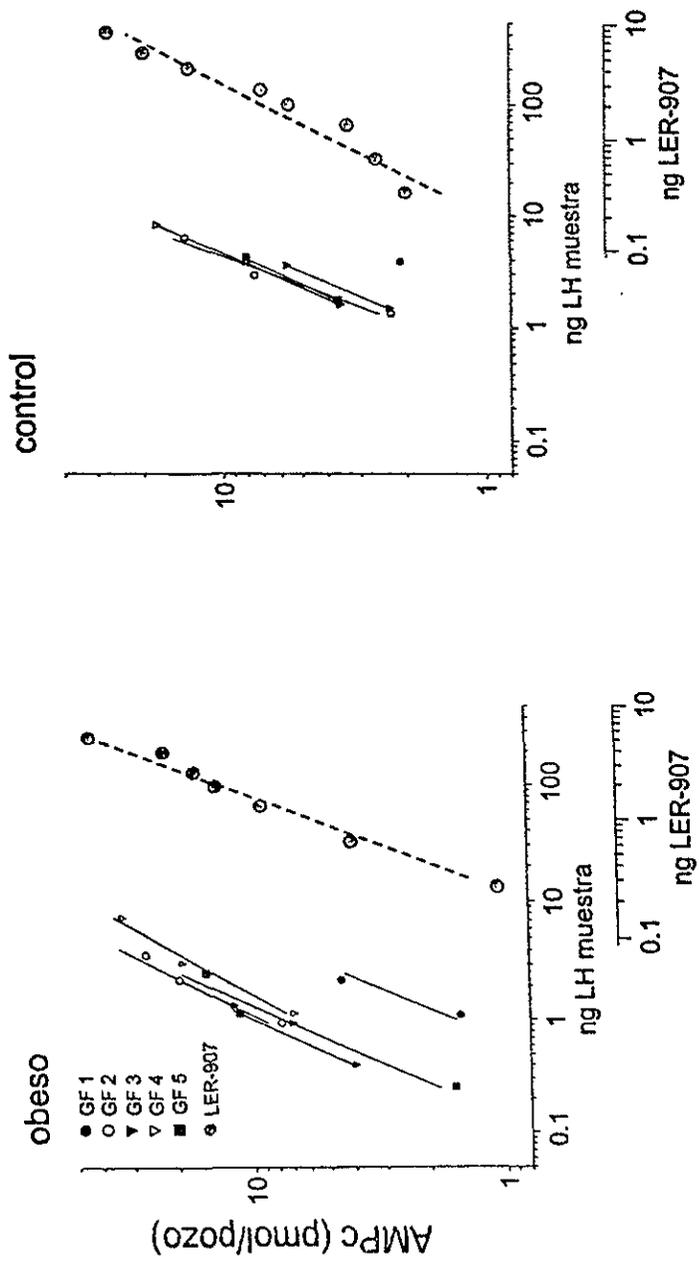


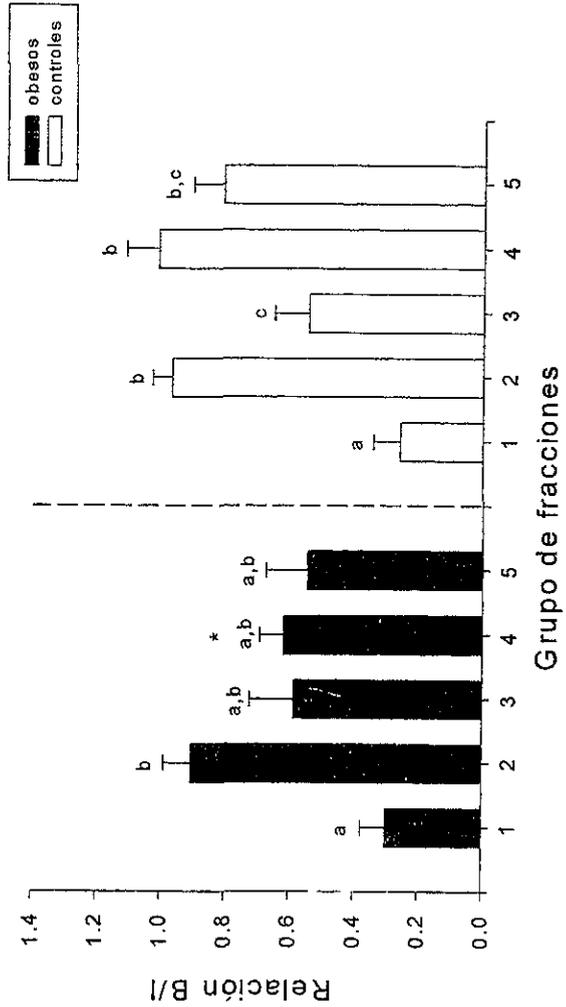
Figura 6. Curvas representativas dosis-respuesta de un sujeto obeso y de un sujeto control. Cada uno de los grupos de fracciones (GF) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Tabla 3. RELACION BIOACTIVIDAD/INMUNORREACTIVIDAD (B/I) DE LH EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS

GF	OBESOS (promedio \pm EE)	CONTROLES (promedio \pm EE)
1	0.30 \pm 0.10 ^a	0.35 \pm 0.10 ^a
2	0.90 \pm 0.08 ^b	0.97 \pm 0.05 ^b
3	0.59 \pm 0.14 ^{b,c}	0.54 \pm 0.10 ^c
4	0.62 \pm 0.07 ^{b,c *}	1.01 \pm 0.10 ^b
5	0.45 \pm 0.09 ^{c *}	0.81 \pm 0.09 ^{b,c}

* p < 0.05 vs controles

Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas (p < 0.05) entre los grupos de fracciones, en la misma población de sujetos.



* $p < 0.05$ vs controles
 Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de fracciones en la misma población de sujetos.

Figura 7. Relación Bioactividad/Inmunorreactividad (B/I) de los diferentes grupos de fracciones en siete sujetos obesos y en siete sujetos control en las células HEK-293.

vs el GF 5; y los sujetos control mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar al GF 2 vs el GF 3 y al GF 3 vs el GF 4 (Tabla 3, Figura 7).

Al comparar los resultados obtenidos de cada GF entre los dos grupos de estudio, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los GFs 4 y 5 de los sujetos obesos con respecto a los GFs 4 y 5 de los sujetos control (Tabla 3, Figura 7).

Por otro lado, el análisis de las muestras de suero por CF demostró que todos los individuos estudiados, en las 3 condiciones experimentales (basal, pos 10 μg y pos 90 μg de GnRH), presentaron múltiples isoformas de LH inmunoreactiva. Estos se encontraron en un intervalo de pH de 9.9-4.0, así como en aquellas fracciones recuperadas después de añadir 1.0 mol/L NaCl a las columnas de CF (pico de sal), con el fin de obtener aquel material que no logró eluir dentro del intervalo de pH antes mencionado. Para cuantificar a las isoformas según su pH específico, se procedió a agruparlas por unidad de pH (en total 8 condiciones experimentales).

Con el fin de evaluar las diferencias existentes en los patrones de distribución de las isoformas de LH entre ambos grupos de sujetos, así como entre las diferentes fases del estudio experimental, cada patrón de CF fue dividido en dos regiones específicas de pH, considerándose el pH de 7.0 como el punto de corte específico, subdividiéndose así en isoformas ácidas e isoformas básicas. Los cambios existentes en el patrón de distribución de las isoformas de LH fueron expresados como el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de LH con valores de pH de elución menor o igual a 6.99, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores o igual a 7.0 (Tabla 4, Figuras 8-10)

Tabla 4. PORCENTAJES DE FORMAS MOLECULARES DE LH EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS

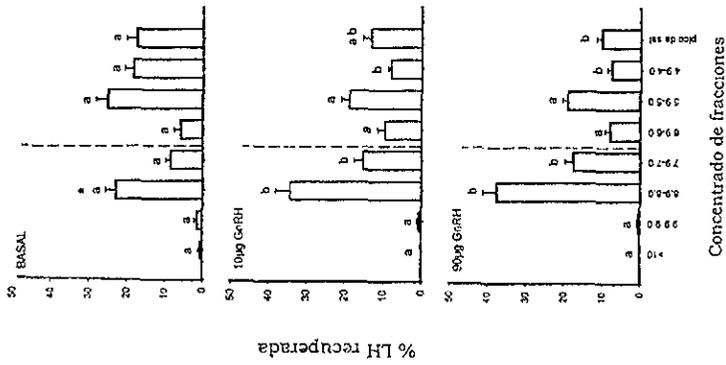
	pH	SUJETOS OBESOS (promedio \pm EE)	SUJETOS CONTROL (promedio \pm EE)
BASAL	≥ 7.00	33.267 \pm 3.83 a&*	21.63 \pm 2.95 a*
	≤ 6.99	66.72 \pm 3.83 a&	78.36 \pm 2.95 a
POS 10 μ g GnRH	≥ 7.00	50.30 \pm 3.85 b	42.98 \pm 2.82 b*
	≤ 6.99	49.68 \pm 3.84 b	57.01 \pm 2.82 b
POS 90 μ g GnRH	≥ 7.00	56.54 \pm 3.67 b&*	46.41 \pm 1.53 b*
	≤ 6.99	43.44 \pm 3.67 b&	53.58 \pm 1.53 b

* p < 0.05 vs pH ≤ 6.99 en el mismo grupo de sujetos.

& p < 0.05 vs controles en la misma área de pH.

Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas (p < 0.05) dentro de la misma área de pH en la misma población de sujetos.

OBESOS



* p < 0.05 vs controles.
 Letras diferentes sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas (p < 0.05) entre los mismos concentrados de fracciones, en la misma población de sujetos

CONTOLES

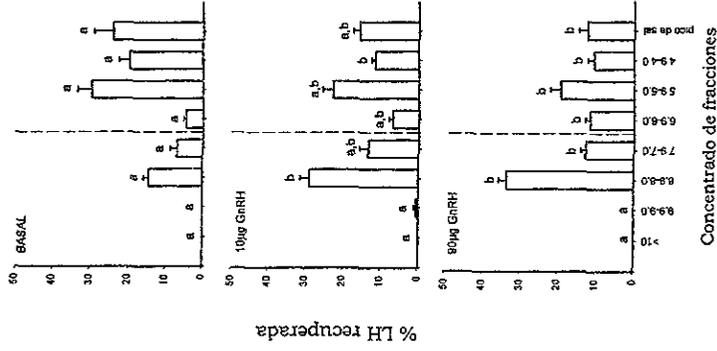
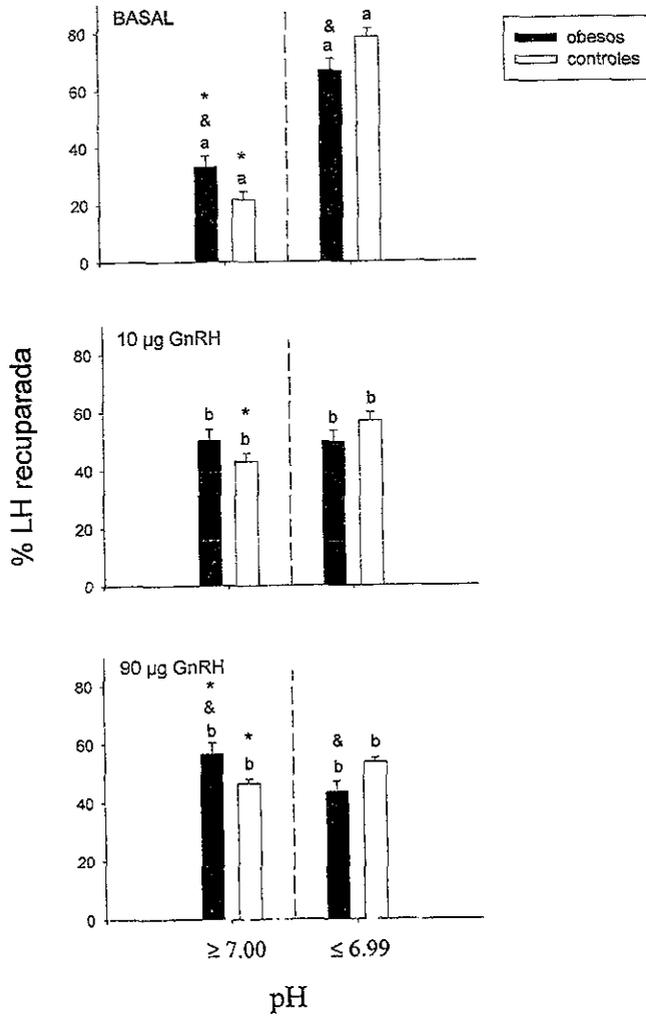


Figura 9. Patrón de distribución por carga de la LH circulante después de su separación por cromatofóque en siete sujetos obesos y en siete sujetos control. Cada una de las barras representa a la media ± el error estándar de los porcentajes de LH recuperada después del cromatofóque de cada una de las muestras basales (gráfica superior) y estimuladas con 10 (gráfica intermedia) y 90 µg de GnRH (gráfica inferior). La línea vertical discontinua indica un valor de pH de elución de 7.00



* $p < 0.05$ vs $pH \leq 6.99$ en el mismo grupo de sujetos.

& $p < 0.05$ vs controles en la misma área de pH.

Letras diferentes sobre las barras indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) dentro de la misma área de pH en la misma población de sujetos

Figura 10. Cambios en el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de LH con valores de pH de elución menor o igual a 6.99, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores o igual a 7.0 en siete sujetos obesos y en siete sujetos control.

En condiciones basales, en todos los sujetos estudiados de ambos grupos, las isoformas de la gonadotropina fueron recuperadas predominantemente en aquellos valores de pH que se encontraron por debajo de 6.9, incluyéndose el pico de sal.

Al aplicar el estímulo con 10 μg del decapeptido se observó que todos los sujetos estudiados presentaron un incremento en el porcentaje de las formas básicas, al compararse con los porcentajes obtenidos en condiciones basales. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas al hacer la comparación basal vs pos 10 en los sujetos con obesidad y en los sujetos control ($p < 0.001$). Posterior al estímulo con 90 μg de GnRH existieron pequeñas diferencias en la distribución de las isoformas ácidas y básicas, en relación con la distribución existente después del estímulo con 10 μg . Ninguna de estas diferencias (entre 10 y 90 μg de GnRH) fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, si existió diferencia al llevar a cabo la comparación basal vs pos 90 en sujetos con obesidad y en los individuos utilizados como controles sanos ($p < 0.001$) (Tabla 4, Figura 10).

Las comparaciones entre los dos grupos de sujetos estudiados demostraron que en condiciones basales, los sujetos con obesidad presentaron una mayor abundancia relativa de las formas básicas en relación con los sujetos control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.038$) (Tabla 4, Figura 10). Al llevar a cabo la comparación entre los dos grupos después del estímulo con 10 μg de GnRH no se observaron diferencias significativas en cuanto a la proporción de isoformas mayores o menores de 7.0 entre ambos grupos ($p > 0.05$). Sin embargo, después del estímulo con 90 μg de GnRH se pudo observar que los sujetos con obesidad presentaron, al igual que en condiciones basales, una mayor abundancia de las isoformas básicas en relación con lo encontrado en los controles ($p = 0.026$) (Tabla 4, Figura 10).

DISCUSION

Estudios previos han demostrado que las gonadotropinas intrahipofisarias y circulantes existen en isoformas con diferentes cargas y que la producción y liberación de isoformas individuales está regulada por el ambiente endocrino existente (Ulloa-Aguirre et al, 1988; Ulloa-Aguirre et al, 1995). Las concentraciones de residuos de sulfatos y ácido siálico terminales cargados negativamente presentes en los oligosacáridos de la LH parecen conferir la base bioquímica principal en las variaciones de las isoformas y la heterogeneidad de carga general observada en diversas especies de mamíferos y no mamíferos (Green y Baezinger, 1988; Stockell Hartree y Renwhich, 1992).

El presente estudio muestra que la LH circulante en los sujetos con obesidad contiene una proporción incrementada de las isoformas básicas comparado con los sujetos con un IMC normal. La diferencia entre las isoformas de LH de los sujetos obesos y los controles no fue modificada significativamente por la administración de GnRH exógena, lo que permitió analizar de igual manera las isoformas presentes en diferentes pozas metabólicas intracelulares en las células gonadotrópicas (Wang et al, 1976; Suginami et al, 1985; Veldhuis et al, 1987). Diversos mecanismos pueden explicar este incremento de las isoformas básicas de LH en los sujetos obesos. Algunos estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la GnRH puede regular la glicosilación postraduccional de la LH (Liu et al, 1976; Vogel et al, 1986; Suginami et al, 1985; Veldhuis et al, 1987; Evans et al, 1984). De acuerdo a este razonamiento, en los sujetos obesos la mayor proporción de isoformas básicas puede resultar de una sensibilidad incrementada a la GnRH endógena ayudada por el ambiente enriquecido en estrógenos que prevalece en estos individuos. Por ejemplo, las

mujeres secretan una mayor proporción de isoformas básicas de LH y FSH durante la fase folicular tardía del ciclo menstrual (Zambrano et al, 1995; Wide y Bakos, 1993; Anobile et al, 1998), un estado fisiológico de sensibilidad hipofisiaria a la GnRH incrementada y una alta producción de estrógenos. Asimismo, isoformas de LH alcalinas circulan en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, que han acentuado la señalización de y/o aumentado la respuesta hipofisiaria a la GnRH, que podría ser facilitada por un ambiente incrementado de estrógenos (Ropelato et al, 1999).

A pesar de que en la relativamente pequeña cohorte de sujetos obesos estudiados, encontramos concentraciones basales de LH séricas normales así como parámetros de secreción de LH provocados por GnRH exógena, un estudio realizado con un muestreo frecuente, detectó un estado de hipogonadismo hipogonadotrópico relativo en obesidad mórbida (Vermeulen et al, 1993). Sin embargo, este estudio analizó un grupo de sujetos obesos de mayor edad y que exhibían un mayor grado de obesidad que la población estudiada aquí. De esta manera, el grado de alteración de la unidad hipotálamo hipofisiaria en sujetos obesos puede estar determinada por diversos factores, incluyendo la edad del sujeto, magnitud y duración de la obesidad e inclusive el grado de resistencia hipotalámica a la leptina, una proteína recientemente implicada en la regulación neuroendócrina del eje reproductivo en roedores de ambos sexos (Cunningham et al, 1999). Por otro lado, proporciones elevadas de isoformas básicas de LH en sujetos obesos pueden deberse solamente a una exposición hipofisiaria incrementada a estrógenos endógenos. Evidencia derivada de estudios clínicos y experimentales soportan esta posibilidad. La LH sérica de mujeres posmenopáusicas, que se encuentra cargada negativamente en mayor proporción que en cualquier otra etapa del ciclo menstrual (Anobile et al,

1988), se vuelven menos ácidas durante un tratamiento con estrógenos a largo plazo (Wide y Naessén, 1994; Wide et al, 1995). En ratas hembras castradas, la incorporación de N-acetilgalactosamina, así como de sulfatos en los oligosacáridos de LH es reducida significativamente al ser tratadas con estrógenos (Darmesh y Baenziger, 1993). Mas recientemente, se ha demostrado que la expresión de RNAm de α -2,3 sialiltransferasa en la hipófisis anterior, [una de las enzimas que incorpora residuos de ácido siálico a las hormonas glicoproteicas (Baenziger y Green, 1988)] es regulada negativamente por los estrógenos (Damián-Matsumura et al, 1999).

Finalmente, niveles séricos reducidos de T también pueden influir en la producción de isoformas básicas de LH por los gonadotropos en los sujetos obesos. En carneros castrados, la administración de dihidrotestosterona incrementó el porcentaje de isoformas intrahipofisarias de LH menos básicas (Christianson et al, 1998) y en humanos los niveles séricos de T se correlacionan con isoformas más ácidas de LH en la circulación (Mitchell et al, 1994). Basándonos en las consideraciones previas, sugerimos que la expresión sostenida del gonadotropo a un ambiente hormonal alterado en esteroides sexuales, marcado por un incremento relativo en la relación sérica de estradiol/testosterona, promueve la elevada producción de isoformas básicas en individuos con sobrepeso.

Por otro lado, ha sido ampliamente demostrado que los oligosacáridos unidos a las hormonas glicoproteicas tienen una gran influencia en la vida media plasmática y por consiguiente en la bioactividad *in vivo* de la hormona (Ulloa-Aguirre et al, 1999; Morell et al, 1971; Galway et al, 1990; Fiete et al, 1991; Bishop et al, 1995; Burgon et al, 1996; Fiete y Baenziger, 1997, 1997; Stanton et al, 1996). Los oligosacáridos de la LH humana presentan residuos terminales cargados negativamente ya sea de ácido siálico (~35%), sulfatos (~26%) o ambos (~23%)

(Baenziger y Green, 1988). Mientras que la exposición de los oligosacáridos con terminación galactosa-ácido siálico a receptores hepáticos específicos incrementa la velocidad de remoción de la hormona de la circulación (Morell et al, 1971; Galway et al, 1990). La presencia de residuos terminales N-acetilgalactosamina-4-sulfato u oligosacáridos que presentan manosa terminal o N-acetilglucosamina, aceleran la depuración metabólica de la molécula por receptores específicos presentes en el endotelio hepático y en las células de Kupffer (Fiete et al, 1991; Fiete y Baenziger, 1997). Estudios recientes han demostrado que entre las diferentes isoformas de LH, las variantes más básicas exhiben el menor contenido de ácido siálico y que la desialización enzimática de las isoformas más ácidas decrece la vida media plasmática de la hormona (Burgon et al, 1996; Stanton et al, 1996). Estos análisis acentúan la importancia del azúcar terminal en determinar la sobrevivencia de la LH en la circulación.

La relación B/I *in vitro* de las isoformas de LH aisladas de hipófisis humanas, como ha sido cuantificada mediante bioensayos esteroidogénicos, es menor en las isoformas más ácidas [puntos isoeléctricos (pI) 6.0-7.0], incrementos graduales de isoformas menos ácidas, alcanza una meseta con isoformas con valores de pI de ~7.2-8.0, y después decrece a variantes más alcalinas (pI > 8.0) (Suginami et al, 1985; Stanton et al, 1996). Este perfil de campana de la bioactividad *in vitro* de las isoformas de FSH hipofisiaria en donde una ausencia de bioactividad en ensayos de aromatización, fue detectada en variantes recuperadas en valores de pH altamente alcalinos, que presuntivamente representan variantes poco glicosiladas (Ulloa-Aguirre et al, 1995; Timossi et al, 1998). En el presente estudio, empleamos un bioensayo homólogo de LH *in vitro* para estudiar la potencia biológica de la mezcla de isoformas liberadas de la hipófisis en respuesta a GnRH endógena (basal) y

exógena. Tanto los sujetos normales como los sujetos obesos, manifestaron un incremento significativo en la relación bio-inmunoactividad de LH secretada inmediatamente después de la administración iv de una pequeña dosis (10 µg) de GnRH exógena (dosis suficiente para liberar LH de una poza metabólica intracelular liberable, biológicamente enriquecida). Un incremento en la relación B/I de LH en un bioensayo de LH homólogo, concuerda con datos previos que muestran que la administración de una dosis iv pequeña de GnRH exógena resultó en liberación preferencial de LH bioactiva utilizando el bioensayo de las células de Leydig de rata, con un incremento en la relación bio-inmunoactividad de LH plasmática en varones normales (Veldhuis et al, 1987). En las muestras colectadas durante la tercera y cuarta horas después de la administración de la dosis pequeña de GnRH, la relación B/I sérica disminuyó, probablemente por el restablecimiento de la secreción de LH controlada por la GnRH endógena. La administración de una dosis suprafisiológica de GnRH (90 µg) mostró una anomalía intrínseca en la capacidad de la glándula hipofisaria en los varones obesos de sintetizar LH bioactiva, como se muestra en la relación B/I de LH reducida en los GFs 4 y 5. La posible falla del gonadotropo para sintetizar LH altamente bioactiva puede representar un mecanismo adicional para el estado hipogonadotrópico referido en la obesidad mórbida.

El presente estudio, no identifica inequívocamente que la anomalía en la capacidad de la glándula hipofisaria de sintetizar LH altamente bioactiva en los sujetos obesos se deba a los niveles de T sérica disminuidos y/o a la exposición sostenida del gonadotropo a estrógenos séricos moderadamente elevados u otros factores no esteroideos. A pesar de que algunos estudios *in vitro* en roedores mostraron que la exposición a T incrementa la relación B/I de LH secretada por los gonadotropos (Solano et al, 1980), otra evidencia derivada de estudios *in vivo*

demonstraron que hiperestrogenismo endógeno sostenido se encuentra asociado con la supresión de concentraciones plasmáticas de LH biológicamente activa en varones (Veldhuis et al, 1985). Esto último estaría relacionado con el concepto de que los estrógenos disminuyen la sialización de LH y FSH, produciendo de esta manera, moléculas no completamente glicosiladas y altamente alcalinas (Darmesh y Baenziger, 1993; Damián-Matsumura et al, 1999), algunas de las cuales pueden exhibir una potencia biológica *in vivo* y vida media disminuidas (Suginami et al, 1985; Ulloa-Aguirre et al, 1995; Stanton et al, 1996; Timossi et al, 1998).

En resumen, la distribución de cargas de las isoformas de LH circulante se encuentra alterada en la obesidad severa, de tal manera que las isoformas más alcalinas son secretadas bajo condiciones de estimulación tanto con GnRH endógena como exógena. Esta elevación hacia las isoformas alcalinas en la obesidad parece, de igual manera, alterar su potencia a nivel del receptor de LH humano. Estas alteraciones en la estructura y función de la LH pueden deberse a niveles de T sérica reducidos y/o a una elevación sostenida de estrógenos endógenos en la obesidad. Por lo tanto, las anomalías en los mecanismos regulatorios que controlan la intensidad de la señal de la LH pueden contribuir en parte con el estado hipogonadotrópico observado en varones con obesidad severa.

BIBLIOGRAFIA

- Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, et al. Glycoform composition of serum gonadotrophins throughout the normal menstrual cycle and in the postmenopausal state. *Mol Hum Reprod* 1998, 4:631.
- Amatruda JM, Harman SM, Pourmotabbed G. Hypothalamic and pituitary dysfunction in obese males. *Int J Obes* 1982, 6:183.
- Amatruda JM, Harman SM, Pourmotabbed G, et al. Depressed plasma testosterone and fractional binding of testosterone in obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 1978, 47:268.
- Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 1982, 257:13306.
- Baenzinger JU, Green DE. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of asparagine linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem Biophys Acta* 1988, 947:287.
- Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 1982, 3:91.
- Beales PL, Kopelman PG. Obesity genes. *Clin Endocrinol* 1996, 45:373.
- Beitins IZ, Dufau ML, O'Loughlin K, et al. Analysis of biological and immunological activities in the pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone releasing (LHRH) in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977, 45:605.
- Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 1978, 102:1325.
- Bhowmick N, Huang J, Puett D, et al. Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling. *Mol Endocrinol* 1996, 10:1147.
- Bishop LA, Nguyen TV, Schofield PR. Both of the β -subunit carbohydrate residues of follicle-stimulating hormone determine the metabolic clearance rate and *in vivo* potency. *Endocrinology* 1995, 136:2635.
- Black D, James WPT, Besser GM, et al. Obesity. A report of the Royal College of Physicians. *JR Coll Physicians Lond* 1983, 17:5.
- Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, et al. A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 1981, 256:5121.
- Bray GA. Overweight is risking fate. Definition, classification, prevalence, and risks. *Ann NY Acad Sci* 1987, 499:14.
- Bremner WJ, Paulsen CA. Two pools of luteinizing hormone in the man pituitary: Evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 39:811.
- Burgon PG, Stanton PG, Robertson DM. *In vivo* bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996, 137:4827.
- Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, et al. Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release *in vitro*. *J Endocrinol* 1996, 151:269.
- Catt KJ, Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1989, 1:15.

- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1983, 4:179.
- Christianson SL, Zalesky D, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: androgens increase the percentage of less basic isohormones. *Domest Anim Endocrinol* 1998, 15:87.
- Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981, 2:186.
- Conn MP. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: De Groot LJ, Besser GM, Cahill GF Jr, *et al*, (Eds). *Endocrinology*. Segunda edición. Philadelphia: WB Saunders, p.p.284, 1989.
- Conn MP, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 1991, 324:93.
- Conn MP, Janovick JA, Stanislaus D, *et al*. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vit Hor* 1995, 50:151.
- Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999, 60:216.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, *et al*. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 1989, 125:917.
- Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, *et al*. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 1999, 23:153.
- Darmesh SM, Baenziger Ju. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1993, 90:11127.
- Dufau ML, Catt KJ. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitam Horm* 1978, 36:461.
- Dunaif A, Mandeli J, Fluhr H, *et al*. The impact of obesity and chronic hyperinsulinemia on gonadotropin release and gonadal steroid secretion in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 66:131.
- Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged 16 to 72 years. *Br J Nutr* 1974, 32:77.
- Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1998, 1:445.
- Evans RM, Doelle GC, Linder J, *et al*. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist decreases biological activity and modifies chromatographic behavior of luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 1984, 73:262.
- Everet JW, Sawyer OH, Markee Je. Aneurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 1949, 44:234.
- Fiddes JC, Goodman HM. The gen encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Gen* 1981, 1:3.
- Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the gens for the human glycoprotein hormones. *Rec Prog Horm Res* 1984, 40:43.
- Fiete D, Baenziger JU. Isolation of the SO₄-4-GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α -specific receptor from rat liver. *J Biol Chem* 1997, 272:14629.

- Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄ - 4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2 Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 1991, 67:1103.
- Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, et al. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukariotic cell lines. *Endocrinology* 1990, 127:93.
- Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J Clin Invest* 1987, 80:294.
- Gilchrist RL, Ryu KS, Ji I, Ji TH. The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for AMPc and inositol phosphate signals. *J Biol Chem* 1996, 271:19287.
- Glass AR, Swerdloff RS, Bray GA, et al. Low serum testosterone and sex hormone binding globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977, 45:1211.
- Godine JE, Chin WW, Habener JF. Alpha subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J Biol Chem* 1982, 257:8368.
- Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gen of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* 1988, 7:679.
- Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1988, 263:36.
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation to 131-I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 1963, 89:114.
- Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Deitel M. Increased obese mRNA expression on omental fat cells from massively obese humans. *Nature Medicine* 1995, 1:953.
- Hawes BE, Conn PM. Molecular mechanism of GnRH action: do G proteins and inositol phosphates have role?. En: Bouchard P, Caraty A, Coelingh Bennink HJT, Pavloi SN (eds). *GnRH, GnRH analogs, gonadotropins and gonadal peptides*. Butler & Tanner, p.p. 63, 1993.
- Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The receptor. *Endocr Rev* 1988, 9:379.
- Jia XC, Perlas E, Su JGJ, et al. Luminescence luteinizing hormone/choriogonadotropin (LH/CG) bioassay: measurement of serum bioactive LH/CG during early pregnancy in human and macaque. *Biol Reprod* 1993, 43:1310.
- Keel BA, Grotjan Jr HE. Characterization of rat pituitary luteinizing hormone charge microheterogeneity in male and female rats using chromatofocusing: effects of castration. *Endocrinology* 1985, 117:354.
- Kelton CA, Cheng SU, Nugent NP, et al. The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992, 89:141.
- Kissbah AH, Peiris AN. Biology of regional body fat distribution: relationship to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1989, 5:83.
- Kley HK, Deslaers T, Pcerenboom H. Evidence of hypogonadism in massively obese males, due to decreased free testosterone. *Horm Metab Res* 1981, 13:639.

- Lacy PE, Klein JN, Fink JC. Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology* 1973, 92:1458.
- Lalloz MRA, Detta A, Clayton RN. Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone β -subunit gene "in vivo". *Endocrinology* 1988, 122:1689.
- Larrea F, Sandoval JL, Salinas E, *et al.* Evidence for an altered luteinizing hormone sensitivity to naloxone in pathological hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995, 43:591.
- Laws SC, Webster JC, Miller WL. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology* 1990, 127:381.
- Leong DA, Thorner MO. A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem* 1991, 266:9016.
- Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic GnRH on incorporation of radioactive glucosamine, and amino acids into LH and total protein by rat pituitaries "in vitro". *Endocrinology* 1976, 98:151.
- Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Medicine* 1995, 1:950.
- Lukaski HC. Methods for the assessment of human body composition: traditional and new. *Am J Clin Nutr* 1987, 46:537.
- Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med* 1999, 130:671.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 1991, 47:155.
- Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 1986, 315:1459.
- Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. En: Martin L, Ganong WF, (Eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, p.p. 239, 1988.
- Matera C, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Effect of chronic opioid antagonism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in hyperprolactinemic women. *J Clin Endoc Metab* 1995, 80:540.
- Matsumoto AM, Bremner WJ. Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 58:609.
- Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, *et al.* Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43:393.
- Matteri RL, Dierschke DJ, Bridson WE, *et al.* Regulation of the biopotency of primate luteinizing hormone by gonadotropin-releasing hormone in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1990, 43:1045.
- Mc Cann SM, Talcisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc* 1960, 104:432.
- Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:1244.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, *et al.* Cloning and sequencing of the human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 175:1125.

- Mitchell R, Bauerfeld C, Schaefer F, et al. Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis treatment. *Clin Endocrinol* 1994, 41:65.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, et al. The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem* 1971, 246:1461.
- Moyle WR, Bernard MP, Myers RV, et al. Lutropin/ β -adrenergic receptor chimeras bind choriogonadotropin and adrenergic ligands but are not expressed at the cell surface. *J Biol Chem* 1991, 266:10807.
- Nomura K, Ohmura K, Nakamura Y, et al. Porcine luteinizing hormone isoform(s): relationship between their molecular structures, and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology* 1989, 124:712.
- Pantel J, Robert P, Troalen F, et al. Characterization of human lutropin carboxyl-terminus isoforms. *Endocrinology* 1998, 139:527.
- Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, et al. Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 1991, 40:101.
- Pasquali R, Casimirri F, Melchionda N, et al. Weight loss and sex steroid metabolism in massively obese men. *J Endocrinol Invest* 1988, 11:205.
- Price RA, Stunkard AJ, Ness R, et al. Childhood onset (age less than 10) obesity has high familiar risk. *Int J Obes* 1990, 14:185.
- Quigley ME, Rakoff JS, Yen SS. Increased luteinizing hormone sensitivity in dopamine inhibition of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52:231.
- Rebar R, Yen SSC, Vandenberg G, et al. Gonadotropin responses to synthetic LRF: dose-response relationship in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1973, 36:10.
- Richards JS. Hormonal control of gen expression in the ovary. *Endocrine Rev* 1994, 15:725.
- Robertson DM, Diczfalusy E. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. II. A comparison of the immunological and biological activities of pituitary extracts after electrofocusing using different standard preparations. *Mol Cell Endocrinol* 1977a, 9:57.
- Robertson DM, Foulds LM, Ellis S. Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology* 1982, 111:385.
- Robertson DM, Van Damme MP, Diczfalusy E. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone .I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Mol Cell Endocrinol* 1977b, 9:45.
- Ropelato MG, Garcia-Rudaz MC, Castro-Fernández C, et al. A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:4629.
- Rosseau MF, Misrahi M, Atger M, et al. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990, 54:77.
- Ruddon RW, Bedows E. Assisted protein folding. *J Biol Chem* 1997, 272:3125.
- Ryu KS, Gilchrist RL, Ji I, et al. Exoloop 3 of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor. Lys⁵⁸³ is essential and irreplaceable for human choriogonadotropin (hCG)-dependent receptor activation but not for high affinity hCG binding. *J Biol Chem* 1996, 271:7301.

- Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* 1989, 3:1915.
- Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest* 1975, 56:1555.
- Schally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43:1334.
- Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R. Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 48:633.
- Segaloff DL, Sprengel R, Nikolics K, Ascoli M. The structure of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *Recent Prog Horm Res* 1990, 46:261.
- Siitleri PK, MacDonald PC. Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. En: Greep RO, Astwood EB (Eds). *Handbook of Physiology. Sect 7: Endocrinology. Vol II. Male reproductive System. Part I.* Washington, DC: American Physiological Society, p.p. 615, 1973.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. *Endocr Rev* 1997, 18:739.
- Simopoulos AP. Characteristics of obesity: an overview. *Ann NY Acad Sci* 1987, 499:4.
- Solano RS, Garcia-Vela A, Catt KJ, Dufau ML. Modulation of serum and pituitary luteinizing hormone bioactivity by androgen in the rat. *Endocrinology* 1980, 106:1941.
- Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 1988, 254:E658.
- Stanik S, Dornfeld LP, Maxwell MH, et al. The effects of weight loss on reproductive hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 53:828.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996, 125:133.
- Stockell Hartree A, Renwhich GCA. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992, 287:665.
- Storrng PL, Khan SA, Mistry YG, Diczfalusy E. Plasma clearance in the rat of the LH bioactivity of two human LH standards of differing molecular composition. *J Endocrinol* 1988, 119:327.
- Strain GW, Zumoff B, Kream J, et al. Mild hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism* 1982, 31:871.
- Strain GW, Zumoff B, Miller LK, et al. The influence of massive weight loss on the hypogonadotropic hypogonadism of obese men (abstract). *Int J Obcs* 1987, 11 (Suppl 2):54.
- Tay CC, Glasier AF, McNeilly AS. Effect of antagonists of dopamine and opiates on the basal and GnRH induced secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin during lactational amenorhea in breast feeding women. *Hum Reprod* 1993, 8:532.
- Thomas D, Rozell G, Liu X, Segaloff DL. Mutational analyses of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine-rich repeats 1-6 are involved in hormone binding. *Mol Endocrinol* 1996, 10:760.
- Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E, et al. A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinology* 1998a, 67:153.

- Timossi CM, Damián-Matsumura P, Dominguez-Gonzalez A, Ulloa-Aguirre A. A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analog in phenobarbital-blocked proestrus rats. *Mol Hum Reprod* 1998b, 4:1032.
- Tsatsoulis A, Shalet SM, Robertson WR. Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol* 1991, 35:193.
- Turgeon JL, Waring DW. Differential changes in the rate and pattern of follicle-stimulating hormone secretion from pituitaries of cyclic rats superfused in vitro. *Endocrinology* 1982, 111:66.
- Ujihara M, Nomura K, Toraya S, et al. Uninephrectomy inducing quantitative and qualitative changes in LH isoforms in the male rat. *Acta Endocrinol* 1990, 123:365.
- Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol* 1982, 95:257.
- Ulloa-Aguirre A, Conn MP. G-protein-coupled receptors and the G protein family. En: Conn, P.M. (Ed), *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, Oxford University Press, New York, p.p. 81, 1998.
- Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Cravioto A, et al. Microheterogeneity of gonadotropins. En: Negro-Villar A, Pérez-Palacios G, (Eds). *Reproduction, growth and development*. Nueva York: Raven Press, p.p. 315, 1991.
- Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, et al. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod* 1988, 3:491.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Cravioto A, et al. Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod* 1990, 5:661.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, et al. Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endoc Metab* 1985, 61:926.
- Ulloa Aguirre A, Méndez JP, González A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 1988, 29:17.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley R, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995a, 16:765.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 1998, 4:260.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999, en prensa.
- Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Timossi C, Méndez JP, et al. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res* 1995b, 26:219.
- Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V, et al. Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in humans. *J Androl* 1991, 12:27.
- Van Damme MP, Robertson DM, Diczfalusy E. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone .III. Biological and immunological profiles of urine preparations after electrofocusing. *Mol Cell Endocrinol* 1977, 9:69.

- Veldhuis JD. Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En: Yen SSC, Jaffe RB (Eds): Reproductive Endocrinology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders.p.p.409, 1991.
- Veldhuis JD, Dufau ML. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J Clin Invest 1987, 80:631.
- Veldhuis JD, Johnson ML, Dufau ML. Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low dose exogenous gonadotropin-releasing hormone pulses in man. J Clin Endocrinol Metab 1987, 64:1275.
- Veldhuis JD, Rogol AD, Samojlik E, et al. Role of endogenous opiates in the expression of negative feedback actions of androgen and estrogen on pulsatile properties of luteinizing hormone secretion in man J Clin Invest 1984, 74:47.
- Veldhuis JD, Sowers MD, Rogol AD, et al. Pathophysiology of male hypogonadism associated with endogenous hyperestrogenism. Evidence for dual defects in the gonadal axis. N Engl J Med 1985, 312:1371.
- Vermeulen A, Kaufman JM, Deslypere JP, et al. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. J Clin Endocrinol Metab 1993, 76:1140.
- Vogel DL, Magner JA, Sherins RJ, et al. Biosynthesis, glycosylation, and secretion of rat luteinizing hormone alpha and beta-subunits: differential effects of orchietomy and GnRH. Endocrinology 1986, 119:202.
- Wang CF, Lasley BL, Yen SSC. Gonadotropin secretion in response to low and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (Functional disparity of the gonadotrophs). J Clin Endocrinol Metab 1976, 42:427.
- Wide L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. Zone electrophoresis in agarose suspension. Acta Endocrinol 1985, 109:181.
- Wide L. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. Acta Endocrinol (Copenh) 1986, 112:336.
- Wide L, Albertsson-Wikland K, Phillips DJ. More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. J Clin Endoc Metab 1996, 81:216.
- Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. J Clin Endocrinol Metab 1993, 76:885.
- Wide L, Hobson BM. Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. Acta Endocrinol (Copenh) 1986, 113:17.
- Wide L, Naessen T. 17 β -estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. Clin Endocrinol (Oxf) 1994, 40:783.
- Wide L, Naessen T, Phillips DJ. Effect of chronic oral administration of 17 β -oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. Clin Endocrinol (Oxf) 1995, 42:59.
- Wilson CA, Leigh AJ, Chapman AJ. Gonadotrophin glycosylation and function. J Endocrinology 1990, 125:3.
- Winters SJ, Ishizaka K, Kithahara S, et al. Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology 1992, 130:726.

- Winters SJ, Janick JJ, Loriaux DL, Sherins RJ. Studies on the role of sex steroids in the feedback control of gonadotropin concentrations in men. II. Use of estrogen antagonist, clomiphene citrate. *J Clin Endoc Metab* 1979, 48:222.
- Winters SJ, Troen P. Evidence for the role of endogenous estrogen in hypothalamic control of gonadotrpín secretion in men. *J Clin Endoc Metab* 1985, 61:842.
- Zalesky DD, Grotjan HE. Comparison of intracellular and secreted isoforms of bovine and ovine luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1991, 44:1016.
- Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cardenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:563.
- Zambrano E, Olivares A, Méndez JP, *et al.* Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum Follicle-Stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endoc Metab* 1995, 80:1647.
- Zambrano, Zariñan T, Olivares A, *et al.* Receptor binding activity and *in vitro* biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems. Implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine* 1999, 10:113.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372:425.
- Zumoff B, Strain GW, Miller LK, *et al.* Plasma free and non sex-hormone binding globulin bound testosterone are decreased in obese men in proportion to their degree of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 71:929.