



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de las diversas formas moleculares
de la hormona luteinizante (LH) en la rata macho
con obesidad inducida por dieta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

NOMBRE DEL ALUMNO

FERNANDO ABRAHAM ANDRADE DÍAZ

TUTORA

DRA. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA



2007



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.

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno

Andrade

Díaz

Fernando Abraham

52-72-43-52

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

099015163

2. Datos de la Tutora/Propietaria

Dra.

Olivares

Segura

Cristina Aleida

3. Datos de la Sinodal Propietaria

Dra.

Aguilar

Morales

Marcela Esperanza

4. Datos del Sinodal Propietario

M en C.

Palomino

Garibay

Miguel Ángel

5. Datos del Sinodal Suplente

M en C.

Cárdenas

León

Mario

6. Datos del Sinodal Suplente

M en C.

Silencio

Barrita

José Luis

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de las diversas formas moleculares de la hormona luteinizante (LH) en la rata macho con obesidad inducida por dieta.

58 pp.

2007

Agradecimientos

Para todas las personas del Instituto Nacional de Nutrición que me ayudaron para realizar esta tesis, particularmente a los laboratorios de Fisiología de la Nutrición, Biología de la Reproducción y Cirugía Experimental y Bioterio; también para la UIM en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología No. 4; y, claro está, para todas las personas en Centro Médico en las Unidades de Investigación en Enfermedades Metabólicas y Biología del Desarrollo, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A mi tutora y profesores que me han ayudado. A mi familia y amigos por su constante apoyo y la capacidad sobrenatural de soportarme.

Y una dedicatoria especial para todos aquellos que creyeron en que este trabajo sería posible.

“... al final sólo somos polvo de estrellas”

ADFA

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

Definición de la Obesidad
Pruebas para identificar obesidad
Modelos de obesidad en roedores
Causas de la obesidad
Leptina y sus mecanismos de acción
Balance energético y Reproducción
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada
Regulación de la síntesis y secreción de Hormona Luteinizante (LH)
Isoformas de la LH
Endocrinología de la obesidad

OBJETIVO

HIPÓTESIS

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental
Inducción de obesidad
Cromatoenfoque
Radioinmunoanálisis
Determinaciones hormonales

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

LITERATURA CITADA

Palabras clave: Obesidad, inducción de obesidad por dieta, hormona luteinizante, cromatoenfoque, isoformas.

INTRODUCCIÓN

Obesidad.

En el ámbito de la investigación, a lo largo de las últimas décadas, se han propuesto varias definiciones de obesidad. Simopoulos (1987), describió que el peso general de la población muestra una curva normal, en vez de segregar la población en obesos y no obesos. La obesidad es un desequilibrio entre la energía que se ingiere y la que se gasta (Speakman, 2004), lo que conlleva a una acumulación de grasa en forma de tejido adiposo (Gale, 2004; Mayes 2004), en consecuencia hay un aumento considerable en peso (Arner, 2000; Park, 2000), esta definición ha sido considerada por varios grupos de investigación (Speakman, 2004) y fue utilizada en el presente trabajo. La organización mundial de la salud define a la obesidad como una sobreacumulación de grasa que puede perjudicar la salud.

La obesidad es una entidad que se ha incrementado en los últimos 20 años siendo hoy un problema de salud a nivel mundial con mas de 310 millones de personas afectadas (Speakman, 2004). Esta asociada con otros problemas de salud relevantes como problemas cardiacos, diabetes, cáncer, complicaciones reproductivas y metabólicas (Gale, 2004; Mayes, 2004).

Pruebas para identificar la obesidad.

Se han generado diversas pruebas para identificar la obesidad en humanos las cuales las podemos separar en pruebas directas e indirectas. Dentro de las pruebas directas están la densitometría, el estimado de agua total y la cuantificación de potasio corporal (Lukaski, 1987); y dentro de las pruebas indirectas es la medición de pliegues subcutáneos y el índice cintura-cadera (Kissebah, 1989). Pero el que ha resultado ser más eficaz y el más utilizado, principalmente en la investigación clínica ha sido el

índice de masa corporal (IMC) (López-Alvarenga, 2001; Speakman, 2004; van Oijen, 2006). Este consiste en la relación de peso en kilogramos entre la estatura en metros al cuadrado ($IMC = \text{peso} / (\text{talla})^2$) y según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por su siglas en inglés; World Health Organization) señala que cuando el IMC esta en el intervalo de 22 a 24.9 es una persona de peso normal, entre 25 y 30 es una persona con sobrepeso y mayor a 30 es una persona con obesidad mórbida o extrema (van Oijen, 2006).

Modelos de obesidad en roedores.

Debido a la cercanía filogenética entre los roedores y el humano (Von Diemen, 2006) hacen de estos animales un buen modelo para estudiar la obesidad. Existen tres tipos de modelos para inducir obesidad: lesiones hipotalámicas, modelos genéticos y la inducción por dieta (DIO por sus siglas en inglés; Diet-induced obesity).

1. Lesiones hipotalámicas; se refiere a lesionar el hipotálamo ventromedial, una técnica para realizarlo implica administrar glutamato monosódico a ratas recién nacidas, esto no solo daña el hipotálamo ventromedial si no también el núcleo arqueado provocando hiperfagia y consecuentemente obesidad (Von Diemen, 2006); o bien se puede lesionar el tejido utilizando un electrodo (Dube, 1999; Von Diemen, 2006).

2. Modelos genéticos; los primeros en utilizarse fueron el ratón deficiente de leptina ob/ob y el deficiente para receptor de leptina db/db (Horvath, 2006); en la rata se puede ocupar una mutante, fa/fa, la cual tiene una insensibilidad a la leptina debido a una pérdida en la funcionalidad de su receptor (Kakuma, 2000). Otro modelo utilizado es la rata “Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty” que presenta una elevada producción de neuropéptido Y en el hipotálamo dorsomedial (Beck, 2006); y la rata “agouti” presenta un aumento en la producción del péptido “agouti” provocando una hiperfagia (Von Diemen, 2006); en ratas senescentes, la cepa de ratas Noruega F-344 presenta

obesidad a partir de las 26 semanas de edad debido a fallas en la transducción de señales de la leptina, provocadas por la edad (Scarpace, 2002).

3. DIO; la obesidad obtenida a través de estos modelos es lo más cercano a lo que ocurre en humanos (Lauterio, 1994; Von Diemen, 2006). Las dietas hipercalóricas pueden variar entre 4.47 hasta 6 Kcal/gr. La energía en estas dietas puede estar dada por una alta cantidad de carbohidratos ya sea en forma de golosinas como en la dieta de cafetería, la cual contiene galletas con paté, papas fritas o cacahuates, chocolates, pan y leche (Rodríguez, 2001; Pérez-Echarri, 2005); o adicionar a la dieta común de la rata los ingredientes semipurificados (Lauterio, 1994; Levin, 1997); o bien, en forma líquida mediante una solución de sacarosa al 30% en vez de agua pura, en este modelo, además de generar obesidad se desencadenan otros padecimientos como resistencia a la insulina e hipertensión tal como pasa en el Síndrome Metabólico (Mascher, 2006). La energía puede también estar dada por dietas altas en lípidos (Kakuma, 2000; Prunet-Marcassus, 2003). Dependiendo de la fuente de energía utilizada para inducir la obesidad, las características de las ratas cambiarán, en dietas altas en grasa existe un mayor depósito de ácidos grasos y un mayor metabolismo de grasas en músculo, lo cual no ocurre en dietas altas en carbohidratos donde se promueve una alta regulación de la glucólisis (Dourmashkin, 2005), en adición del elevado depósito de ácidos grasos, asimismo cambia la expresión de varios péptidos hipotalámicos (Leibowits, 1998).

Hasta el momento no existe una definición formal de obesidad en la rata pero diversos grupos de investigación han llevado a cabo la inducción de la obesidad por dieta en roedores consiguiendo que exista un aumento significativo en el peso de los animales después del tratamiento (Lauterio, 1994; Levin, 1997).

Causas de la obesidad

Son diversas las causas que pueden llevar a la obesidad, los factores ambientales y los factores genéticos. Los primeros son problemas de comportamiento, siendo el ejemplo típico el que se refiere a la dieta (Schrauwen, 2000; Jang, 2003; Speakman 2004), debido a que en la sociedad occidental las dietas altamente energéticas son las que predominan en la población, lo que conlleva a varios desórdenes alimenticios (van Oijen, 2006), la baja actividad física, en conjunto con la dieta hipercalórica, hacen que la obesidad se desarrolle con facilidad (Schrauwen, 2000).

En la actualidad se ha empleado el término “predisposición genética” (Speakman, 2004) para señalar a aquellas personas que pueden desarrollar la obesidad independientemente de los factores ambientales o con la menor intervención de estos. Los primeros estudios genéticos de la obesidad se llevaron a cabo en roedores donde se encontraron genes que llevaban a los animales a desarrollar la obesidad, y los homólogos de estos genes fueron encontrados en el humano (Zhang, 1994).

Leptina y sus mecanismos de acción.

El gen que el grupo de Zhang encontró es el *ob*, su producto es una hormona de 16 kd llamada leptina, la cual se expresa mayoritariamente en tejido adiposo blanco (Zigman, 2003) y en menor medida en hipotálamo, hipófisis, músculo esquelético y epitelio mamario. Esta hormona regula el peso corporal, el apetito, la actividad adrenérgica y la función reproductiva (Moschos, 2002). La deficiencia de leptina provoca hiperfagia, acumulación de tejido adiposo y lipotoxicidad en las células que no son adipositas (Unger, 2001), lo cual es importante debido a que la lipotoxicidad produce a su vez la muerte celular por lipoapoptosis en dichas células explicando, por

ejemplo, daños cardiacos y a nivel de las células β del páncreas provocando padecimientos comunes en la obesidad como diabetes.

El receptor de leptina se expresa principalmente en hipotálamo donde tiene acción en los sitios que regulan el apetito y el balance energético. En sitios relacionados con el almacén de energía y el metabolismo, como el tejido adiposo, páncreas e hígado, en el testículo, ovario y útero donde regula la función reproductiva (Friedman, 1998; Tena-Sempere, 2001).

La leptina se secreta en el tejido adiposo en proporción al volumen de dicho tejido. Atraviesa la barrera hematoencefálica y ejerce su acción en el sistema nervioso central, en el núcleo paraventricular, arqueado y ventromedial del hipotálamo (Auwerx, 1998; King, 2006), los centros que regulan el comportamiento alimenticio. En estos centros se generan principalmente dos tipos de señales: las orexinas y anorexinas (Cowley, 2003). La leptina estimula la síntesis de anorexinas, como la hormona estimulante de la α -melanocortina que inhibe el apetito y estimula el gasto energético y al mismo tiempo inhibe la síntesis de orexinas, como el neuropéptido Y y el péptido “agouti”, las cuales tienen un efecto contrario a las anorexinas, es decir, promueven el apetito y la acumulación de reservas energéticas (Friedman 1998; van Dijk, 2003; Zigman, 2003; Gale, 2004).

En los diversos órganos blanco la leptina se encarga de aumentar la expresión de enzimas del catabolismo de ácidos grasos y también protege a las células que no son adipositas de las consecuencias de la sobreacumulación de lípidos, regulando la homeostasis de triglicéridos y ácidos grasos (Unger, 2001).

Cuando la concentración de leptina baja, debido a una disminución de peso y una consecuente baja del volumen del tejido adiposo o bien en estados de ayuno prolongado, el organismo sufre de una serie de cambios adaptativos con el objeto de

conservar las reservas energéticas. El primer cambio es el incremento de las orexinas a fin de aumentar la búsqueda de alimento y disminuir la sensación de saciedad. El siguiente efecto es la disminución en la eliminación de energía en forma de calor (Rothwell, 2001). La última modificación es la que involucra al sistema inmune y reproductivo, hay una inmunosupresión y una disminución de la síntesis de esteroides sexuales, debido a que ambos sistemas consumen una gran cantidad de energía (Spigelman, 2001; Tena-Sempere 2002).

En la obesidad se genera una resistencia a la leptina debido a que las concentraciones de la hormona son tan altas que se sobrepasa la capacidad de entrada a través de la barrera hematoencefálica y esto disminuye la acción en los tejidos periféricos. Asimismo se reduce la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en consecuencia hay un aumento de concentración de leptina no solo en suero si no también en el líquido cefalorraquídeo (Adam, 2006; Zhang 2006).

Balance energético y Reproducción.

El balance energético y la reproducción están altamente relacionados y regulados, no solo por la leptina, que actúa de manera indirecta en la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Cunningham, 1999; Woller, 2001), si no por otras hormonas que participan en la regulación del apetito y el balance energético tal como la grelina (Barreiro, 2004) y el neuropéptido Y (Raposo, 1999; Wójcic-Gładysz, 2003; Winters, 2004), los cuales inhiben la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) y de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) (Fernandez-Fernandez, 2006) (Figura 2).

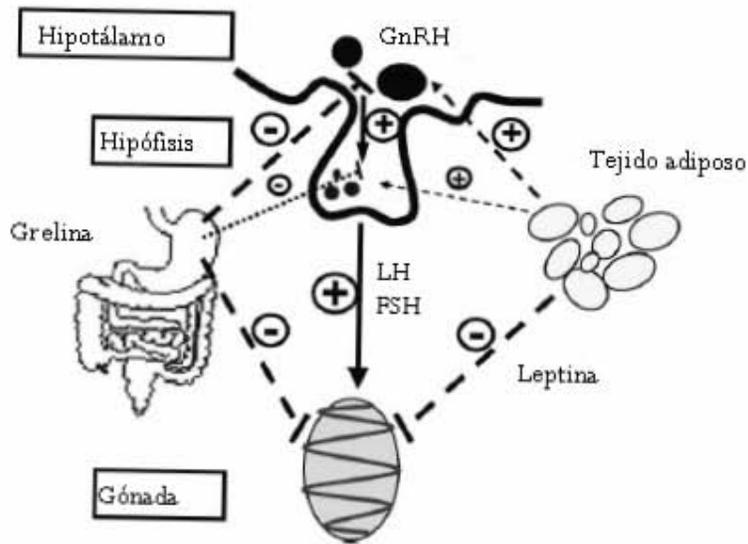


Figura 2. Esquema integrativo entre las señales reguladoras del balance energético, el apetito y la función reproductiva. Los símbolos (+) representan estimulación y los signos (-) representan inhibición. La GnRH estimula a la hipófisis para que sintetice y libere a las gonadotropinas LH y FSH, estas viajan a la gónada donde llevan a cabo su función estimulando la síntesis y secreción de esteroides sexuales. La leptina estimula la secreción de GnRH en el hipotálamo, pero inhibe la síntesis de T en gónada. La grelina inhibe tanto la secreción de GnRH como de las gonadotropinas hipofisiarias y de T. Tomado de Barreiro (2004).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada.

La GnRH es un decapeptido que se encuentra en el hipotálamo, en el núcleo arqueado en primates (King, 1984; Woller, 2001) y en el área preóptica y eminencia media en primates y roedores (Woller, 2004). La GnRH es secretada de forma pulsátil y liberada en los vasos portahipofisarios donde viaja hacia la hipófisis anterior estimulando la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre, 2000). Los pulsos rápidos promueven la secreción de LH mientras que los pulsos lentos promueven la secreción de FSH (Dalkin, 1989; Kaiser, 1997). Ambas gonadotropinas viajan por la

circulación para llegar a sus órganos blanco, los cuales son: la célula de Leydig y de la teca en el caso de la LH; y la célula de Sertoli y de la granulosa para la FSH, ahí regulan la función reproductiva participando en la regulación de la esteroidogénesis para la síntesis de esteroides sexuales (Larrea, 1988; Zirkin, 2000) y la maduración de gametos (Chappel, 1983; Selman, 2006).

El receptor para FSH y para la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) junto con el receptor para LH pertenecen a una familia de receptores acoplados a proteínas G (Puett, 2007). Este último une con alta afinidad a su ligando desencadenando una vía de transducción de señales, cuyos efectos intervienen en la síntesis de esteroides sexuales principalmente la testosterona (T) (Larrea, 1988; Clemp, 2005).

La LH, FSH, TSH y la gonadotropina coriónica (GC) son glicoproteínas estructuralmente parecidas, están formadas por dos subunidades unidas no covalentemente, la α y la β . Dada una misma especie la subunidad α de las cuatro hormonas se expresa en un mismo gen, por lo tanto tiene una misma secuencia de aminoácidos (Boothby, 1981), mientras que la β es la que las distingue y les confiere especificidad (Ulloa- Aguirre, 1995). La actividad biológica de estas glicoproteínas solo existe si están presentes ambas subunidades (Tsatsoulis, 1991).

Regulación de la síntesis y secreción de la Hormona Luteinizante

En la gónada se secretan tres diferentes tipos de esteroides sexuales, los estrógenos, progestágenos y andrógenos, los cuales tienen sus receptores específicos en el hipotálamo e hipófisis e influyen en la secreción de las gonadotropinas.

La secreción de LH es controlada por retroalimentación negativa ejercida por la T y el estradiol (E_2). La T o sus metabolitos actúan en el sistema nervioso central para retardar el generador de pulsos hipotalámicos y consecuentemente disminuir la frecuencia

de liberación pulsátil de LH (Matsumoto, 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).

Existen otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas a nivel central en los cuales se incluye la prolactina que inhibe la secreción de GnRH (Calogero, 1996) y las gonadotropinas que pueden actuar en el hipotálamo al modular la secreción de GnRH, mientras que a su vez la GnRH puede influir directamente en su propia secreción de manera autócrina (Marshall, 1986).

Isoformas de la LH.

La LH, 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 sulfatados y en menor grado sializados de la hormona, constituye la base química para la formación de las isoformas (Pantel, 1998; Ulloa-Aguirre, 1988; Nomura, 1989). Los oligosacáridos desempeñan una función importante en el plegamiento, ensamblaje de las 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 (Ruddon, 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 que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas (Bergendah, 2001). Los residuos terminales de sulfato favorecen la remoción de la LH de la circulación en su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor específico (Roseman, 2000); por el contrario, el ácido siálico disminuye la captación hepática (Morell, 1971). Estudios llevados a cabo mediante la utilización de isoformas

de LH hipofisiarias humanas altamente purificadas, han corroborado que los carbohidratos y en particular el contenido de ácido siálico de éstas 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, 1996).

Se ha observado que la FSH de rata tratada con enzimas que remueven los residuos de ácido siálico se pueden identificar isoformas más básicas y su actividad biológica era mayor conforme aumentaba el punto isoeléctrico, (Wilson, 1990; Lambert, 1998). Los residuos de sulfato y de ácido siálico, determinan la distribución por carga de las isoformas de la LH (Baenzinger, 1988).

Se ha demostrado que las diferentes formas moleculares de LH tienen predominantemente carga positiva, que corresponde a valores de punto isoeléctrico de 6.5 a 10, principalmente (Castro-Fernández, 2000), esto logrado mediante la técnica del cromatoenfoco. La naturaleza básica de las isoformas de LH, se debe primordialmente a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (aproximadamente 98%) con residuos terminales de sulfato (Green, 1988).

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 (Lambert, 1998; Bergendah, 2001). En la mayoría de los estudios, se ha demostrado que las isoformas de la LH intrahipofisaria y sérica presentan un intervalo de pH de 4.0 a 10.0. 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, 1977; Ropelato, 1999), aunque aún existe la controversia por estudios que han mostrado que las isoformas más ácidas son las biológicamente más potentes (Mitchel, 1994)

Dentro de las modificaciones postraduccionales las gonadotropinas se someten al proceso de glicosilación. Este comienza en el retículo endoplásmico rugoso donde se adiciona el precursor del oligosacárido en uno o varios residuos de asparagina, dependiendo la hormona, los cambios subsecuentes en ese oligosacárido se llevan a cabo dentro de las cisternas del aparato de Golgi donde se encuentran las transferasas que madurarán el oligosacárido. En humano se encuentra la N-acetilgalactosamina-4-0-sulfotransferasa 1 y 2 (Baezinger, 2003) las cuales adicionan los residuos terminales de sulfato.

La estructura de los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas se encuentra regulada 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, 1996). Los cambios en la estructura molecular de los oligosacáridos incorporados en las hormonas glicoproteicas que ocurren en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas, sugieren que la glicosilación de estas hormonas está sometida a una estricta regulación (Ulloa-Aguirre, 2001). De hecho, ha sido demostrado que los factores sintetizados en respuesta al estímulo trófico de varias hormonas glicoproteicas, y esteroides son capaces de modificar la glicosilación de las señales tróficas correspondientes (Dharmesh, 1993; Damián-Matsumura, 1999; Ulloa-Aguirre, 2001).

Endocrinología de la obesidad

Diversos estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de testosterona y de la globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG), se encuentran disminuidas en varones obesos comparados con varones no obesos en edades similares (Casimirri, 1991; Vermeulen, 1993). A pesar de que los mecanismos

internos responsables de esta disminución son hasta ahora desconocidos, se ha demostrado que la pérdida de peso puede revertirlos, lo que ha confirmado que son secundarios al desarrollo de la obesidad (Pasquali, 1988). Asimismo las concentraciones de E_2 y estrona se encuentran incrementadas en los sujetos obesos (Casimirri, 1991; Vermeulen, 1993). Este incremento se debe, en gran parte, a la conversión extraglandular de precursores de andrógenos a estrógenos (Shayu y Rao, 2006).

Existe controversia con lo referente a si las concentraciones de LH son significativamente menores en los obesos que en las personas de peso normal, ya que en un estudio se encontró que las concentraciones de LH en sujetos con obesidad era menor a las de personas de peso normal, así como también la amplitud en los pulsos de LH y la cantidad de LH secretada (Vermeluen, 1993). Sin embargo otros estudios no muestran diferencias significativas entre los niveles de LH sérica en ningún grado de obesidad (Isidori, 1999).

Los mecanismos responsables de los cambios en las concentraciones hormonales en el hombre obeso, no se han dilucidado, aunque el relativo hiperinsulinismo presente en estos sujetos promueve una reducción de la SHBG (Casimirri, 1991). Se desconoce si el hipoandrogenismo relativo tiene un origen testicular o hipotálamo-hipofisiario. Sin embargo, 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 (Amatruda, 1982), aunque una evidencia reciente sugiere que puede haber una influencia testicular, habiendo realizado ensayos en pacientes se obtuvo una respuesta menor a hCG en individuos con obesidad extrema (Isidori, 1999).

La hiperestrogenemia asociada puede influir en la regulación de gonadotropinas (Vermeulen, 1993), ya que se ha demostrado que el E₂ secretado tanto por los testículos como aquel producido por la aromatización central y periférica puede influir en la secreción de gonadotropinas por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel central (Shayu, 2006). El E₂ puede influir también en el proceso celular y/o en uno o más aspectos de la glicosilación terminal de las moléculas de LH (Veldhuis, 1987).

Se ha demostrado que este ambiente alterado de hormonas esteroides característico de la obesidad en humanos produce un aumento en isoformas de LH séricas más básicas, las cuales pueden modificar potencialmente la intensidad y duración de la señal de la LH sérica liberada a la gónada, en base a esta evidencia se puede pensar que la glicosilación de la LH puede ser un mecanismo adicional que modula el estado hipogonádico en la obesidad extrema (Castro-Fernández, 2000).

Con la finalidad de comprobar si existen cambios en el patrón de distribución de isoformas de LH en la obesidad a nivel hipofisiario se evaluó directamente en ese tejido, en el presente trabajo se utilizó la inducción de obesidad por dieta en rata, que como se ha mencionado antes en el apartado de “Modelos de obesidad en roedores” es un modelo animal experimental importante para el estudio de fisiología reproductiva.

OBJETIVOS.

Caracterizar el patrón de distribución de las isoformas de la LH hipofisiaria en la rata macho en diferentes edades y diferentes grados de obesidad.

Determinar las concentraciones séricas de las hormonas, LH, FSH, E₂ y T; Insulina y Leptina, así como de triglicéridos, colesterol y glucosa en la rata macho en diferentes edades y diferentes grados de obesidad y correlacionar los resultados con el patrón de distribución de la LH hipofisiaria.

HIPÓTESIS.

El patrón de distribución de las isoformas de la LH hipofisiaria será diferente entre los grupos de ratas control con sus contrapartes obesas de la misma edad, siendo las isoformas más básicas las que predominen en las ratas obesas.

Habrán diferencias en las determinaciones hormonales existiendo disminución en las concentraciones de testosterona y un aumento en las concentraciones de estradiol en las ratas obesas en ambos grupos, si las isoformas de LH son más básicas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Diseño experimental

Se utilizaron 16 ratas de la cepa Wistar, *Rattus norvegicus*, del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales con fotoperiodo controlado (12 hrs luz y 12 hrs oscuridad). Los animales fueron alimentados con dieta estándar (Purina Lab Chow 5001, Purina, México) y agua *ad libitum*, hasta alcanzar los 100 gr de peso promedio, en ese momento las ratas se separaron para someterlas a 2 diferentes dietas experimentales. El primer grupo fue alimentado con una dieta de 4 Kcal/gr (control 1) y el segundo con la dieta de 5 Kcal/gr (experimental 1) *ad libitum* durante tres meses; el tercer y cuarto grupo (control 2 y experimental 2) se alimentaron hasta llegar a seis meses de estudio (Cuadro 1), (Anexo 1).

Inducción de obesidad

A lo largo del estudio se llevó el registro de peso cada tercer día. Se formaron cuatro grupos de estudio de acuerdo a la dieta con las que se alimentaron y al tiempo de alimentación de tal forma que los grupos fueron:

Grupo control 1: 4 Kcal/gr 3 meses, n= 4

Grupo experimental 1: 5 Kcal/gr 3 meses, n= 4

Grupo control 2: 4 Kcal/gr 6 meses, n= 4

Grupo experimental 2: 5 Kcal/gr 6 meses, n= 4

La selección de animales para sacrificar fue de manera aleatoria a los tres meses, mientras que se sacrifico a los animales restantes a los seis meses. El sacrificio de todas las ratas se realizó por decapitación rápida sin anestesia, esto permite obtener sangre en mayor proporción que otros métodos. Las muestras sanguíneas permanecieron a

temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos hasta que coagularon. Posteriormente se separó el suero mediante centrifugación a 1200 rpm durante 15 minutos. Se realizaron de 7 a 10 alícuotas de 500µl por separado para cada rata, las cuales permanecieron a -20°C hasta que se utilizaron para realizar las determinaciones hormonales. En el momento de la decapitación de cada rata fue obtenida la hipófisis y rápidamente fue almacenada a -80°C hasta el día de llevar a cabo el cromatoenfoco.

La dieta control (4 Kcal/g) estuvo compuesta en porcentaje de la siguiente manera: 33.11% de caseína libre de vitaminas (Harlan-Teklad-160040), 0.165% de citrato de colina (Harlan-Teklad-30220), 1% de mezcla de vitaminas AIN-93-VX (Harlan-Teklad-TD 94047), 5% de mezcla de minerales Rogers-Harper (Harlan-Teklad-170760), aceite de maíz comercial 5% y dextrosa anhidra y almidón de maíz (Harlan-Teklad-160195,160170) en una proporción 1:1 para completar el 100% de la dieta. La dieta alta en lípidos (5 Kcal/g) mantuvo la misma composición que la dieta control, excepto en el porcentaje de lípidos, el cual fue de 20% de manteca de cerdo (Cuadro 1). La dieta control está basada en las recomendaciones del “National Research Council” (NRC), 1978 y el “American Institute of Nutrition Rodents Diets” (AIN), sobre los requerimientos nutricionales de las ratas de laboratorio (Reeves, 1993).

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales

	Dieta control (4 Kcal/gr)		Dieta alta en grasa (5 Kcal/gr)	
	gr/Kg de dieta	Kcal (*)	gr/Kg de dieta	Kcal (*)
Caseína	331.11	1324.44	331.11	1324.44
Clorhidrato de colina	1.65	----	1.65	----
Vitaminas	10	----	10	----
Minerales	50	----	50	----
Dextrosa	278.6	1044.75	178.6	669.75
Almidón	278.6	1044.75	178.6	669.75
Aceite de maíz	50	450	50	450
Manteca	0	----	200	1800
Totales	1000	3863.94	1000	4913.94

(*) Cada gramo de proteína y carbohidratos aportan 4 y 3.75 calorías respectivamente, a diferencia de cada gramo de grasa la cual aporta 9 calorías.

Cromatoenfoco

El cromatoenfoco de LH hipofisaria se llevó a cabo utilizando un gradiente de pH de 11.0 a 2.99, donde las proteínas eluyen al alcanzar su respectivo punto isoeléctrico dentro del gradiente de pH antes mencionado. Se utilizaron columnas para cromatografía de 30 X 0.7 cm de vidrio (BioRad), el intercambiador iónico fue la resina PBE-118 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA), equilibradas con 18 volúmenes de Trietilamina-HCl 0.025 M, pH 11.2 con la finalidad de evitar que la muestra tuviera cambios bruscos de pH, a cada columna se le agregó 1 ml del primer

amortiguador eluyente, Pharmalyte (Pharmacia) diluido 1:45 v/v en agua desionizada pH 7.0. Cada hipófisis, por separado, fue homogenizada con 100 μ l de una solución del primer amortiguador de elución con 0.2 mg/ml de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) como inhibidor de proteasas, dicho homogenado fue centrifugado a 1000 rpm durante 30 minutos a 4°C para separar el material celular de otros compuestos como proteínas las cuales se mantienen en el sobrenadante. Dicho sobrenadante se recuperó y se agregó a la columna, en cada experimento se agregaron 40 μ l del sobrenadante, los otros 60 μ l fueron almacenados a -20°C para tener reserva de las muestras. Se ocupó un colector de fracciones (Amersham), la velocidad de flujo fué de 6 ml/hr y fue mantenida mediante una bomba peristáltica (Amersham); se colectaron fracciones de 2ml cada una. Se colectaron de 45 a 55 fracciones hasta alcanzar un pH igual a 7.0, en ese momento el primer amortiguador eluyente fue sustituido por el segundo amortiguador eluyente, Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) diluido 1:8 v/v en agua desionizada, pH 2.99. Se colectaron 30 fracciones más hasta alcanzar pH igual o menor a 3.0 y en ese momento el amortiguador fue cambiado por una solución NaCl 1M para separar todas las proteínas que no eluyeron en el intervalo de pH anterior. Se midió el pH de cada fracción. Todos los amortiguadores se degasificaron previo a su utilización para evitar fluctuaciones en el gradiente. (Anexo 2).

Radioinmunoanálisis

Las concentraciones de rLH y rFSH, fueron determinadas en todos los grupos mediante el radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. Los reactivos fueron obtenidos del Programa Nacional de la Pituitaria de los Institutos Nacionales de Salud. E.U.A (National Hormone and Pituitary Program, Bethesda MD). La hormona fue radiomarcada por el método de Cloramina T descrito por Greenwood (1963). (Anexo 3). Los resultados están expresados en ng/ml de acuerdo a los estándares de referencia internacional rLH (LH-RP3) y rFSH (FSH-RP2) con los cuales se realizó una curva estándar de concentraciones conocidas; los anticuerpos utilizados fueron anti-rLH (conejo vs rata: LH S-8) y anti-rFSH (conejo vs rata: FSH S-11). Asimismo, se determinó la LH en cada fracción de cromatoenfoco mediante el mismo método. (Anexo 4).

Una vez obtenidas las concentraciones de rLH por fracción se calculo el porcentaje de recuperación por unidad de pH para evaluar si existían diferencias entre los grupos controles y los experimentales, tal como se ha realizado en estudios previos (Castro-Fernández, 2000).

Determinaciones hormonales

Las concentraciones plasmáticas de insulina y leptina se determinaron por RIA en estuche comercial (Linco Research Immunoassay, St. Charles, MO, EUA). Los triglicéridos, colesterol y glucosa fueron determinados por métodos enzimáticos, oxidasa-peroxidasa mediante estuches comerciales (SERA-PAK, Plus, Bayer). Los análisis de testosterona y estradiol fueron efectuados por pruebas inmunofluorométricas utilizando estuches comerciales DELFIA (Perkin Elmer, Oulunsalo, Finlandia).

Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de T de Student para muestras independientes para evaluar diferencias entre los grupos de 4 Kcal/gr y 5 Kcal/gr en la determinación hormonal si la estructura de los datos presentaba normalidad y homoscedasticidad, de no ser así, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Para evaluar diferencias en el patrón de distribución de isoformas se utilizó el análisis de varianza de una vía y posteriormente la prueba de discriminantes de Tukey-Kramer, siempre y cuando la distribución de los datos fuera normal, de no ser así, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Se consideró una $\alpha < 0.05$. Asimismo se muestran también aquellos datos que presentaban una $p \leq 0.1$ como una indicación de tendencia de datos más que como una diferencia estadísticamente significativa.

Los datos se presentan utilizando el promedio \pm el error estándar de la media en todos los casos.

Para el procesamiento de los datos se ocupó el programa NCSS, Number Cruncher Statistical System, 2004.

RESULTADOS

El aumento de peso en las ratas de los grupos que se sacrificaron a los 90 días de estudio, mostró que existe una diferencia de peso grupal del 17% entre ellos, el grupo control mostró un peso de 378.36 ± 34.36 grs y el grupo experimental del mismo tiempo tuvo 446.42 ± 36 grs de peso, existiendo una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$.

Asimismo, los grupos de 180 días de estudio mostraron una diferencia grupal del 26% entre el control y el experimental, los pesos de ambos grupos fueron de 446.5 ± 40.25 grs y de 565.16 ± 39.03 grs respectivamente, para este tiempo existe también una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.001$.

En la figura 1 se muestran las curvas de crecimiento para los grupos alimentados con las dietas de 4 Kcal/gr; Control, y la de 5 Kcal/gr; Obesa.

Los niveles de insulina presentaron cambio en el grupo de obesas de 6 meses en comparación a su control, $p < 0.05$ (Figura 2); en las ratas obesas, las concentraciones de leptina presentaron un aumento considerable $p = 0.001$, en comparación con su control, para los tres y seis meses (Figura 3). Los resultados de glucosa y colesterol muestran una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ del grupo control comparado con el grupo obeso a los 3 y 6 meses de estudio, los niveles de triglicéridos solo son diferentes a los 6 meses. (Cuadro 2).

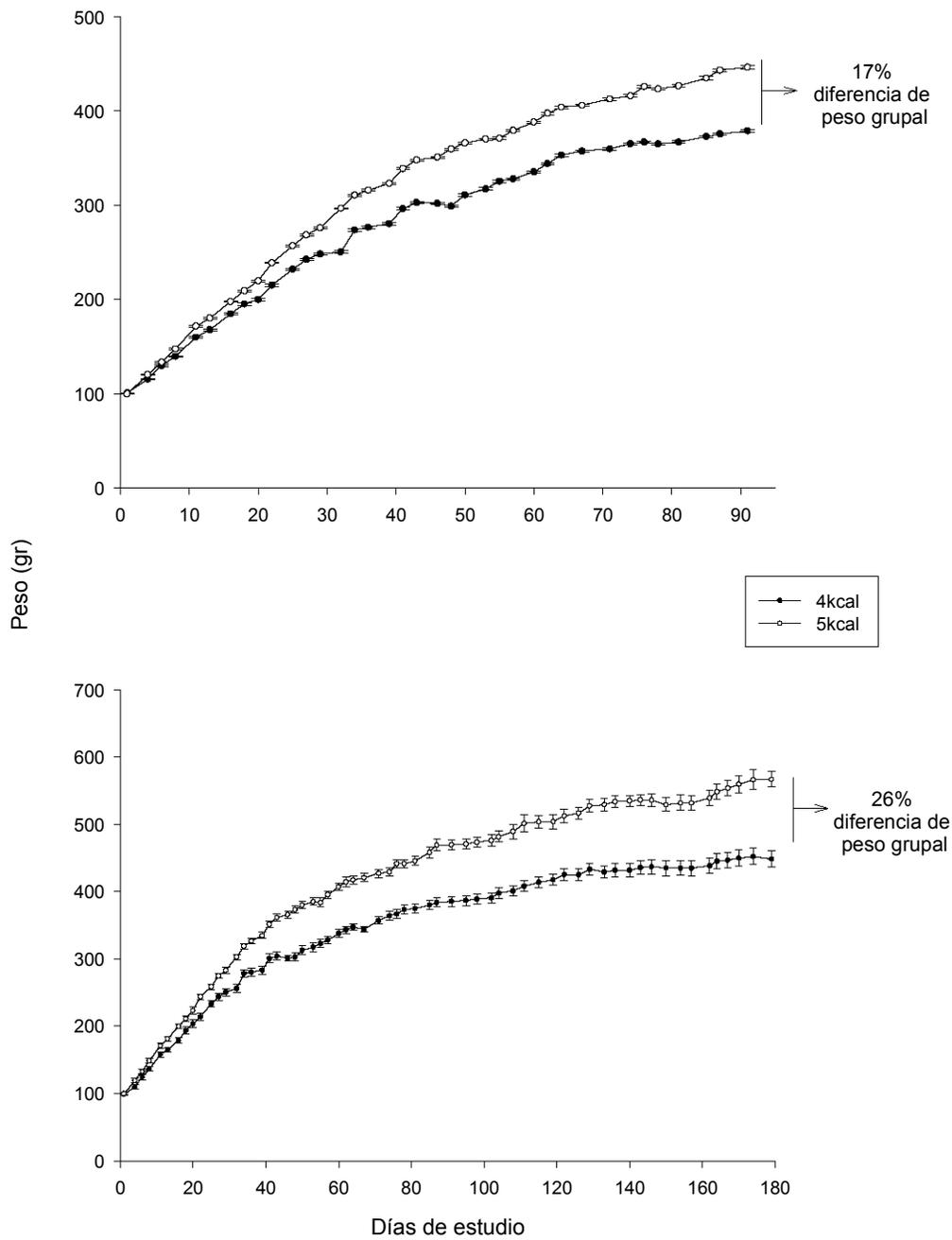


Figura 1. Curvas de crecimiento, se muestran el peso de ratas Wistar alimentadas con dieta de 4 Kcal/gr y 5 Kcal/gr respectivamente, en la parte superior se muestra la gráfica obtenida a los 3 meses de estudio y en la parte inferior lo obtenido a los 6 meses de estudio.

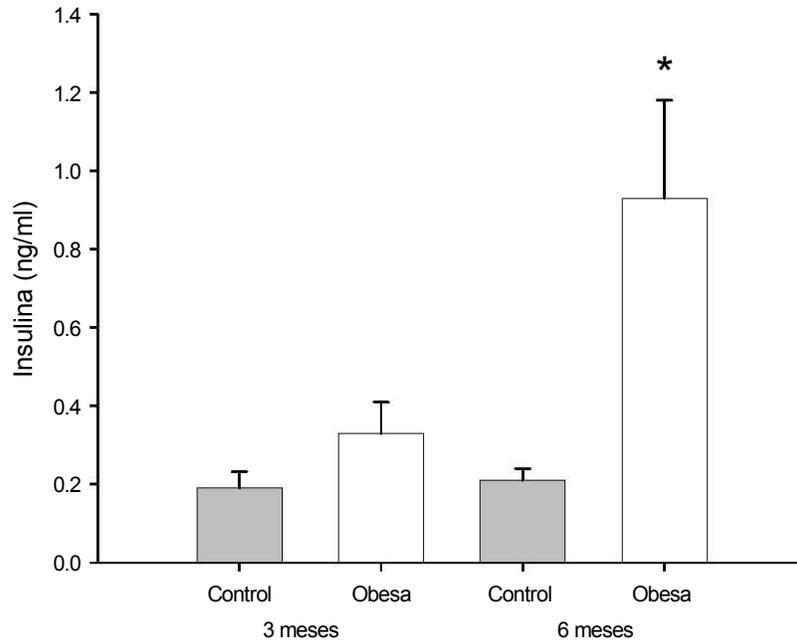


Figura 2. Determinación de Insulina en suero

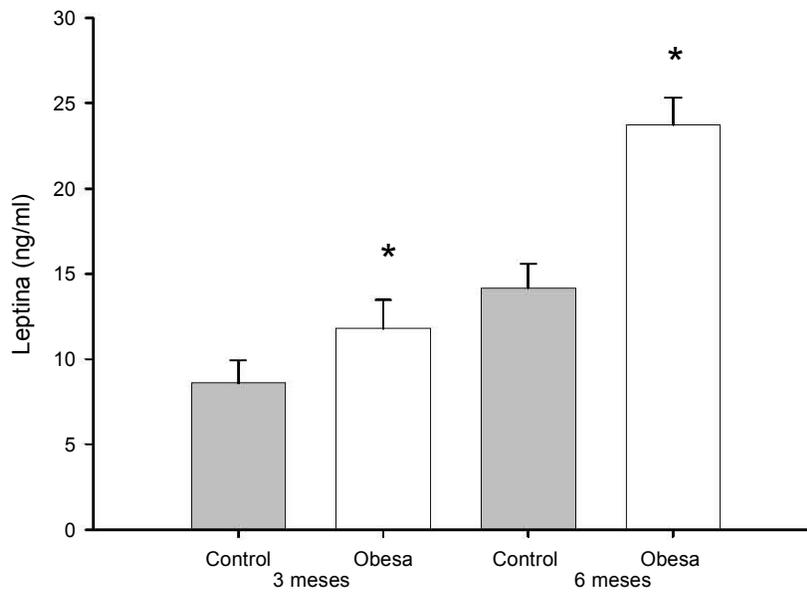


Figura 3. Determinación de Leptina en suero

Concentraciones séricas de insulina y leptina en las ratas controles y obesas de 3 y 6 meses de estudio. Cada una de las barras representa el promedio \pm el error estándar de las concentraciones séricas de insulina (parte superior) y leptina (parte inferior) de ratas alimentadas con dieta de 4 Kcal/gr (barras oscuras) y 5 Kcal/gr (barras blancas). * $P < 0.05$, vs de 4Kcal/gr.

Cuadro 2. Concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero de ratas alimentadas con 4Kcal/gr y 5Kcal/gr

GRUPO 3 MESES	Glucosa (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
4Kcal/g	81.66±3.94	76.16±3.24	161.5±23.89
5Kcal/g	104.33±6.07 *	95.00±2.70 *	214.5±28.42
6 MESES			
4Kcal/g	54.16±3.00	44.00±3.44	86.50±8.570
5Kcal/g	135.33±5.56 *	92.00±14.21 *	190.66±28.57 *

* Indica una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ vs 4Kcal/gr de la misma edad.

Determinación de isoformas de hormona luteinizante.

El patrón de distribución de la rLH hipofisaria en todos los grupos de estudio presentó isoformas de rLH inmunoreactiva a lo largo de un intervalo de pH de 9.99-3.0 predominantemente, más del 80% recuperadas en pH mayores a 7.0 y el resto de la hormona eluyó en los pH menores a 6.99 en todos los casos. Cabe mencionar que el material que no eluyó en el rango de pH mencionado cuando se adicionó la solución de NaCl 1M fue aproximadamente del 2.5%, figuras 4 y 5.

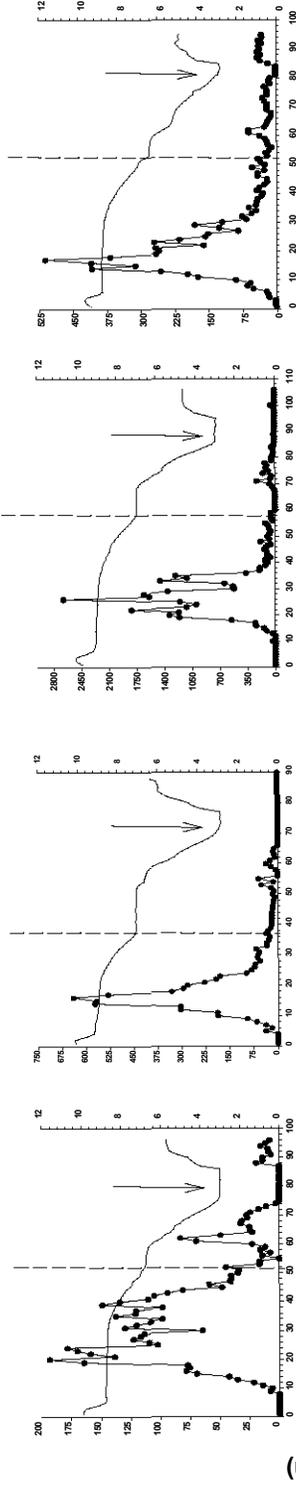
Se procedió a calcular el porcentaje de recuperación por unidad de pH de cada uno de los perfiles de distribución, de tal forma que se formaron 8 grupos de fracciones (GDF) constituidos de la siguiente manera GDF 1 (9.99-9.0), GDF 2 (8.99-8.0), GDF 3 (7.99-7.0), GDF 4 (6.99-6.0), GDF 5 (5.99-5.0), GDF 6 (4.99-4.0), GDF 7 (3.99-3.0), GDF 8 (Pico de sal). Los porcentajes de recuperación de los diferentes GDFs se expresan en las figuras 6 y 7 y en el cuadro 3.

En los grupos de 3 meses de estudio se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación de rLH en el GDF 2, controles ($75.45 \pm 4.55\%$); y obesos ($57.99 \pm 10.3\%$), con p no significativa. Asimismo en los grupos de 6 meses se obtuvo el mismo comportamiento en el GDF 2, controles ($78.08 \pm 7.2\%$) vs ($50.65 \pm 2.7\%$), con $p=0.08$.

A los 6 meses de estudio la tendencia de los datos marca que en el GDF 1, el de pH más básico aumenta en las ratas obesas ($26.83 \pm 9.8\%$) en comparación con las ratas control ($1.35 \pm 0.7\%$) a pesar de ello la diferencia no representa una diferencia estadísticamente significativa $p= 0.06$.

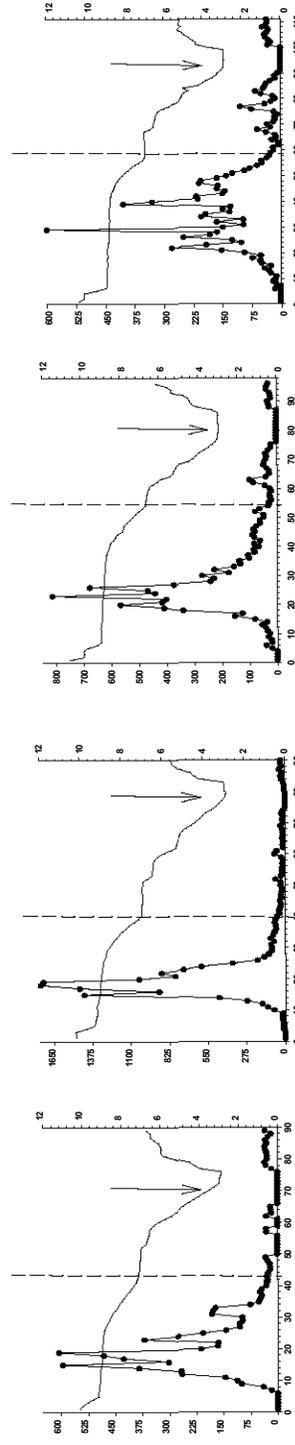
Los porcentajes de recuperación de las isoformas expresadas en básicas, mayores a pH 7.0 y ácidas menores a pH 6.99 muestran que la mayor parte de la hormona es de carácter básico (Tabla 4).

CONTROL 3 MESES



OBESA 3 MESES

Hd



Número de Fracción

Figura 4. Patrón de distribución por pH de la rLH hipofisaria después de su separación por cromatofluore. Las graficas superiores muestran el perfil encontrado en las ratas alimentadas con la dieta de 4 Kcal/gr, en tanto que las inferiores muestran los perfiles encontrados en las ratas alimentadas con 5 Kcal/gr a los 3 meses de estudio. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 7.0. La flecha indica la adición de NaCl 1 M a las columnas de cromatofluore.

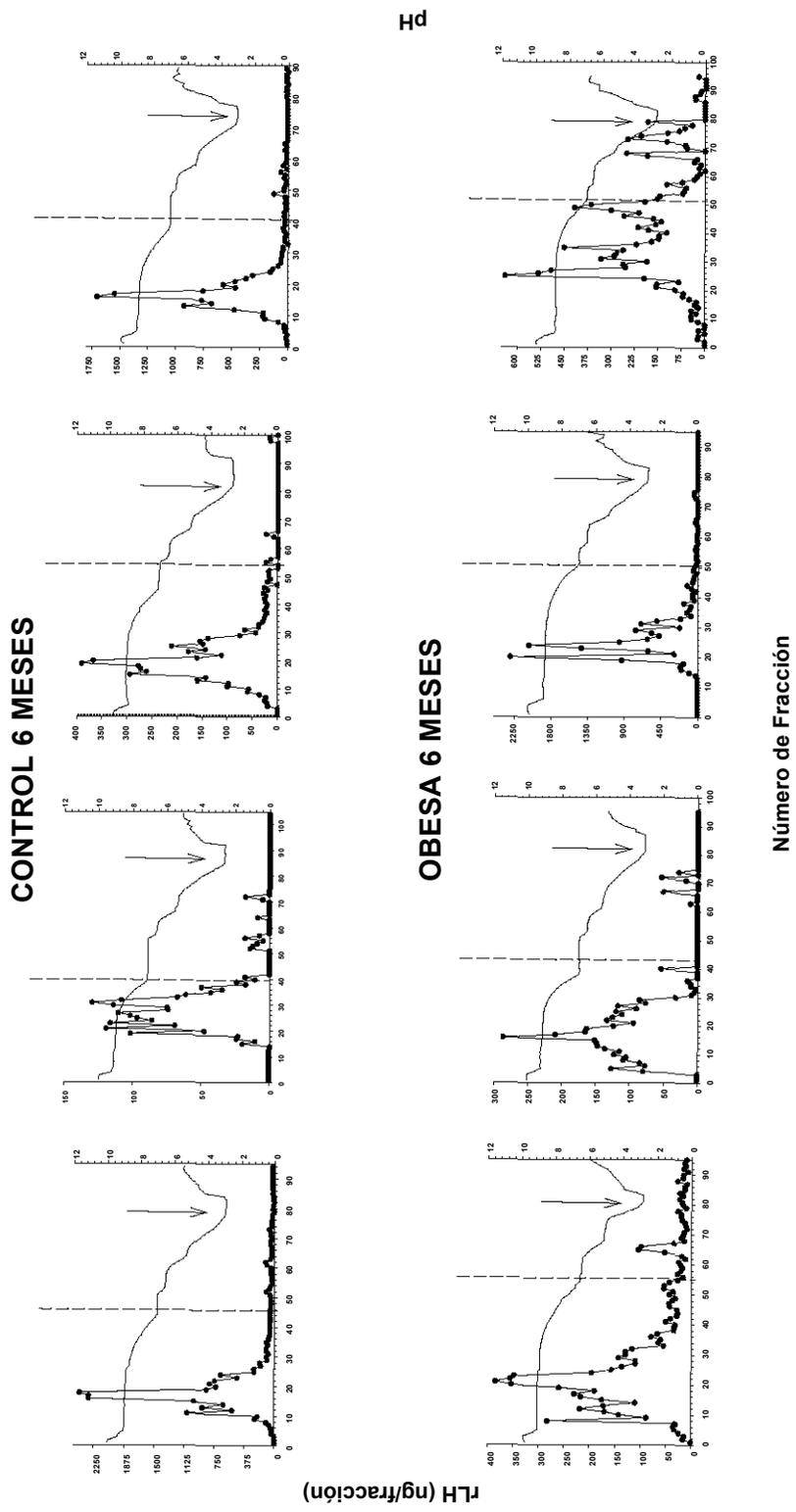


Figura 5. Patrón de distribución por pH de la rLH hipofisiaria después de su separación por cromatoenfoque. Las graficas superiores muestran el perfil encontrado en las ratas alimentadas con la dieta de 4 Kcal/gr, en tanto que las inferiores muestran los perfiles encontrados en las ratas alimentadas con 5 Kcal/gr a los 6 meses de estudio. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 7.0. La flecha indica la adición de NaCl 1 M a las columnas de cromatoenfoque.

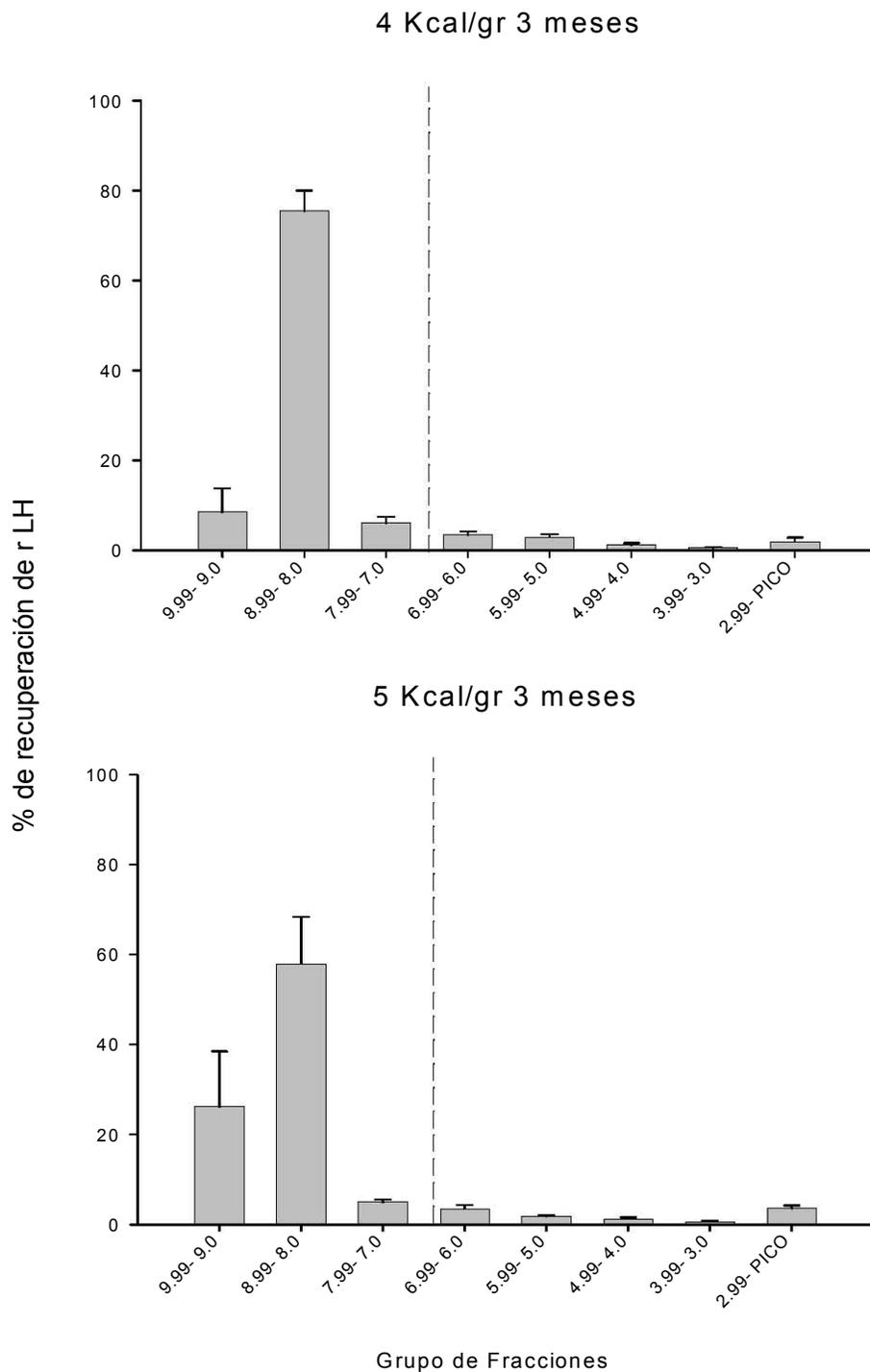


Figura 6. Patrón de distribución por carga de la rLH hipofisiaria después de su separación por cromatoenfoco en ratas controles (parte superior) y ratas obesas (parte inferior) a los 3 meses de estudio. Cada una de las barras representa el promedio \pm error estándar de los porcentajes de LH recuperada después del cromatoenfoco, la línea vertical discontinua indica un valor de pH de 7.0

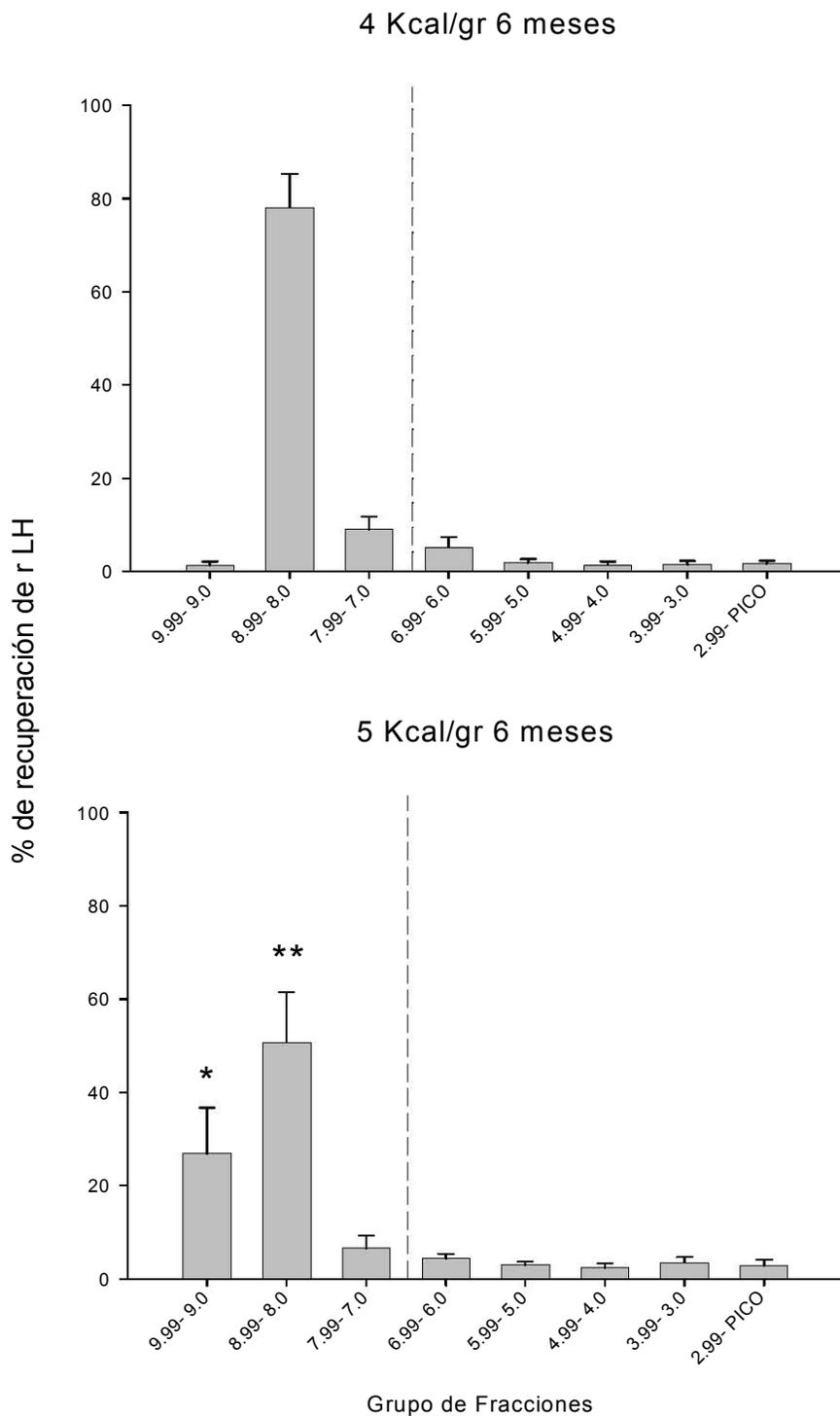


Figura 7. Patrón de distribución por carga de la LH hipofisiaria después de su separación por cromatoenfoque en ratas controles (parte superior) y ratas obesas (parte inferior) a los 6 meses de estudio. Cada una de las barras representa el promedio \pm error estándar de los porcentajes de LH recuperada después del cromatoenfoque, la línea vertical discontinua indica un valor de pH de 7.0.

* $p=0.06$ vs 4Kcal/ gr. ** $p=0.08$ vs 4Kcal/ gr.

Cuadro 3. Porcentajes de recuperación por unidad de pH de las isoformas de rLH hipofisiaria de las ratas controles y obesas

Grupo de fracciones	pH	3 meses		6 meses	
		4 Kcal (%)	5 Kcal (%)	4 Kcal (%)	5 Kcal (%)
1	9.99-9.0	8.47±5.2	26.24±12.2	1.35±0.7	26.83±9.8
2	8.99-8.0	75.45±4.5	57.99±10.3	78.08±7.2	50.65±2.7
3	7.99-7.0	6.04±1.4	4.9±0.6	9.04±2.7	6.53±2.7
4	6.99-6.0	3.48±0.6	3.4±0.8	5.17±2.2	4.35±1
5	5.99-5.0	2.9±0.6	1.78±0.3	1.89±0.7	2.91±0.8
6	4.99-4.0	1.2±0.4	1.25±0.3	1.36±0.7	2.38±0.8
7	3.99-3.0	0.53±0.2	0.66± 0.2	1.44±0.8	3.5±1.9
8	Pico de sal	1.9±0.1	3.58±0.6	1.6±0.6	2.82±1.3

Cuadro 4. Porcentajes de isoformas básicas y ácidas

		Isoformas básicas (≥ pH 7.0)	Isoformas ácidas (≤ pH 6.99)
3 meses	4 Kcal	89.95±3.5	10.05±3.3
	5 Kcal	89.22±2.2	10.77±2.2
6 meses	4 Kcal	88.48±6.6	11.51±6.6
	5 Kcal	84.02±5.3	15.97±5.3

Determinaciones hormonales.

En las figuras 8 y 9 se muestran las concentraciones de rLH y rFSH. La rLH a los seis meses disminuye de manera significativa en las ratas obesas en comparación de los controles de la misma edad ($p=0.04$). Las concentraciones de rFSH en las ratas obesas a los tres meses de estudio, disminuye con respecto a los controles ($p=0.02$).

La determinación de los esteroides T y E_2 se presentan en las figuras 10 y 11. No se encontró ninguna diferencia en la determinación de T. La determinación de estradiol muestra que existe un aumento significativo ($p=0.03$) en el grupo de ratas obesas de tres meses, lo cual coincide con el estado de obesidad en varones, dicho aumento no mantuvo la diferencia estadística a los seis meses de estudio. (Cuadro 5).

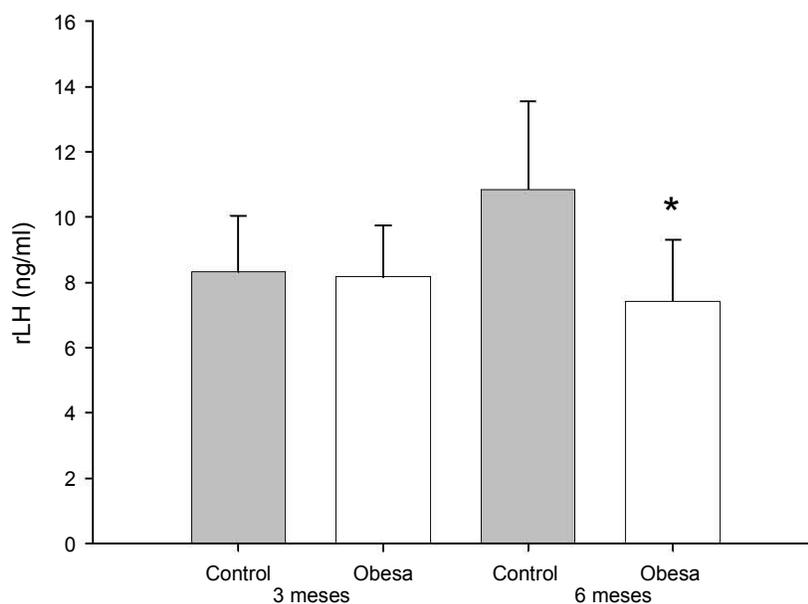


Figura 8. Determinación de rLH en suero

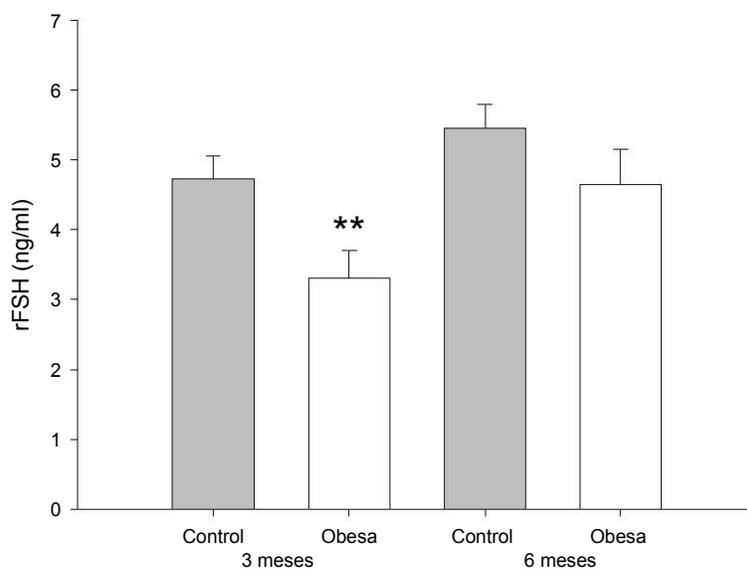


Figura 9. Determinación de rFSH en suero

Concentraciones séricas de rLH y rFSH en las ratas controles y obesas de 3 y 6 meses de estudio. Cada una de las barras representa el promedio \pm el error estándar de las concentraciones séricas de LH (parte superior) y FSH (parte inferior) de cuatro ratas alimentadas con dieta de 4 Kcal/gr (barras oscuras) y 5 Kcal/gr (barras blancas).

* $p=0.04$ vs 4Kcal/gr 6 meses. ** $p=0.02$ vs 4Kcal/ gr 3 meses.

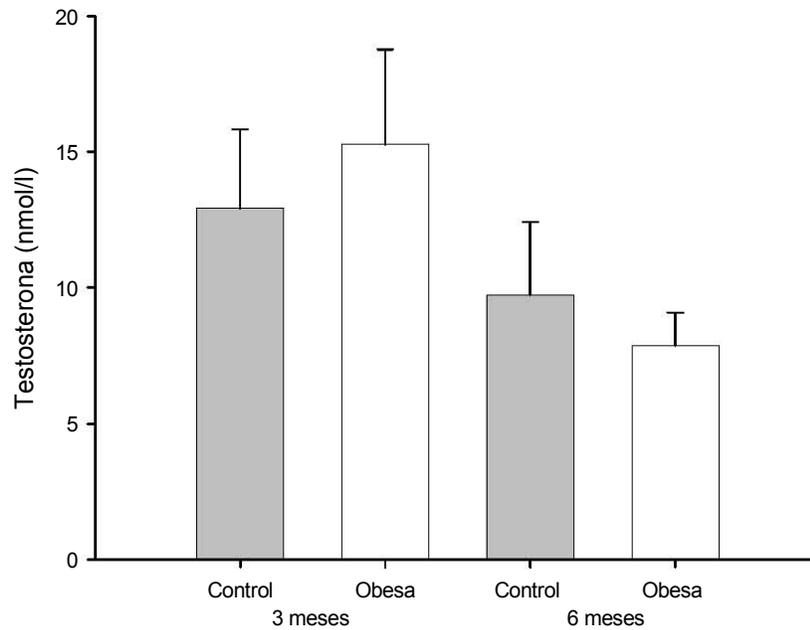


Figura 10. Determinación de testosterona en suero

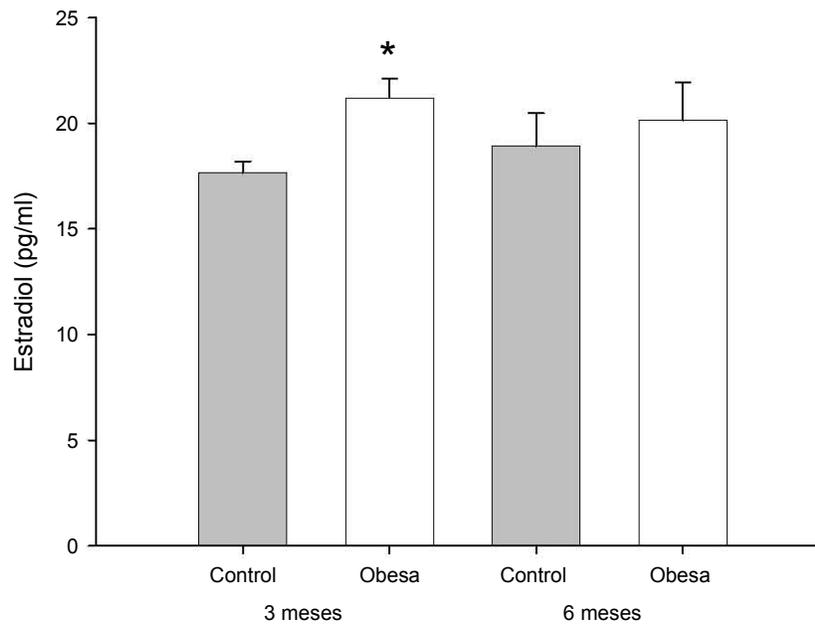


Figura 11. Determinación de estradiol en suero

Concentraciones séricas de T y E₂ en las ratas controles y obesas de 3 y 6 meses de estudio. Cada una de las barras representa el promedio ± el error estándar de las concentraciones séricas de T (parte superior) y E₂ (parte inferior) de cuatro ratas alimentadas con dieta de 4 Kcal/gr (barras oscuras) y 5 Kcal/gr (barras blancas). * p=0.03 vs 4Kcal 3 meses.

Cuadro 5. Concentración de Estradiol, Testosterona, LH, FSH, Leptina e Insulina de ratas alimentadas con 4Kcal/gr y 5Kcal/gr

GRUPO	Estradiol (pg/ml)	Testosterona (nmol/L)	rLH (ng/ml)	rFSH (ng/ml)	Leptina (ng/ml)	Insulina (ng/ml)
3 MESES						
4 Kcal/g	17.66±0.54	12.92±2.90	8.56±1.44	4.73±0.33	8.58±1.35	0.19±0.04
5 Kcal/g	21.20±0.91 *	15.27±3.49	8.13±1.03	3.31±0.40 *	11.77±1.71 *	0.33±0.08
6 MESES						
4 Kcal/g	18.93±1.55	9.74±2.68	11.99±1.65	5.45±0.35	14.17±1.41	0.21±0.03
5 Kcal/g	20.15±1.79	7.88±1.20	7.33±0.78 *	4.65±0.50	23.73±1.60 *	0.93±0.25 *

p=0.05 vs 4 Kcal/g en el mismo grupo.
n=4 en todos los grupos

DISCUSIÓN.

Las diferencias de peso mencionadas en la sección de resultados, 17% para 3 meses y 26% para 6 meses se tomaron como los diferentes grados de obesidad para nuestro estudio. Ambas mediciones, respectivamente, mostraban una $p < 0.001$, con lo cual se comprobó que el grupo de 5 kcal/gr, era diferente y tenía mayor peso que su contraparte control. En adición al parámetro de peso se validó el modelo de obesidad utilizando aspectos recurrentes en obesidad hiperinsulinemia e hiperleptinemia. A los seis meses de estudio los resultados de la concentración de insulina y leptina mostraron una diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ contra sus controles, lo anterior confirmó un estado de obesidad mayor para ese tiempo. A los tres meses los animales tenían aumentados las concentraciones de leptina, que además tuvieron un aumento de peso suficiente para ser considerado obesidad. Es de notar que el modelo de inducción de obesidad realizado fue más representativo a los 6 meses de lo que generalmente ocurre en humanos. Los últimos parámetros utilizados fueron glucosa colesterol y triglicéridos, habiendo obtenido valores más altos en ratas obesas, independientemente del tiempo de estudio, lo anterior nos refiere que el modelo resulta adecuado para obtener ratas obesas. Dietas similares suelen ser un buen modelo para evaluar aspectos nutricionales (Tovar, 2002), sin embargo esta fue la primera vez en ser ocupado como modelo para fisiología reproductiva. El modelo resultó adecuado para la definición de obesidad que se tomó en cuenta, el hecho de que el grupo de ratas obesas comiera dieta con 20% más energía, en forma de grasa, que las ratas control logró que existiera el desequilibrio entre la energía de ingesta y la energía de gasto. Hecho que puede concordar con la definición de obesidad de la Organización Mundial de la Salud.

Las curvas de crecimiento muestran que se cumple con la segunda parte de la definición, un aumento considerable en peso en los dos tiempos de estudio.

Habiendo obtenido ratas obesas, el análisis de las formas moleculares de LH muestra que la mayor proporción de isoformas obtenidas en los cromatofocos de extractos hipofisarios de las ratas controles y obesas se encontró en la parte básica del gradiente, lo cual coincide con lo encontrado por otros grupos de investigación de las formas moleculares de LH de humano y otras especies (Baezinger, 1988; Castro-Fernández, 2000); en particular el patrón de distribución encontrado en este trabajo coincide con otros estudios realizados en la rata hembra donde se muestra que la mayor parte de la LH inmunoreactiva se encuentra en un intervalo de pH de 9.5-8.5, en especial de 9.0-8.5 (De Biasi, 2002). A diferencia de la LH humana, la cual se distribuye en pH de 6.99 o menor, mientras las isoformas en la rata se encuentran puntos isoeléctricos más básicos. Lo anterior es de relevancia ya que hasta el momento no se habían estudiado las características de la LH en la rata obesa.

Los resultados obtenidos en el estudio realizado por Castro-Fernández (2000) donde se analizó el patrón de distribución de las isoformas de LH humana en suero en pacientes obesos, mostró un predominio de isoformas más básicas, en dichos sujetos, con respecto a los controles, en el presente trabajo encontramos que las isoformas de LH muestran una tendencia a hacerse más básicas en los grupos de ratas obesas, confirmando lo antes mencionado. Los porcentajes de recuperación obtenidos en el GDF 1 (pH 9.99-9.0) de ambos grupos muestran un aumento en las ratas obesas, a los 3 meses es de (26.24±12.2%) en obesas y de (8.47±5.2%) en controles con p no significativa; en el grupo de 6 meses obtenemos (26.83±9.8%) en comparación a los controles (1.35±0.7%), p=0.06. El hecho de

no alcanzar la diferencia estadística puede deberse en parte al número de animales utilizados en el estudio. Sin embargo esta tendencia es suficiente para hacer una relación entre el grado de obesidad y un corrimiento en el patrón de distribución de isoformas hacia la parte más básica del gradiente.

La alta heterogeneidad en los perfiles (figuras 4 y 5), incluso en los del mismo grupo sugiere que podría deberse a la variación que existe entre los individuos, no obstante el análisis realizado por unidad de pH muestra datos más homogéneos y se observa un desplazamiento del patrón de secreción hacia la parte básica del gradiente en las ratas obesas, también hay que hacer notar que en los grupos control de tres o seis meses, el patrón de distribución es similar en particular en el grupo de fracciones de 8.99-8.0. Asimismo, el patrón de isoformas encontrados en ratas obesas es similar independientemente del tiempo de estudio, existe un desplazamiento hacia las isoformas más básicas en especial en el GDF de 9.99-9.0 en comparación con su grupo control. En el grupo de obesas de seis meses en la parte ácida del gradiente, a partir de 5.99-5.0, encontramos que en cada grupo de fracciones siempre hay un pequeño aumento en el porcentaje de recuperación, aunque esto no permite determinar si existe un mayor contenido de ácido sialico debido al corrimiento hacia la parte básica obtenido en el GDF 1. Las formas más básicas son las predominantes en todos los grupos, por lo tanto podemos suponer que en todos los grupos las isoformas predominantes son las sulfatadas.

En el estudio de Castro-Fernández se analizó la LH sérica de humano y en el presente se utilizó LH hipofisiaria de rata. La diferencia entre estas dos fuentes de obtención son de dos tipos cuantitativas, en la hipófisis existe mayor concentración de LH de lo que se puede encontrar en suero, lo que hace que sea más fácilmente su identificación mediante el RIA; y cualitativas, en las células del gonadotropo están en existencia todas las

formas moleculares y los precursores peptídicos que darán origen a la LH madura (Larrea, 1988), mientras que en suero la hormona ha empezado a sufrir el proceso de depuración, y de degradación de proteínas. A pesar de estas diferencias es notable haber encontrado resultados similares, a pesar de las diferencias antes mencionadas, esto es relevante debido a que es un aspecto similar en la fisiología del humano y de la rata.

Al ser la primera vez en utilizarse el modelo de inducción de obesidad, no se tenía la certeza si este sería el adecuado para caracterizar el eje reproductivo de ratas. Dourmashkin (2005) probó que existen diferencias fisiológicas dependiendo que modelo de inducción de obesidad se utilice, muestra que en la obesidad inducida por lípidos hay un aumento en la metabolización de lípidos en músculo, de tal forma que podría ser que si en el músculo existe un metabolismo de lípidos más activo puede también agilizar las rutas esteroidogénicas que se presentan también en este tejido además de las gonadales (Aizawa, 2006). De funcionar así este mecanismo, esto pudo haber mantenido los niveles de estradiol iguales para los grupos en especial los de 6 meses, manteniendo también las concentraciones de T similares para los grupos, si no existen diferencias en estos esteroides que regulan la glicosilación diferencial de las gonadotropinas tampoco existirá una diferencia en el patrón de distribución de isoformas. Sin embargo la tendencia indica que los pequeños cambios en las concentraciones hormonales son suficientes para ver una diferencia en el patrón de distribución de isoformas, obteniendo un corrimiento hacia la parte básica del gradiente en las ratas obesas.

La concentración de T en las ratas de seis meses presenta una tendencia a ser menor que las de tres meses esto puede deberse al efecto que tiene la edad en bajar la función reproductiva, particularmente la esteroidogénesis. Esta tendencia a bajar puede ser resultado también de la inhibición que tiene la leptina en la producción de T *in vitro* (Tena-

Sempere, 2002), esto es claro para las ratas obesas de 6 meses, donde la concentración de leptina es de 23.73 ± 1.60 ng/ml y la de T es de 7.88 ± 1.20 nmol/l, los cuales son, respectivamente, los valores más altos para leptina y más bajo para T, esto es una evidencia que se afecta las señales que funcionan como vínculo entre el sistema de regulación de apetito y balance energético y el sistema reproductivo.

Existió un aumento significativo de estradiol en las obesas de tres meses en comparación con su grupo control mostrando que el modelo de inducción de obesidad puede emular la hiperestrogenemia de la obesidad en humano al menos a ese tiempo, sin embargo existe un efecto debido a la edad que hace que no exista más diferencia entre los dos grupos de seis meses. El hecho que no haya existido un aumento considerable de estradiol, en el grupo de los seis meses, tal como sucede en el humano puede deberse a la conversión extraglandular, la cual es la mayor fuente de estradiol en machos (Nelson, 2001). Se ha mostrado que en el epidídimo de rata existe conversión extraglandular de testosterona en estradiol y este proceso está regulado por la concentración de LH (Shayu, 2006), al haber más concentración de LH a los seis meses en las ratas control pudo haber un aumento consecuente en las concentraciones de estradiol, impidiendo ver una diferencia a esa edad. Esta alza de concentración de LH también puede servir de evidencia de mecanismos para mantener la función reproductiva normal, reflejado en concentración de T, en ratas controles de seis meses.

A pesar de los niveles tan elevados de leptina, tal como sucede en la rata fa/fa (Young, 1982) es posible que para encontrar alteraciones características de la obesidad se tenga que combinarse esto junto con la susceptibilidad a daños en el eje reproductivo que presentan las hembras sobre los machos al menos en el ratón ob/ob donde el 100% de las hembras tienen problemas reproductivos e infertilidad (Tena-Sempere, 2002) mientras que

algunos machos pueden tener sistema reproductivo normal (Ahima, 2000), esto es debido a mecanismos compensatorios que revierten varias de las consecuencias provocadas por el aumento en la masa corporal (Mercer, 2001). Esto sería consistente con un estudio en adolescentes, donde la hiperleptinemia, además de ser más alta en mujeres, produce la inhibición en la respuesta a la GnRH en mujeres pero no en hombres (Bouvattier, 1998).

El presente estudio no permite establecer si en humano existiría una diferencia en el patrón de distribución de isoformas hipofisiarias en obesidad de varones. Aunque esa posibilidad sigue remanente, a pesar de que las isoformas de humano y rata son de diferente naturaleza, las isoformas en suero de pacientes obesos presentan un cambio hacia isoformas más básicas (Castro-Fernández, 2000), como ocurre en el presente trabajo. Por otro lado la obesidad en humanos es multifactorial (Speakman, 2004) y en el modelo de inducción de obesidad por dieta, precisamente, la dieta es factor principal que está provocando la obesidad en las ratas, junto con la falta de actividad física pero aún así se está dejando de lado lo complejo que resulta la obesidad como una entidad clínica donde los factores ambientales son de vital importancia y donde incluso variables psicológicas (Kishi, 2005) pueden influir y, a su vez, tener influencia en el sistema reproductivo. Aunque siempre hay que tener precaución en la extrapolación de datos provenientes de modelos animales al humano.

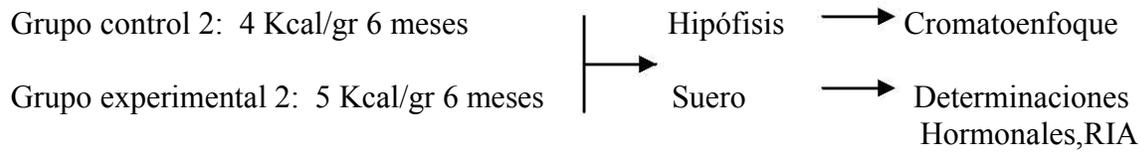
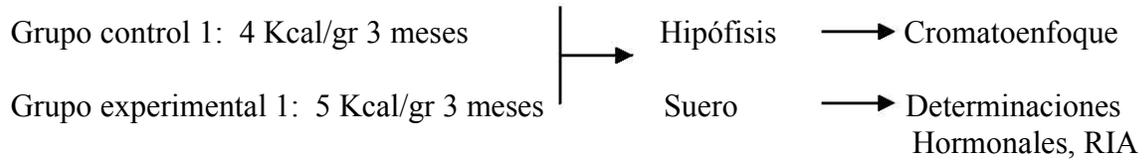
Conclusiones

El modelo utilizado en la rata macho cumplió con el objetivo de producir obesidad presentando características fisiológicas típicas de esta entidad. Siendo más marcado este hecho a los seis meses de estudio.

La caracterización del patrón de distribución de isoformas en la rata macho con obesidad inducida presentó una tendencia a las isoformas más básicas especialmente a los seis meses de estudio, lo cual correlaciona con el estado elevado de obesidad para este tiempo.

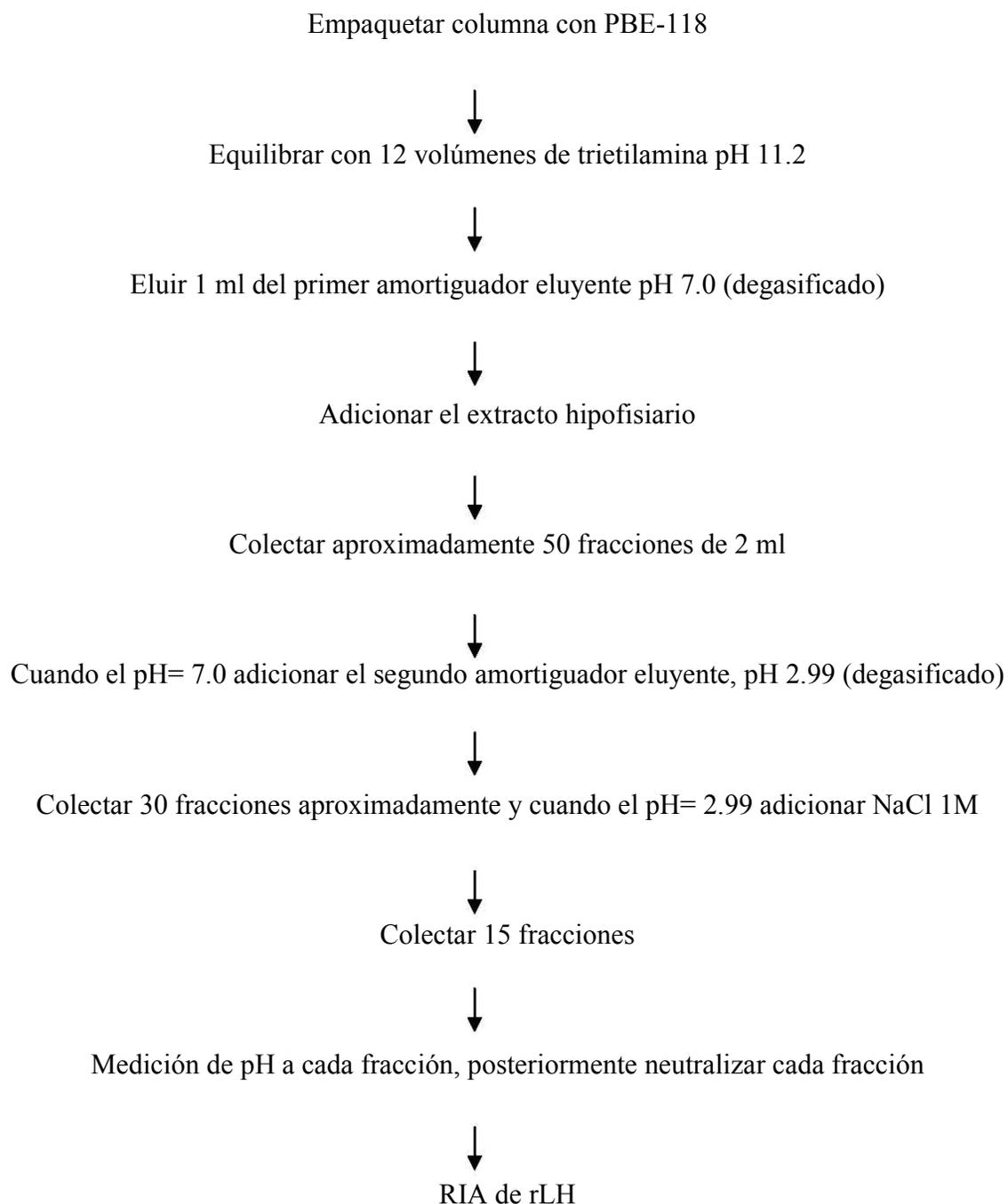
La determinación de concentraciones hormonales permite establecer que este modelo es muy similar a lo que ocurre en humanos en los aspectos fisiológicos y establece patrones de lo que ocurre en la rata en el aspecto reproductivo.

Diseño experimental



Anexo 1. Diseño experimental.

CROMATOENFOQUE DE rLH



Anexo 2. Metodología utilizada para separar las isoformas de la hormona
luteinizante hipofisiaria

RADIOMARCAJE DE rLH, POR EL MÉTODO DE CLORAMINA T

Empaquetar una columna de 20 x 1 cm de vidrio con sephadex G-100 degasificado



Equilibrar con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M con 1% de albúmina



Se lleva a cabo la reacción 2.5 µg de rLH con 1 mCi de I-125 y Cloramina T por 60 segundos en constante agitación



Detener la reacción con metabisulfito de sodio



Agregar la reacción a la columna



Colectar 32 fracciones de 1 ml cada una



Contar 2 µl de cada fracción en el contador γ



Seleccionar la hormona radiomarcada

Anexo 3. Metodología utilizada para obtener la hormona marcada con I¹²⁵.

RADIOINMUNOANÁLISIS DE rLH

Se prepara una curva estándar de rLH-RP3



Se agregan las muestras problema, 50 µl de fracción de cromatoenfoque ó 100 µl de suero



Se agregan 100 µl de anticuerpo para rLH diluido 1:150,000



Se agregan 100 µl rLH radiomarcada (15,000 cpm)



Incubación 24 hrs



Se agrega el segundo anticuerpo 1:15, 100 µl



Incubación 2 hrs



Detener la reacción con 1 ml de agua fría



Centrifugar 3000 rpm, 30 minutos, 4°C



Decantar el sobrenadante



Realizar la medición de radioactividad en el contador γ

Anexo 4. Metodología utilizada para cuantificar rLH inmunoreactiva.

LITERATURA CITADA

- Adam C. L., Findlay P. A., Miller D. W. 2006. Blood brain transport and appetite and reproductive neuroendocrine response to intracerebroventricular leptin injection in sheep: influence in photoperiod. *Endocrinology*. 22: 1-27.
- Ahima R., Saper C., Flier J., Elmquist J. 2000. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 21: 263-307.
- Aizawa K., Iemitsu M., Maeda S., Jesmin S., Otsuki T., Mowa C., Miyauchi T., Mesaki N. 2006. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292: E577-E589.
- Amatruda J., Harman S., Pourmotabbed G. 1982. Hypothalamic and pituitary dysfunction in obese males. *Int J Obes*. 6: 183-189.
- Arner P. 2000. Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue!. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24:4, S57-62.
- Auwerx J., Steals B. 1998. Leptin. *Lancet*. 351: 737-742.
- Baezinger J. 2003. Glycoprotein hormone GalNAc-4-sulphotransferase. *Biochemical Society Transaction*. 31, part 2: 326-30.
- Baezinger J., Green E. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagin-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 947: 287-306.
- Barreiro M., Tena-Sempere M. 2004. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility?. *Mol Cell Endocrinol*. 226: 1-9.
- Beck B. 2006. Neuropeptide Y in normal and in genetic and dietary-induced obesity. *Phylos Trans R soc Lond B Biol Sci*. 361: 1159-1185.

- Bergendahl M, Veldhuis J. 2001. Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III, Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective. *Hum Reprod.* 16:1058-1064.
- Boothby M., Ruddon R., Anderson C. 1981. A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem.* 256: 5121-5127.
- Bouvattier C., Lahlou N., Roger M., Bougnères P. 1998. Hyperleptinemia is associated with impaired gonadotrophin response to GnRH during late puberty in obese girls, not boys. *European Journal of Endocrinology.* 138: 653-658.
- Burgon P., Stanton P., Robertson D. 1996. In-vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified isoforms of human FSH correlate with in vitro bioactivity. *J Endocrinology.* 134: 4827-4836.
- Casimirri F., Pasquali R., Cantobelli S., Melchionda N., Barbara L. 1991. Obesity and adipose tissue distribution in men: relation to sex steroids and insulin. *Minerva Endocrinol.* 16: 31-35.
- Castro-Fernández C., Olivares A., Soderlund D, López-Alvarenga J., Zambrano E., Veldhuis J., Ulloa-Aguirre A., Méndez J. 2000. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half life and biological to immunological ratio of gonadotropin-release hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol and Metab.* 85: 4603-4610.
- Chappel S., Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev,* 4:179-211.
- Clem B., Hudson E., Clark B. 2005. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) enhances cAMP-responsive element binding (CREB) protein

phosphorylation and Phospho-CREB interaction with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *Endocrinology*. 146: 1348-1356.

- Colaguero A., Burrello N., Ossino A., Weber R., D'Agata R. 1996. Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release in vitro. *J Endocrinol*. 151: 269-275.
- Cowley M. A. 2003. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *European journal of pharmacology*. 480: 3-11.
- Cunningham M. J., Clifton D. K., Steiner R. A. 1999. Leptin action in the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol reprod*. 60: 616-622.
- Dalkin A., Haisenleder D., Ortolano G., Ellis T., Marshal J. 1989. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 125: 917-924.
- Damián-Matsumura P., Zaga V., Maldonado A., Sánchez-Hernández C., Timossi C., Ulloa-Aguirre A. 1999. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol*. 23: 153-165.
- De Biasi S., Pérez G., Apfelbaum L., Apfelbaum M. 2002. Pituitary luteinizing hormone microheterogeneity in the afternoon of proestrus in rats: some new insights. *Horm Res*. 58: 8-15.
- Dharmesh S., Baenziger J. 1993. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulphated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 11127-11131.

- Dourmarshkin J., Chang G., Gayles E., Hill J., Fried S., Julien C., Leibowits S. 2005. Different forms of obesity as a function of diet composition. *International Journal of Obesity*. 29: 1368-1378.
- Dube M., Xu B., Kalra P., Sninsky C., Kalra S. 1999. Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. *Brain Res*. 816: 38-46.
- Fernandez-Fernandez R., Martini A. C., Navarro V. M., Castellano J. M., Dieguez C., Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 254-255: 127-132.
- Friedman J. M., Halaas J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395: 763-770.
- Gale S.M, Castracane D., Mantzoros C.S. 2004. Energy Homeostasis, Obesity and eating disorders: Recent Advances in Endocrinology. *J Nutr*. 134: 295-298.
- Green E., Baezinger J. 1988. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. I. Structural elucidation on the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*. 263: 25-35.
- Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S. 1963. The preparation to ¹³¹I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J*. 89:114-123.
- Horvath T., 2006. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity*. 14: 228S-233S.

- Isidori A. M., Caprio M., Strollo F., Moretti C., Trajese G., Isidor A., Fabbri A. 1999. Leptin and androgens in male obesity: Evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 3673-3680.
- Jang I., Hwang D., Lee J., KabRyong C., Kim Y., Kang T., Kim C., Shin D., Hwang J., Huh Y., Cho J., 2003. Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. *Exp Anim.* 52:2, 99-107.
- Kaiser U., Jacobowiak A., Steinberger A., Chin W. 1997. Differential effects of gonadotropin-release hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 138: 1224-1231.
- Kakuma T., Lee Y., Higa M., Wang Z., Pan W., Shimomura L., Unger R. 2000. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding protein in liver and pancreatic islets. *PNAS.* 97: 8536-8541.
- King D. 2006. The rise, fall and resurrection of ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding and behavior and body weight. *Physiology and Behavior.* 87: 221-244.
- King J., Anthony E. 1984. LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* 5: 195-207.
- Kishi T., Elmquist J. 2005. Body weight is regulated by brain: a link between feeding and emotion. *Molecular Psychiatric.* 10: 132-146.
- Kissebah A.H., Peiris A.N. 1989. Biology of regional body fat and distribution: relation ship to non-insulin-dependet diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1989, 5:83-109.

- Lambert A., Talbot J., Anobile C., Robertson W. 1998. Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction*. 4: 619-629.
- Larrea F., Oliart R., Escorza A., Valencia X., Ulloa-Aguirre A. 1988. Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisarias y regulación hormonal de la esteroidogénesis. *La rev. Invest. Clin. (Mex)*. 40:33-45.
- Lauterio T. J., Bond P., Ulman E. A. 1994. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptibility and resistant rat populations. *J Nutr*. 124: 2172-2178.
- Leibowitz S., Akabayashi A., Wang J. 1998. Obesity on a high-fat diet: Role of hypothalamic galanin in neurons of the anterior paraventricular nucleus projecting to the median eminence. *The Journal of Neurosciences*. 18: 2709-2719.
- Levin B. E., Ambrose A., Dunn-Meynell, Balkan B., Kessey E. 1997. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*. 273 (2 pt 2): R725-R730.
- López-Alvarenga J., González-García L. 2001. Enfermedades asociadas a la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 9 Abril-junio:77-85.
- Lukaski C.C. 1987. Methods for the assessment of human body composition: traditional and new. *Am J Clin Nutr*. 64:537-556.
- Marshall J., Kelch R. 1986. Gonadotrophin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med*. 315: 1459-1468.
- Mascher D., Paredes-Carbajal M., Torres-Durán P., Zamora-González J., Diaz-Sagoya J., Juarez-Oropeza. 2006. Ethanolic extract of *Spirulina maxima* alters

the vasomotor reactivity of aortic rings from obese rats. *Arch Med Res.* 37: 50-57.

- Matsumoto A., Bremner W. 1984. Modulation of pulsatile gonadotrophin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metb.* 58: 609-614.
- Mayes J.S., Watson G.H. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews* 5, 197-216.
- Mercer J., Speakman J. 2006. Hypothalamic neuropeptide mechanism for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361: 1159-1185.
- Mitchel R., Bauerfeld C., Schaefer F., Robertson W. 1994. Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis treatment. *Clin Endocrinol.* 41: 65-73.
- Morell A., Gregoriadis G., Scheinberg I., Hickman J., Ashwell G. 1971 The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem,* 246:1461-1467.
- Moschos S., Chan J. L., Mantzoros C. S. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril.* 77:433-444.
- Nelson L., Bulun S. 2001. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 45: S116-S124.
- Nomura K., Ohmura K., Nakamura Y., Horiba N., Shirakura Y., Sato Y., Ujihara M., Ohki K., Shisume K. 1989. Porcine luteinizing hormone isoform(s): relationship between their molecular structures, and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology,* 124:712-719.

- Pantel J., Robert P., Troalen F., Kujas M., Bellet D., Bidart J. 1998. Characterization of human lutropin carboxyl-terminus isoforms. *Endocrinology*. 139:527-533.
- Park, S., Lee Y., Kim Y., Kim H., Doh K., Lee M., Kim J-Y., Lee S. 2000. Change in activity of the sympathetic nervous system in diet-induced obese rats. *J. Korean Med Sci*. 15: 635-640.
- Pasquali R., Casimirri F., Melchionda N., Fabbri R., Capelli M., Plate L., Patrono D., Balestra V., Barbara L. 1988. Weight loss and sex steroid metabolism in massively obese men. *J Endocrinol Invest*. 11: 205-210.
- Pérez-Echarri N., Pérez-Matute J., Martínez A., Marti A., Moreno-Aliaga M. 2005. Serum and gene expression levels of leptin and adiponectin in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity. *J. Physiol Biochem*. 61: 333-342.
- Prunet-Marcassus B., Desbazielle M., Bros A., Louhce K., Delagrangé P., Renard P., Casteilla L., Penicaud L. 2003. Melanotonin reduces body weight gain in Sprague-Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003. 5347-5352.
- Puett D., Li Y., DeMarx G., Angelova K., Fanelli F. 2007. A functional transmembrane complex: The luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol Cell Endocrinol*. 260-262: 126-136.
- Raposinho P., Broqua P., Pierroz D., Hayward A., Dumont Y., Quirion R., Junien J., Aubert M. 1999. Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y NPY in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype. *Endocrinology*. 140: 4046-4055.

- Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G. C. Jr. 1993, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *J Nutr*; 123: 1939-51.
- Robertson D., Van Damme M., Diczfalusy E. 1977. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Mol Cell Endocrinol*. 9: 45-56.
- Rodriguez A., Quevedo-Coli S., Roca P., Palou A. 2001. Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs and leptin expression in rat adipose tissues. *Obesity Research*. 9: 579-587.
- Ropelato MG, Garcia-Rudaz MC, Castro-Fernández C, et al. 1999. 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*. 84:4629.
- Roseman D., Baenziger J. 2000. Molecular basis of lutropin recognition by the mannose/GalNAc-4-SO₄ receptor. *PNAS*. 97: 9949-9954.
- Rothwell, N. 2001. Thermogenesis: where are we and where are we going? *International Journal of Obesity*. 25: 1272-1274.
- Ruddon R., Bedows E. 1997. Assisted protein folding. *J Biol Chem*. 272:3125-3128.
- Sairam M. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* 1989, 3:1915-1926.

- Santen R. 1975. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition for luteinizing hormone secretion in men?. *J Clin Invest.* 56: 1555-1563.
- Selman H., De Santo M., Sterzik K., Cipollone G., Aragona C., El-Danasouri I. 2006. Rescue of spermatogenesis arrest in azoospermic men after long-term gonadotropin treatment. *Fertil Steril.* 86: 466-468.
- Scarpace P., Matheny M., Zhang Y., Tumer N., Frase C., Shek E., Hong B., Prima B., Zolotkhin S. 2002. Central leptin gene delivery evokes persistent leptin signal transduction in young and aged-obese rats but physiological response become attenuated over time in age-obese rats. *Neuropharmacology.* 42: 548-561.
- Schrauwen P., Westerterp K. 2000. The role of high fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 84: 417-427.
- Shayu D., Rao A. 2006. Expression of functional aromatase in the epididymis: Role of androgens and LH in modulation of expression and activity. *Molecular and cellular Endocrinology.* 249. 40-50.
- Simopoulos A. 1987. Characteristics of obesity: an overview. *Ann N Y Acad Sci,* 499: 4-13.
- Speakman J.R. 2004. Obesity: The integrated roles of environment and genetics American Society for Nutritional Sciences. 2090S-2105S. En: WHALTHAM International Science Symposium: Nature, Nurture, and the Case for Nutrition en Bangkok, Tailandia. Octubre 28-31, 2003.
- Spiegelman B. M., Flier J. S. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104: 531-543.

- Tena-Sempere M., Barreiro M. L. 2002. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol.* 188: 9-13.
- Tena-Sempere M., Pinilla L. Zhang F. P., González L. C., Huhtaniemi I., Casanueva F. F., Dieguez C., Aguilar E. 2001. Development and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) Messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biology of Reproduction* 64: 634-643.
- Tovar A., Ascencio C., Torrez N. 2002. Soy protein, casein and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283: E-1016-E-1022
- Tsatsoulis A., Shalet S., Robertson W. 1991 Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol.* 35:193-206.
- Ulloa-Aguirre A., Espinoza R., Damian-Matsumura P., Chappel S. 1988. Immunological and biological potencies of different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod.* 3: 491-501.
- Ulloa-Aguirre A., Maldonado A., Damián-Matsumura P., Timossi C. 2001. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res.* 32: 520-532.
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C. 2000. Biochemical and functional aspects of gonadotropin-release hormone and gonadotropins. *Reprod Biomed Online.* 2: 48:62.
- Ulloa-Aguirre A., Zambrano E., Timossi C., Méndez J. 1995. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res.* 26: S219-S230.
- Unger R., Orci L. 2001. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 15, 312-321.

- van Dijk G., de Vries K., Benthem L., Nyakas C., Buwalda B., Sheurink A. J. W. 2003. Neuroendocrinology of insulin resistance: metabolic and endocrine aspects of adiposity. *European Journal of Pharmacology*. 480: 31-42.
- van Oijen M., Josemanders D., Laheij R., van Rossum., Tan A., Jansen J. 2006. Gastrointestinal disorders and symptoms: does body mass index matter? *The Journal of Medicine*. 64: 45-79.
- Veldhuis J., Dufau M. 1987. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biological active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest*. 80: 631-638.
- Vermeulen. A., Kaufman J., Desplypere J., Thomas G. 1993. Attenuated luteinizing hormona (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 76: 1140-1146.
- Von Diemen V., Trindade E, Trindade M. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21: 425-429.
- Wide L., Albertsson-Wikland K., Phillips D. 1996. More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 216-221.
- Wilson C., Leigh A. Chapman A. 1990. Gonadotrophin glycosylation and function. *J Endocrinology*. 125: 3-14.
- Winters S., Moore J. 2004. Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction*. 128: 13-23.
- Wójcic-Gładysz A., Misztal T., Wankowzka M., Romanowicz K., Polkowska J. 2003. Effect of central infusions of neuropeptide Y on GnRH/LH axis in ewes during the early anoestrus period. *Reproductive Biology*. 3: 29-46

- Wholler M., Tessmer S., Neff D., Nguema A., van Roo B., Waechter-Brulla D. 2001. Leptin stimulates gonadotropin releasing hormone release from cultured intact hemihypothalami and enzymatically dispersed neurons. *Exp Biol Med.* 226:6, 591-596.
- Young R., Frink R., Longcope C. 1982. Serum testosterone and gonadotropins in the genetically obese male Zucker rat. *Endocrinology.* 111: 977-981.
- Zariñan T, Olivares A, Söderlund D, Méndez J.P., Ulloa-Aguirre A. Biological-to-immunological ratio of basal and gonadotrophin-releasing hormone-releasable follicle-stimulating hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2001; 16:1611.
- Zigman J., Elmquist J., 2003. Minireview: From anorexia to obesity –The Yin and Yang of body weight control. *Endocrinology* 144:9, 3749-3756.
- Zirkin B. R., Chen H. 2000. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction.* 63, 977-981.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature,* 372-425.
- Zhang Y., Scarpace P. J. 2006. The role of leptin in resistance and obesity. *Physiology and Behavior.* 88: 249-256.