



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
FACULTAD DE MEDICINA.
DIVISION DE POSTGRADO.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SUBDIRECCION GENERAL MEDICA
DELEGACION 3 SUROESTE DEL DISTRITO FEDERAL

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. BERNARDO SEPULVEDA".
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

**DETERMINACION DE ISOFORMAS DE TSH
CIRCULANTE EN PACIENTES CON HIPOTIROIDISMO
PRIMARIO ANTES Y DESPUES DE TRATAMIENTO
CON LEVOTIROXINA.**

TESIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL DIPLOMA COMO ESPECIALISTA EN
ENDOCRINÓLOGIA Y NUTRIÓLOGIA

PRESENTA:
DRA. MA GABRIELA RANGEL SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS
DR. MOISES MERCADO ATRI



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.

DR. NIELS H. WACHER RODARTE
JEFE DE LA DIVISION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI.

DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION DE ENFERMEDADES
ENDOCRINAS. PROFESOR TITULAR CURSO ESPECIALIZACION
EN ENDOCRINOLOGIA. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES,
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.

DR. MOISES MERCADO A.
JEFE DEL SERVICIO DE ENDOCRINOLOGIA, PROFESOR ADJUNTO
DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN ENDOCRINOLOGIA.
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES. CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI.

Q.F.B. MACRINA MASON.
ADSCRITA A LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN
ENFERMEDADES ENDOCRINAS. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI. ASESOR DE TESIS.



INDICE.

I. ANTECEDENTES

a) Bioquímica y biología molecular de TSH:

- Características estructurales
- Procesamiento pre y postraducciona
- Patrones de glucosilación
- Sialización y sulfatación de subunidades de TSH

b) Isoformas de TSH en condiciones normales y en hipotiroidismo

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

III. HIPOTESIS.

IV. OBJETIVO.

V. MATERIAL Y METODOS.

- Diseño del estudio
- Protocolo
- Selección de la muestra:
 Criterios de inclusión, exclusión y no-inclusión
- Variables:
 Independiente
 Dependientes
- Metodología
- Consideraciones éticas.
- Recursos para el estudio.

VII. RESULTADOS.

VIII. DISCUSION.

IX. CONCLUSIONES.

X. BIBLIOGRAFIA.

ANTECEDENTES.

La hormona estimulante del tiroides (TSH) pertenece a la familia de hormonas glucoproteicas que incluye además a la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la gonadotropina coriónica (HCG) (2). Con un peso molecular de 28kd, la TSH está compuesta por dos subunidades unidas en forma no covalente (1,2). La subunidad α es la misma en todas las hormonas glucoproteicas, mientras que la subunidad β confiere especificidad biológica, estructural e inmunológica a cada hormona (2,4).

La TSH es sintetizada y secretada por el tiotropo de la adenohipófisis y se encuentra bajo el control de señales que provienen tanto del hipotálamo como de la periferia (3). El factor hipotalámico que regula predominantemente la síntesis y secreción de TSH es el tripéptido conocido como hormona liberadora de tiotropina (TRH), el cual se localiza en la eminencia media y el núcleo paraventricular (3). La somatostatina hipotalámica inhibe la síntesis y secreción de TSH pero su papel fisiológico en este eje se desconoce. El control negativo de la síntesis y secreción de TSH depende de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) . Estas

hormonas tiroideas inhiben por retroalimentación negativa tanto a nivel hipotalámico como hipofisario las síntesis y secreción de TSH (2,3). En la actualidad se sabe que esta retroalimentación negativa depende de la integridad de los procesos de monodesyodinación hipofisaria de T4 a T3 mediante la monodesyodinasas I y II (3,12).

Una característica importante de las hormonas glucoproteicas es su alto contenido de carbohidratos (8). Aproximadamente, el 21% del peso de la subunidad α y 12% del peso de la subunidad β , está constituido por carbohidratos complejos (2). Las subunidades α y β son sintetizadas en forma separada, a partir de genes distintos (la α está codificada en el cromosoma 6 y la TSH- β en el 1) (3). Como muchas otras hormonas hipofisarias, la TSH circulante consiste de un grupo heterogéneo de moléculas . Esta heterogeneidad molecular resulta de fenómenos pre y postraduccionales, así como postsecretorios (5). Uno de los fenómenos postraduccionales que contribuyen importantemente a esta heterogeneidad molecular, es la adición de carbohidratos complejos al esqueleto peptídico de esta hormona (2,8). La glucosilación de estas hormonas trae como consecuencia variabilidad en el tamaño de la molécula, cambios en sus características fisicoquímicas (p.e. punto isoelectrico), diferencias

en su actividad biológica y modificaciones en las tasas de depuración metabólica (12).

Estudios de desglucosilación han demostrado que la porción peptídica de TSH es esencial para la unión con su receptor, mientras que la presencia de oligosacáridos determina su actividad biológica y su índice de depuración (1,4). Los peptidos de las subunidades de TSH naciente son glucosilados con oligosacáridos precursores ricos en manosa que sirven de substrato para la formación de oligosacáridos complejos que contienen fucosa, N-acetilglucosamina, sulfatos y residuos de ácido siálico (2,4).

Se han demostrado diferentes isoformas de TSH circulante en diversos estados fisiopatológicos (1,7,9). Esta diversidad de formas moleculares se debe a diferencias en el contenido de ácido siálico y otros carbohidratos pero también incluye diferencias en el grado de sulfatación (4,15). En el hipotiroidismo primario la caída de las hormonas tiroideas libera de la retroalimentación negativa al tirotripo, con lo cual este aumenta su síntesis y secreción de TSH (3). Sin embargo, además de producirse una mayor cantidad de TSH, esta tiene diferencias cualitativas importantes si se compara con la TSH que se produce en el estado eutiroides (1,7,9). En la hipertirotrpinemia del hipotiroidismo

primario no tratado, se produce una TSH con un gran contenido de ácido siálico, lo que resulta en una molécula más grande, con un punto isoeléctrico más ácido y con una vida media más larga (1,7,9). Existen otros estados de hipersecreción de TSH, que se engloban en la llamada “secreción inapropiada de TSH”, condición que incluye al adenoma hipofisario productor de TSH (tirotropinoma) y a la resistencia pituitaria selectiva a hormonas tiroideas (19,20). Al menos en el caso del tirotropinoma se ha encontrado que la TSH secretada tiene un alto contenido de manosa y relativamente bajas cantidades de ácido siálico, lo cual resulta en una molécula parecida a la TSH del neonato (20,21).

No se conoce con precisión el porque de las diferencias en el grado de glucosilación en el hipotiroidismo primario y otros estado de hipersecreción de TSH. Sin embargo, existen estudios experimentales en ratones hipotiroideos que demuestran un incremento en los niveles de RNAm de la β -1,4-galactosiltransferasa y de la α manosidasa II, enzimas involucradas en los procesos de glucosilación (5).

Hasta la fecha, no han sido estudiados los cambios que sufre la molécula de TSH conforme el paciente con hipotiroidismo primario es tratado con levotiroxina y llevado así al eutiroidismo.

HIPOTESIS

El tratamiento del hipotiroidismo primario con levotiroxina produce cambios en el perfil cromatográfico de TSH circulante.

OBJETIVO.

Determinar si la sustitución del hipotiroidismo primario mediante la utilización de levotiroxina produce cambios en las formas moleculares de TSH circulante.

MATERIAL Y METODOS.

- **Diseño del estudio:**

Estudio prospectivo, longitudinal, comparativo.

- **Universo de trabajo:**

Pacientes con hipotiroidismo primario de reciente diagnóstico, sin tratamiento previo, detectados en la consulta del servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico

Siglo XXI en el periodo comprendido entre mayo de 1995 a enero de 1996. Grupo control de sujetos eutiroideos, estratificados de acuerdo a edad y sexo con el universo estudiado.

• **Protocolo de estudio:**

Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de hipotiroidismo primario en base a datos clínicos y bioquímicos mediante pruebas de función tiroidea (PFT) en forma basal. Todos ellos con elevación de TSH entre 30 y 50 μ U/ml. A estos pacientes se les inició tratamiento con 100 μ g de levotiroxina sódica. Se realizaron controles de PFT cada 4 semanas, en base a los cuales se ajustó la dosis de levotiroxina hasta lograr normalizar la TSH.

Se realizó cromatografía por exclusión molecular de TSH circulante antes de iniciar tratamiento sustitutivo, un mes después de que el paciente había recibido 100 μ g de levotiroxina y una vez logrado el eutirodismo, el cual se definió como la normalización de TSH.

• **Ensayos:**

a) Pruebas de función tiroidea: La T4 total fue determinada mediante un radioinmunoensayo (RIA) de anticuerpo policlonal ("Amerlex-M T4 RIA", Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Amersham UK, Rochester, NY, USA) con coeficientes de

variación (CVs) inter e intra ensayo de 4 y 3% respectivamente. La T4 libre se determinó mediante un RIA competitivo que usa un anticuerpo anti-T4 monoclonal marcado de ratón ("Amerlex-MAB FT4", Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, Amersham UK, Rochester, NY, USA) con CVs inter e intraensayo de 6.1 y 5.3% respectivamente. La T3 total se midió con un RIA policlonal (Cis Bio International, Gif-Sur-Yvette, Francia) con CVs intra e interensayo de 7%. Se usó un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) de doble anticuerpo para medir TSH en los perfiles tiroideos de rutina (no en los perfiles cromatográficos). Este IRMA de TSH tiene una sensibilidad de 0.03 mUI/L y CVs inter e intraensayo de 4.2 y 5.6% respectivamente.

b) Cromatografía de TSH: La cromatografía de exclusión molecular de TSH se realizó en una columna de 1 x 50 cm, con Sephadex G-100 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). La inmunoreactividad de TSH en las fracciones colectadas se determinó mediante un RIA policlonal (Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, USA) con un límite de detección de 0.14 mUI/L y CVs inter e intraensayo de 6 y 4%.

RESULTADOS.

Se logró realizar estudio cromatográfico, en el momento del diagnóstico de hipotiroidismo primario y posterior a la sustitución a eutiroidismo con levotiroxina en 4 pacientes. Las características basales de estos 4 pacientes eran las siguientes:

<u>PACIENTE</u>	<u>EDAD</u>	<u>SEXO</u>	<u>TSH</u> <u>(mU/L)</u>	<u>T4</u> <u>(µg/dl)</u>	<u>T3</u> <u>(ng/dl)</u>
1	40 años	F	40.4	4.6	65
2	35 años	F	50	3.3	86
3	43 años	F	50	1	59
4	38 años	F	42.7	3.5	110

A todas estas pacientes se les inició terapia sustitutiva con levotiroxina, de manera que a dos meses de iniciado el tratamiento, la TSH se había normalizado en todas ellas. La dosis promedio de levotiroxina que se requirió para lograr lo anterior fué de 100 mcg al día, y dicha terapia se vió acompañada de resolución de los síntomas de hipotiroidismo.

La inmunoreactividad de TSH se dividió en cuatro grandes grupos: a) Isoformas de más de 38 Kd, b) Isoformas de 24-30

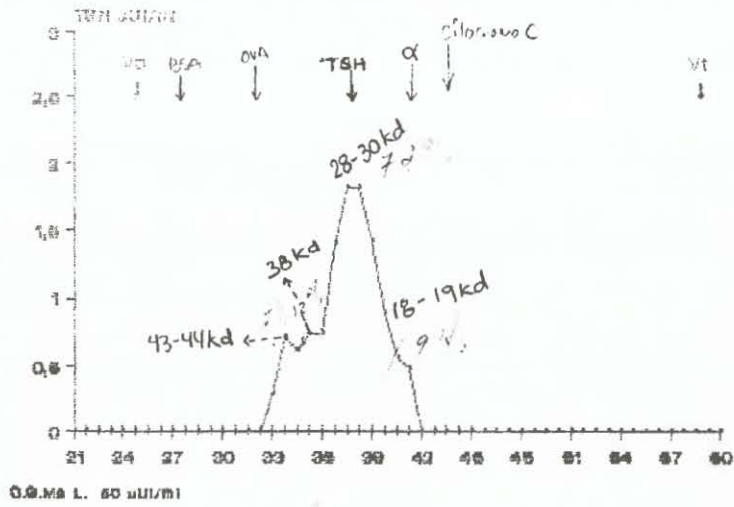
Kd, c) Isoformas de 18-22 Kd, d) Isoformas de menos de 16 Kd. La figura 1 es un ejemplo de cromatogramas de suero, midiendo inmunoreactividad de TSH antes (a) y después (b) del tratamiento con levotiroxina. En condiciones de hipertirotropinemia secundaria al hipotiroidismo, no observamos un patrón en cuanto a la proporción de las distintas isoformas de TSH. Así mismo, una vez que las pacientes fueron tratadas con levotiroxina y llevadas al eutirodismo, la proporción de isoformas de TSH cambió, pero sin ningún patrón o tendencia común a las cuatro pacientes (Fig. 1, tabla II).

Tabla II:

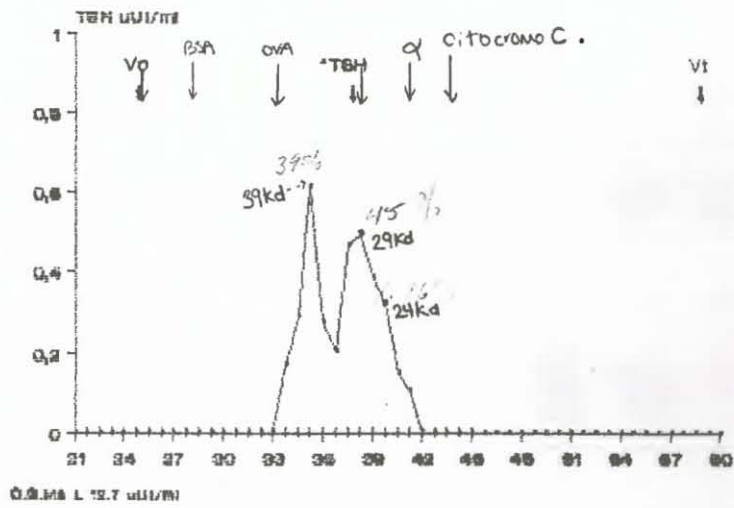
<u>PACIENTE</u>	<u>> 38 Kd</u>	<u>24-30 Kd</u>	<u>18-22 Kd</u>	<u><16 Kd</u>
1) Antes:	26%	52%	19%	3%
Después:	16%	36%	45%	1.2%
2) Antes:	35%	38%	8%	12%
Después:	27.6%	55%	16%	0%
3) Antes:	19%	72%	9%	0%
Después:	30%	56%	0%	14%
4) Antes:	38%	62%	0%	0%
Después:	30%	68%	0%	2%

III

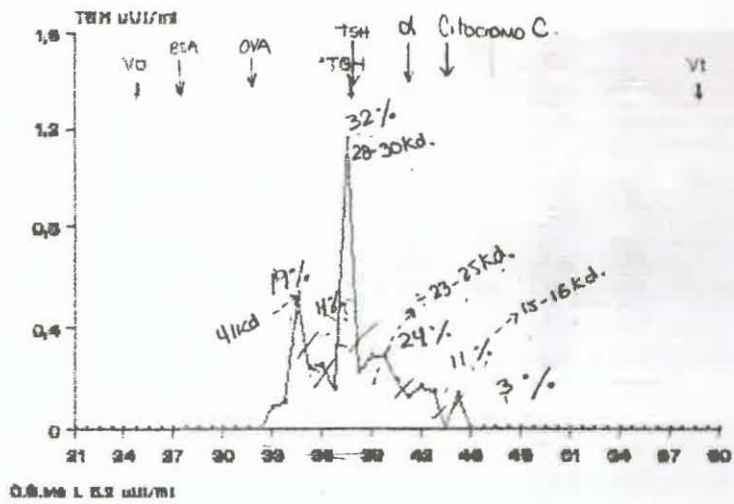
CHROMATOGRAPHY OF TSH HYPOTHYROIDISM



CHROMATOGRAPHY OF TSH HYPOTHYROIDISM



CHROMATOGRAPHY OF TSH HYPOTHYROIDISM



DISCUSION.

El presente estudio muestra que la proporción de isoformas de TSH circulante se modifica al pasar a un estado de eutiroidismo. Estos resultados son semejantes a los informados en la literatura (1,5,7), aunque no se logra de manera constante una disminución en el porcentaje de las formas moleculares más grandes(¿ más sializadas ?) al normalizar la concentración de TSH total.

Llamó la atención que no se encontró una mayor proporción de subunidad α libre en el suero de las pacientes con hipotiroidismo. Lo anterior indica que en el hipotiroidismo primario, la síntesis de ambas cadenas de TSH es coordinada. En contraste de lo que ocurre en la hipertirotropinemia por los adenomas hipofisarios secretores de TSH, en los que de manera característica sintetizan un exceso de subunidad α (19).

Es importante notar que la cromatografía por exclusión molecular permite solamente analizar diferencias en el peso molecular de las isoformas. En el presente estudio no se analiza el grado de glucosilación de la TSH plasmática y esto se logra mediante cromatografía de afinidad en columnas con lectinas como la concanavalina A y el germen de trigo, las cuales son moléculas que fijan carbohidratos (1).

En conclusión, en este estudio se confirmó que las formas moleculares de TSH circulan en diferentes proporciones con relación al estado de la función tiroidea. Además que la proporción de las variantes moleculares se modifica al cambiar el medio ambiente hormonal. La presencia de las subunidades libres en el hipotiroidismo difiere de otras circunstancias que cursan con hipertropinemia como es el caso del adenoma hipofisiario (22).

BIBLIOGRAFIA.

1. Papandreu MJ, Persani L, Asteria C. Variable carbohydrate structures of circulating thyrotropin as studied by lectin affinity chromatography in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:393
2. Magner J. Thyroid stimulating hormone: Biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocr Rev* 1990;11:354
3. Shupnik M, Ridgway E. Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev* 1989;10:459
4. Szkudlinski WM, Thotakura RN, Weintraub B. Subunit-specific functions of N-linked oligosaccharides in human thyrotropin: Role of terminal residues of α and β -subunit oligosaccharides in metabolic clearance and bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;92:9062.
5. Helton ET, Magner JA. β 1-4 Galactosyltransferasa and α mannosidasa II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Endocrinology* 1994;135:1980
6. Pickles AJ, Peers N, Robertson WR, Lambert A. Different isoforms of human pituitary thyroid-stimulating hormone have different relative biological activities. *J Mol Endocrinol* 1992;9(3):251

7. Pickles AJ, Peers N, Robertson WR. Microheterogeneity of thyroid-stimulating hormone from the pituitaries of euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *J Mol Endocrinol* 1992;9(3):245
8. Magner JA. Biosynthesis, cell biology and bioactivity of thyroid-stimulating hormone: update 1994 *Endocr Rev Monograph* 1994;3:55
9. Constant RB, Weintraub BD. Differences in the metabolic clearance of pituitary and serum thyrotropin derived from euthyroid and hypothyroid rats. Effects of chemical deglycosylation of pituitary TSH. *Endocrinology* 1986;119:2720
10. Vamvakopoulos NC, Kourides IA. Identification of separate mRNA coding for the α and β subunits of thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:3809
11. Papandreou MJ, Sergi Y., Medri G. Differential effect of glycosylation on expression of antigenic and bioactive domains in human thyrotropin. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:137
12. Menezes-Ferreira MM, Petrick PA. Weintraub B.D. Regulation of thyrotropin bioactivity by TSH-releasing hormone and thyroid hormone. *Endocrinology* 1985;118:2125.
13. Thotakura NR, Desai RK, Bates LG, Cole ES, Pratt BM, Weintraub BD. Biological activity and metabolic clearance of

a recombinant human thyrotropin produced in chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 1991;128:341

14. Huber GK, Fong P, Concepcion ES, Davies TF.

Recombinant human thyroid-stimulating hormone: Initial bioactivity assessment using human fetal thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1328

15. Gesundheit N, Magner JA, Chen T, Weintraub BD. Different sulfation and sialylation of secreted mouse thyrotropin subunits: regulation by thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986;119:455

16. Magner JA, Kane J, Chou ET. Intravenous thyrotropin (TSH) releasing hormone releases human TSH that is structurally different from basal TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1306

17. Szkudlinski MW, Thotakura NR, Bucci Y, Joshi LR, Tsai A, East Palmer J, Shiloach J, Weintraub BD. Purification and characterization of recombinant human thyrotropin isoforms produced by chinese hamster ovary cells: the role of sialylation and sulfation in thyrotropin bioactivity. *Endocrinology* 1993;133:1490

18. Helton TE, Magner JA. Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 1994;134:2347

19. Gesundheit N, Petrick PA, Nissim M. Thyrotropin-secreting pituitary adenomas: Clinical and biochemical heterogeneity. Case reports and follow-up of nine patients. *Ann Intern Med* 1989;111:827
20. Weintraub BD, Stannard BS, Meyers L. Glycosylation of thyroid-stimulating hormone in pituitary tumor cells: Influence of high mannose oligosaccharide units on subunit aggregation, combination and intracellular degradation. *Endocrinology* 1983;112:133
21. Magner JA, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone subunit processing and combination in microsomal subfractions of mouse pituitary tumor. *J Biol Chem* 1982; 257:6709
22. Mason M, Zarate A, Fonseca E, Mendoza C. Patients with TSH-secreting pituitary tumor possess different TSH molecular isoforms. *Arch Med Res* 1995;26:239