

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

MAESTRIA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACION DE LAS ISOFORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE
EN PACIENTES CON SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO**

**TRABAJO DE TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**PRESENTADO POR:
JESUS FRANCISCO ACEVEDO VARGAS**

TUTOR ACADEMICO

DR. JOSE ARTURO BERMUDEZ

**UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN MEDICINA REPRODUCTIVA,
SECCION DE GINECOLOGIA ENDOCRINA,
HOSPITAL DE GINECOOBSTETRICIA "LUIS CASTELAZO AYALA",
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.
AREA DE INVESTIGACION EN REPRODUCCION ANIMAL ASISTIDA,
DEPTO. DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION, UAM-I.
LAB. DE REGULACION HORMONAL,
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UAM-I.**

MEXICO D. F.

JULIO 1997

Agradezco al CONACYT por el apoyo otorgado durante mis estudios a través de la beca con número de registro 88083. Como también al IMSS por la beca otorgada, con numero de matrícula 10756191.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO LA VALIOSA COLABORACION DEL PERSONAL DE LOS SIGUIENTES CENTROS DE INVESTIGACION:

**UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN MEDICINA REPRODUCTIVA,
SECCION DE GINECOLOGIA ENDOCRINA,**

**LABORATORIO DE MECANISMOS DE ACCION HORMONAL II,
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION, "INNSZ".**

**LABORATORIO DE REGULACION HORMONAL,
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UAM-I.**

**CENTRO DE ESTUDIOS FILOSOFICOS POLITICOS Y SOCIALES
VICENTE LOMBARDO TOLEDANO.**

Y en especial a: Pablo, Aleida, Yuri, Joaquín, Laura, Maribel y Sandra.

A mi madre, esposa y hermanos.

INDICE

Resumen	6
Antecedentes	7
Planteamiento del problema	22
Justificación	22
Objetivos	23
Hipótesis	23
Material y métodos	23
Resultados	31
Discusión	41
Conclusiones	42
Bibliografía	43
Anexos	48

RESUMEN

La disfunción gonadotrópica en el síndrome del ovario poliquístico (SOP) ha sido caracterizada y se presenta con niveles séricos elevados de la hormona luteinizante (LH), lo que causa alteraciones menstruales e hiperandrogenismo. La LH es una gonadotropina con diversas isoformas moleculares que presentan diferentes actividades biológicas durante el ciclo menstrual y a través de la vida en la mujer normal. El objetivo de esta tesis fue la determinación de los patrones de elución de las isoformas de la LH estableciendo sus diferencias entre 6 mujeres normales y 6 pacientes con SOP. Los métodos que se usaron en la separación y aislamiento de las isoformas se basaron en su tamaño molecular (exclusión molecular) y sus puntos isoeléctricos (cromatoenfoco); la actividad biológica de las isoformas se evaluó mediante el bioensayo de células de Leydig en cultivo y la medición por radioinmunoanálisis de testosterona en el medio. Los resultados obtenidos en los cromatoenfocos indican que al ser comparados con los normales, el SOP en la región más alcalina (rango de 10.50 a 9.80, límite 1), presentan mayor reconocimiento inmunológico y actividad biológica (23% y 7 respectivamente) a diferencia del grupo control (15% y 6% en el mismo orden), los límites 2 y 3 con rangos de 9.79 a 9.00 y 8.99 a 8.29 ambos son muy similares y en el límite 4 el reconocimiento inmunológico es mayor en el grupo control, en el pico de sal (PS) la actividad biológica es mayor en el SOP. En conclusión, otra característica de este síndrome es la existencia de isoformas moleculares alcalinas de la LH con mayor actividad biológica y reconocimiento inmunológico, lo cual pudiese explicar en parte su fisiopatología.

ANTECEDENTES

El ciclo ovulatorio está regulado por un elaborado sistema neuroendocrino, que consiste del cerebro (siendo el hipotálamo una subunidad), la adenohipófisis y los ovarios, las interrelaciones del ciclo ovárico se entienden en términos de un *complejo neuroendocrino primario* que puede operar autónomamente en aislamiento y un *sistema de control neuroendocrino secundario* que es el principal regulador en la naturaleza.

El sistema endocrino y el sistema nervioso regulan las actividades metabólicas y homeostáticas del organismo, los dos sistemas reguladores interactúan de tal manera que las secreciones endocrinas están influenciadas directamente o indirectamente por la actividad nerviosa, a su vez las hormonas también pueden influenciar la actividad funcional del sistema nervioso central.

El hipotálamo juega un papel muy importante en la regulación hormonal de la función reproductiva femenina, el principal factor hipotalámico que regula la función reproductiva es la Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH), que es un decapeptido, cuya liberación está influenciada por neuronas de otras regiones del encéfalo cuyas terminales llegan al Núcleo Arcuato, Por medio de neurotransmisores y neuropéptidos se ejercen acciones activadoras o inhibitorias sobre la función de las células de dicho núcleo, aumentando o disminuyendo tanto la cantidad de GnRH, como la frecuencia y duración de su liberación. Se ha demostrado que la epinefrina y la norepinefrina aumentan la liberación de GnRH, mientras que la dopamina, la serotonina y los opioides endógenos inhiben esta secreción (1, 1) ver figura 1.

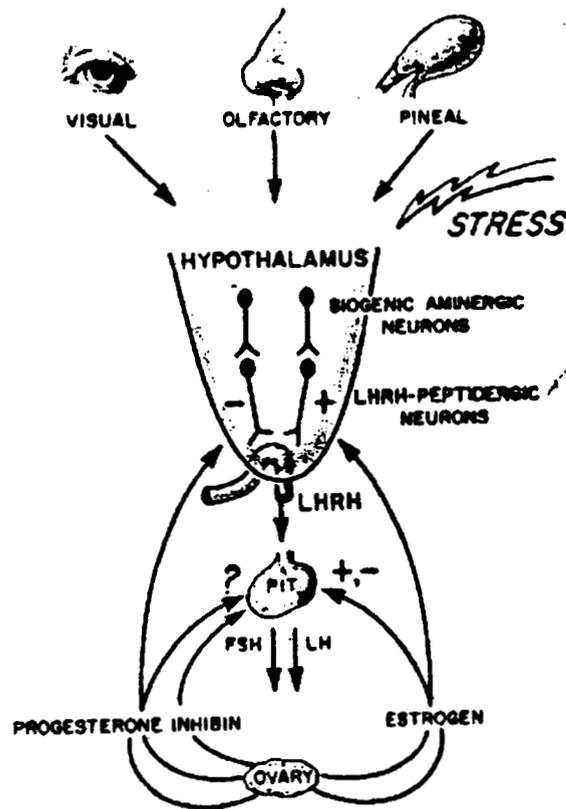


Figura 1

En este diagrama se muestran las interacciones de los controles de la retroalimentación neural y hormonal, la secreción de GnRH de las neuronas peptidérgicas está regulada por un sistema biogénico aminérgico a través del cual hay una gran variedad de señales no hormonales; el estímulo visual, las señales olfatorias y los factores pineales, pueden influenciar la función reproductiva femenina, los estrógenos tienen efectos complejos sobre los mecanismos de control de la retroalimentación en la secreción de la LH y la FSH, dependiendo de la dosis, tiempo y el estado hormonal previo, los estrógenos pueden inhibir o estimular la secreción de la LH a través de los efectos de los controles negativos y positivos. La progesterona puede estimular o inhibir la secreción de GnRH dependiendo de cuando sea dada, siendo sus efectos a nivel de la hipófisis relativamente insignificantes (1).

Por lo general todas las funciones organizadas de los animales vivos (sin importar su posición en la escala evolutiva) están sujetas a cambios periódicos o cíclicos, muchos de los cuales están influenciados principalmente por el sistema nervioso. En particular en la fisiología reproductiva, en la mujer existen tres patrones moduladores para la secreción de GnRH: 1.- El patrón trignitan o circatrignitan, se caracteriza por cambios de baja frecuencia en la liberación de GnRH que ocurren aproximadamente cada 30 días es decir, durante el ciclo menstrual normal; 2.- El patrón diurno o circadiano, se caracteriza por cambios en la concentración plasmática y de frecuencia intermitente de GnRH, que ocurren cada 24 hrs aproximadamente, estos cambios son mínimos en mujeres adultas, pero son muy marcados al inicio de la pubertad y en las mujeres jóvenes; 3.- Patrones circahorales, estos son cambios de alta frecuencia en la liberación de GnRH, se caracterizan por pulsos que incrementan la concentración plasmática de GnRH aproximadamente cada hora (1, 2, 3).

La función de la hipófisis depende de la neurosecreción hipotalámica; la organización funcional de la unidad hipotálamo-hipófisis se refleja en su cercanía anatómica y por la presencia de un sistema porta especial, mismo que lleva directamente las secreciones hipotalámicas al tejido hipofisario. En muchos vertebrados la hipófisis está dividida en tres lóbulos; el lóbulo anterior, el lóbulo neural y el lóbulo intermedio, comunmente nombradas como adenohipófisis, neurohipófisis e hipófisis intermedia.

La GnRH actúa sobre células llamadas gonadotropos en la adenohipófisis o hipófisis anterior, se une a receptores de alta afinidad en la membrana plasmática; después de la unión con el receptor y a través de un mecanismo que parece ser independiente de cAMP, pero que requiere la movilización de Ca^{2+} y la activación de la Proteína Cinasa C, da como respuesta final la inducción para la liberación de las gonadotropinas (4).

Las gonadotropinas, la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH) son indispensables para la función reproductiva en todos los vertebrados, estas son secretadas por la hipófisis bajo el control de la GnRH, razón por la cual también presentan un patrón de secreción y pulsátil. Las gonadotropinas son transportadas por el plasma se van a unir a sus receptores en las gónadas ejerciendo un efecto estimulador sobre ellas; la LH y la FSH tienen efectos distintos pero complementarios para el control de la maduración y el desarrollo de las gónadas en general y en particular de las células germinales, dirigiendo tanto la esteroidogénesis como la gametogénesis.

La **FSH** actúa sobre las células foliculares para que se transformen en las llamadas células de la granulosa de los folículos antrales, estimulando entre otras funciones la síntesis de estrógenos y la de receptores para la LH.

La **LH** actúa por otra parte sobre las células de la granulosa de los folículos preovulatorios para desencadenar la ovulación y posteriormente activar la producción de progesterona y por otra parte en las células del estroma ovárico para formar las tecas que rodean al folículo y promover la síntesis de andrógenos así como su transformación a estrógenos en las células de la granulosa.

En el sexo masculino las funciones de la FSH y la LH tienen sus equivalentes en las células de Sertoli y Leydig respectivamente (1, 4, 5).

Localización celular de las gonadotropinas.

La hipófisis anterior de un mamífero maduro tiene diferentes tipos de células endocrinas, por lo general cada línea secreta un tipo de hormona particular; la LH y la FSH son sintetizadas en las células llamadas gonadotropos, los que controlan la secreción de ambas gonadotropinas. Los gonadotropos responden a estímulos de GnRH, promoviendo la exocitosis de la LH y la FSH, secretan básicamente la LH y en menor proporción la FSH vía gránulos secretorios en respuesta a un aumento en el Ca^{2+} citosólico, al dispararse la

liberación de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} extracelular y la cascada de eventos subsecuentes característicos de las vías transductoras reguladas por este ión, de acuerdo a estudios realizados "in-vitro". Se ha demostrado que existen 3 principales tipos de vacuolas que posiblemente regulan la secreción de las gonadotropinas. Las pequeñas son gránulos secretores, de centro denso, éstas son ricas en la LH; unas grandes en que el gránulo es más difuso, es rica en la FSH y una mucho más pequeña, como si fuera una vacuola sináptica, que contiene gonadotropinas no identificables. (4).

222474

Estructura y biosíntesis de las gonadotropinas.

Las hormonas FSH, LH, Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) y Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), están compuestas por dos diferentes subunidades proteicas, comúnmente llamados α y β , cada una contiene múltiples enlaces disulfuro intracadena; las subunidades α y β , están unidas no covalentemente para formar la molécula activa. La subunidad α es la misma para todas las gonadotropinas y en términos evolutivos es muy conservada aun entre diferentes especies animales, siendo codificada por un solo gen, que en el humano está localizado en el cromosoma 6 (6, 1). La subunidad β es diferente para cada gonadotropina, ésta va a determinar la especificidad biológica de cada hormona (1, 4-9, 11), los genes de la LH y la FSH tienen arreglos genómicos similares sugiriendo un origen filogenético común y explicando el hecho de que un sólo tipo celular (el gonadotrofo) secreta ambas hormonas (4, 5, 11-13).

Las gonadotropinas son glicoproteínas que, como se ha mencionado constan de dos subunidades polipeptídicas, cada una tiene oligosacáridos unidos covalentemente, el péptido dirige su propia glicosilación, la biosíntesis del oligosacárido unido a los dominios del polipéptido plegado, es controlada en parte, por las interacciones polipéptido-oligosacárido que están involucradas en la estabilización del polipéptido conformada por el oligosacárido. (5, 7-9, 14-17).

Los oligosacáridos base presentes en la LH son: N' acetil-glucosamina, N' acetil galactosamina y manosa, tipo; monosulfatados, híbridos que contienen 0, 1

o 2 residuos de manosa periféricos, oligosacáridos monosulfatados complejos que tienen una ramificación periférica y oligosacáridos complejos disulfatados que contienen dos ramificaciones donde una termina en sulfato y la otra puede estar unida al ácido siálico. (14, 16, 18).

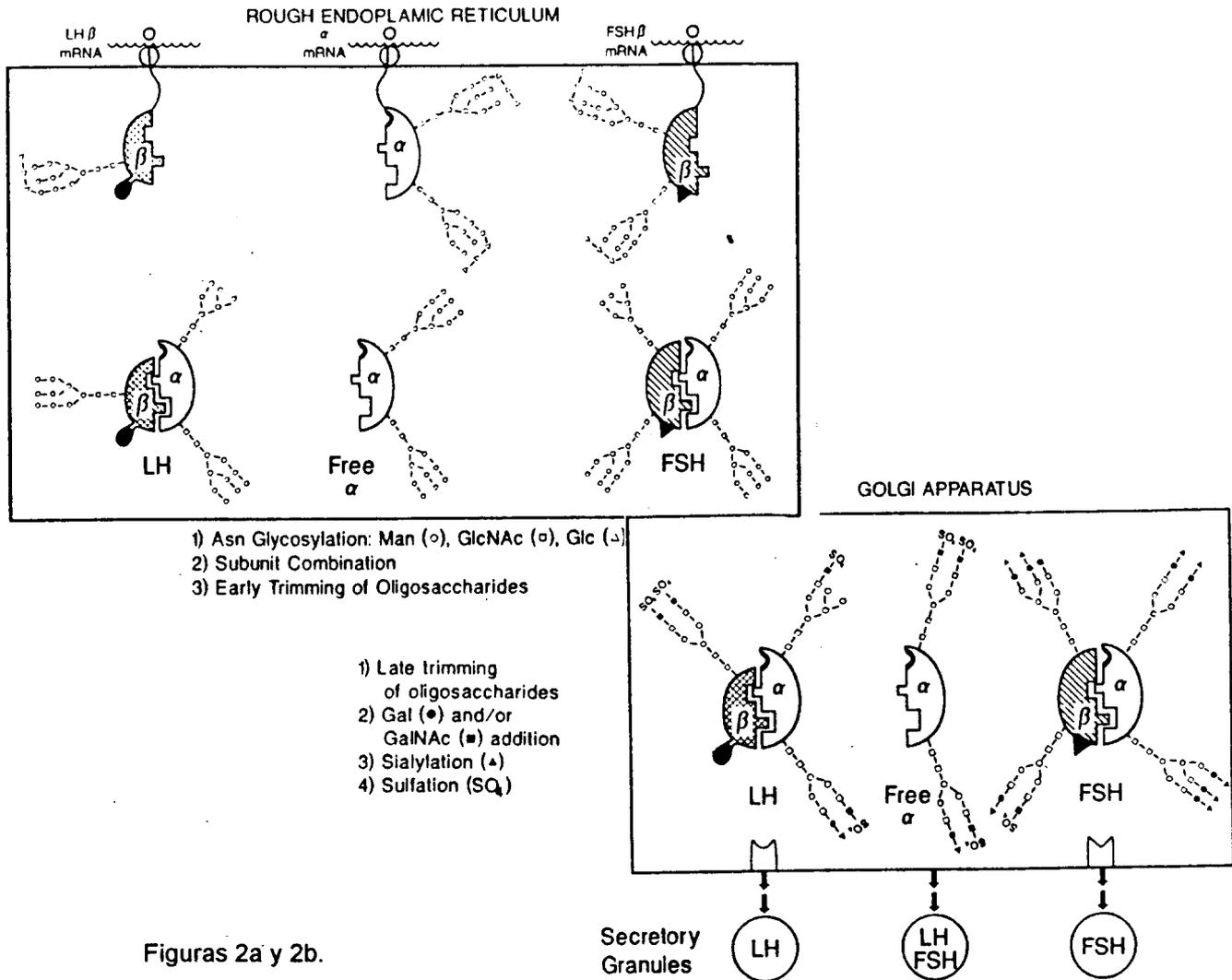
La FSH no contiene cantidades significativas de N' Acetil-Galactosamina, ni de sulfato pero contiene N' Acetil-Glucosamina y manosa, además contiene grandes cantidades de Acido siálico y galactosa en oligosacáridos que contienen dos ramificaciones para su unión, lo que explica su pl más ácido (14, 16, 18).

La clonación de los genes de las gonadotropinas ha aumentado el grado de conocimiento respecto a como son sintetizadas estas proteínas a nivel pretransduccional, aclarándose también la biosíntesis y el procesamiento postransduccional (1, 4, 5, 19). La dimerización y glicosilación son requeridos para proveer la actividad biológica de las gonadotropinas (4, 5, 15, 17). Una de sus principales características en su estructura, es el alto contenido en residuos de cisteína y su alto grado de conservación a través de las especies y aún entre diferentes subunidades; los residuos de cisteína forman enlaces disulfuro y sirven para establecer y restringir la estructura terciaria de las subunidades, aunque la secuencia primaria de los aminoácidos (aa) de las varias subunidades β sean diferentes (1, 9, 11, 12, 14, 15, 20), la localización de los residuos de cisteína se ha conservado, por lo que algunos dominios funcionales de las subunidades han sido descritos en términos de las asas peptídicas que se extienden entre las cisteínas; las diferencias en las secuencias de los aa en estas asas intercisteína, son las responsables de las distintas propiedades de unión al receptor de las hormonas individuales (18). Los puentes intradisulfuro han sido elucidados para ambas subunidades, usando métodos químicos y proteolíticos, la subunidad α tiene 5 puentes disulfuro y la subunidad β 6, no existen cisteínas libres en cada subunidad y estas se asocian no covalentemente para formar los heterodímeros

(1, 14, 16). En las subunidades α y β están glicosilados los sitios de anclaje para las cadenas de azúcares, teniendo una heterogeneidad considerable en la composición de los azúcares y además bajo diferentes circunstancias fisiológicas (1, 9, 14-17). Existen dos clases de sitios de glicosilación; las cadenas de carbohidratos unidas a N que se encuentran ancladas a residuos de asparagina (Asn) y cadenas unidas a O⁻ que están ancladas a residuos de serina y treonina por enlaces glicosídicos (12, 16-18). La subunidad α tiene dos sitios de glicosilación unidos a N, estudios realizados por mutagénesis sitio-dirigida indican que la ausencia de glicosilación en Asn⁵² no modifica la dimerización con la subunidad β , pero la hormona pierde la capacidad de inducir señales vía su receptor, esto sugiere que directamente la cadena de azúcares o una conformación secundaria que se induce en la molécula, es crítica para disparar las señales en el receptor; mutaciones en Asn⁷⁸ tienen efectos diferentes sobre la subunidad α , esas alteraciones causan una rápida degradación de la proteína sugiriendo que la cadena de azúcares es importante para el procesamiento intracelular y/o en la estabilidad de la subunidad α . La subunidad LH β tiene un solo sitio de glicosilación localizado en Asn³⁰ en humanos (16, 18). Todas las subunidades β de la LH, FSH, TSH y HCG tienen una extensión péptidica de 25 residuos en el extremo carboxilo, el cual contiene 4 sitios de glicosilación unidos a O⁻ (1, 17, 18).

La incorporación de cadenas de azúcares a los polipéptidos se lleva a través de un proceso complejo que ocurre cotransduccionalmente con las subsecuentes modificaciones durante el transporte intracelular y el procesamiento (4, 17), después de la transducción en los ribosomas los polipéptidos entran al Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), con el rompimiento cotransduccional del péptido señal (11, 17). La subunidad α esta generalmente en exceso en relación a la subunidad β , los heterodímeros de las subunidades α y β son formados en RER y

los residuos de glucosa de las ramificaciones de los oligosacáridos son rápidamente adicionados (18) ver figs. (2a y 2b), en donde se resume todo el proceso de biosíntesis de las gonadotropinas.



Figuras 2a y 2b.

Las subunidades α y β son sintetizadas de genes separados y son cotransduccionalmente glicosilados en los sitios de asparagina apropiados, la subunidad α permanece libre (no combinada) o asociada de manera no covalentemente con la subunidad LH β o FSH β , para formar los heterodímeros, que aun permanecen en el RE, los oligosacáridos representativos estan en las hormonas de forma representativa, como se muestran. La figura 2b muestra la representación esquemática de los últimos pasos en la síntesis de la LH y la FSH, las subunidades diméricas o no combinadas reciben las últimas modificaciones de los oligosacáridos asociados a ellas, existe una variación considerable, en las proporciones de los oligosacáridos sulfatados y con ácido siálico en la LH y la FSH en las diferentes especies animales. (Baezinger, Green, 1988)

Las modificaciones hormono-específicas de los carbohidratos se realizan en el Aparato de Golgi (5, 18). Las cadenas de carbohidratos pueden ser bi, tri o tetracatenarias y pueden terminar con ácido siálico, sulfato o azúcares neutros (18). En resumen se crea una marcada microheterogeneidad en la composición de los azúcares. En parte, la adición de sulfato o ácido siálico es determinada por la presencia de una galactosa terminal o de N-Acetil Galactosamina (GalNAc) en una reacción que es llevada a cabo por una GalNAc-transferasa, en contraste el ácido siálico es adicionado a galactosa; la señal o secuencia de reconocimiento para la GalNAc-transferasa esta presente en las subunidades α , LH β y CG β , pero no se encuentra en FSH β (11). La incorporación de ácido siálico da como resultado una vida media circulante mas alta por lo que la FSH tiene una vida media mayor que la LH (11, 12); la sulfatación y el ácido siálico terminal afectan la proporción de eliminación de la hormona en la circulación (5, 11, 18). La distribución de oligosacáridos sulfatados y con ácido siálico es diferente para cada gonadotropina y está influenciada por las condiciones hormonales (5). La LH es sulfatada y la FSH contiene ácido siálico aún siendo producidas por el mismo gonadotropo, consecuentemente las funciones intramoleculares tales como; cambios en la estabilidad de la gonadotropina, tasa de proteólisis, estabilidad térmica, solubilidad, etc. e intermoleculares, la interacción con enzimas proteolíticas, las interacciones con los receptores y de ahí su bioactividad, también son influenciadas por los carbohidratos, (5, 8, 16, 18), con base a lo antes mencionado, la FSH y la LH junto con la TSH van a presentar isoformas moleculares, varias isoformas de la LH y la FSH se han identificado dentro de la hipófisis, entre hipófisis, suero y orina en diferentes especies incluyendo humanos, usando técnicas de alta resolución como, Isoelectroenfoque y Cromatoenfoque las cuales separan a las isoformas en base a su pI (8,10,13-15).

Regulación de la LH por GnRH.

Durante el ciclo menstrual existe una modulación en el patrón de pulsatilidad de GnRH, con un aumento en la frecuencia de pulso y amplitud en el tiempo de la secreción de la LH que precede a la ovulación (I). Estudios realizados por Phillips y Wide, han demostrado que el patrón de las isoformas de la LH y la FSH se modifica después de la estimulación exógena con GnRH en preadolescentes, este patrón se hace más alcalino tanto para la LH como para la FSH respecto a las mujeres jóvenes y este fenómeno no ocurre en los niños. Los valores de la LH después de 90 minutos de la estimulación regresan a los niveles basales, no siendo así para la FSH, lo que pudiera estar relacionado con su vida media circulante (21).

Regulación de la LH por hormonas esteroideas

El mecanismo por el cual las hormonas esteroideas regulan la síntesis de gonadotropinas es complejo, es necesario un aumento en los estrógenos antes de la secreción preovulatoria de la LH, junto con el incremento en la secreción de GnRH, para obtener el incremento de la LH, de una u otra manera en la fase folicular los estrógenos tienen un efecto inhibitorio sobre la secreción de las gonadotropinas a nivel hipotalámico (retroalimentación negativa), pero a mitad del ciclo paradójicamente se lleva a cabo una retroalimentación positiva sobre la unidad hipotálamo-hipófisis produciendo el incremento de la LH. La influencia de los esteroides gonadales en los procesos de biosíntesis de las gonadotropinas altera la incorporación de los carbohidratos a la molécula cambiando el proceso general de síntesis y en consecuencia las proporciones de las moléculas secretadas, por lo que puede deducirse que el ambiente endocrino puede determinar cual de las isoformas sea sintetizada y secretada en forma preferentemente, haciendo concebible que las diferentes isoformas de la LH tengan papeles específicos en los eventos reproductivos (19, 21, 22, 23).

La modulación en los patrones de isoformas de la LH por esteroides gonadales ha sido estudiada por Keel y Schanbacher en ovinos (22, 25, 26) y en

humanos por Wide quién demostró que la administración de 17β -estradiol en mujeres postmenopausicas revierte los patrones de secreción tanto de la LH como de la FSH haciéndolos más alcalinos (24). La progesterona tiene amplios efectos sobre la secreción de las gonadotropinas; durante la secreción preovulatoria de la LH, la progesterona esta en baja concentración sirviendo esto para sincronizar y amplificar la secreción de la LH. Durante la fase lutea ejerce un efecto inhibitorio sobre las gonadotropinas, haciendo su papel en la regulación de la síntesis de las gonadotropinas aún menos claro (4, 9). los efectos de la progesterona a nivel de la hipófisis son controvertidos, pero a nivel de hipotálamo tiene su principal efecto al modular la secreción de GnRH al menos en rata (1).

Testosterona, se conoce que las concentraciones plasmáticas de la LH y la FSH son incrementadas en el macho después de la castración, se indica que la testosterona tiene un efecto regulador directo a nivel de la hipófisis para estimular la FSH y para inhibir la LH, este efecto puede estar mediado vía una interacción directa del receptor de andrógenos con el promotor de la subunidad α , en presencia de GnRH, sin embargo puede suceder que la testosterona inhiba la síntesis de las dos subunidades de las gonadotropinas (4), En varones que han sido sometidos a uninefroctomía se ha observado que los patrones de la LH son menos ácidos (27).

Regulación de LH por péptidos gonadales.

La inhibina, activina y foliculostatina fueron aisladas en base a sus efectos sobre la secreción de la FSH, la inhibina y activina tienen efectos opuestos sobre la FSH, la inhibina suprime la secreción y la activina estimula la liberación de la FSH, la foliculostatina suprime también la secreción, se ha reportado que la inhibina ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción basal de la LH ya que reduce la amplitud de pulso de la LH (4).

La identificación de los péptidos gonadales en la hipófisis juegan papeles reguladores parácrinos y autócrinos en el gonadotropo, para el control de la síntesis de la FSH, siendo la interacción de estos péptidos compleja (1,4).

Regulación de LH por señales neurohormonales.

Existen dos modalidades de la secreción de la LH que son reguladas por un mecanismo intrincado de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis, aunque la liberación hipotalámica de GnRH es el principal modulador, es evidente que además de la GnRH existen un gran número de señales neurohormonales que son necesarias para regular la secreción pulsátil de la LH, neurotransmisores hipotalámicos y neuromoduladores, aa y neuropéptidos, estos ejercen un papel modulador sobre la GnRH en la secreción de la LH, como el neuropéptido Y (NPY), y Galanina (Gal), éstos aumentan cuantitativamente la concentración de la LH secretada por el estímulo de GnRH en los gonadotropos; NPY y Gal son secretados dentro del sistema porta hipofisario de una manera episódica, coincidiendo con GnRH; dos aa excitatorios el glutamato y ácido aspártico, de receptores postsinápticos han sido identificados en el control de la liberación episódica y cíclica de la LH en ratas (1).

SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO

El ciclo menstrual humano puede ser visto como una expresión neuroendocrina integrada de un estado dinámico, con funciones tiempo-dependientes resultando en un ritmo mensual bien definido, que es regulado por múltiples factores (28, 29). Sin embargo, con la pérdida de las señales apropiadas el sistema puede decaer en sus propiedades dinámicas o cíclicas alcanzando una condición estática o de equilibrio, provocando anovulación crónica y por lo tanto amenorrea. Este principio puede ser de mucha importancia en el seguimiento fisiopatológico de los cambios en pacientes con anovulación crónica en general (1, 28-30). Como se ha mencionado, los tres elementos principales de control del sistema cíclico son: el sistema nervioso central

(hipotálamo), la hipófisis y el ovario; estos interactúan de una manera altamente integrada para llevar a cabo un ciclo menstrual ovulatorio normal. Es claro que un defecto o alteración en cualquiera de estos tres elementos perturba el sistema siendo manifestado clínicamente con alteraciones menstruales (1, 2, 29, 30).

Recientemente, el hiperandrogenismo en asociación con una elevada concentración en suero de la LH o bien, directamente la observación de elementos quísticos claramente definidos en los ovarios, son los criterios de diagnóstico para el llamado Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) (1, 2, 29, 30).

Varios hallazgos han sugerido que el denominador común en mujeres con anovulación hiperandrogénica, que presenten o no el típico SOP, es un hiperandrogenismo funcional ovárico (HFO), el desorden es funcional por dos razones, la primera, porque una base anatómica no necesariamente es un requisito y segunda porque el desorden parece ser dependiente de las gonadotropinas (29). La evidencia para la génesis del SOP/HFO, se ha reconocido desde los estudios de Stein-Leventhal en el que los síntomas del SOP comienzan desde la menarca (2, 29-31), estudios realizados por Zumoff y Purcu ha estimado que la prevalencia del SOP ha sido realizada sobre criterios clínicos y endocrinológicos en poblaciones de mujeres adolescentes y adultas, por lo que la génesis del síndrome puede ocurrir antes de la pubertad (31, 32). Aunado a lo anterior se ha demostrado que las adolescentes con hiperandrogenismo tienen una pulsatilidad aumentada de LH, así como una tasa elevada del cociente LH/FSH, inmuno y bioactiva y un elevado perfil ovulatorio androgénico compatible con el aumento en la actividad de la 17α hidroxilasa (32, 33), como en mujeres con SOP (28-30). El SOP es una forma de HFO, donde la anomalía central es una elevada concentración de andrógenos intraováricos (29), la secreción de andrógenos en exceso vertidos a la circulación causa las manifestaciones pilosebáceas del síndrome (29, 34), el exceso de andrógenos locales promueve el

proceso de atresia folicular (35), en este modelo varios procesos pueden causar el exceso de andrógenos ováricos, (29,30), desórdenes de masculinización extraovárica, bloqueo esteroidogénico ovárico, estimulación excesiva de la LH y una secreción anormal de andrógenos debido a la no regulación de la esteroidogénesis (36, 37).

La LH regula la síntesis de andrógenos en las células de la teca, la FSH es responsable para regular la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa, que va a determinar la proporción de síntesis de estrógenos de los precursores androgénicos, cualquier perturbación da como resultado un desequilibrio en el cociente de LH/FSH pudiendo teóricamente resultar en la síntesis ovárica de andrógenos preferencialmente más que de estrógenos (28, 29), aunado a esto, el proceso de atresia folicular, niveles altos de LH o de la proporción LH/FSH en respuesta a GnRH o a un agonista, son característicos del SOP (I, 28-30, 37), estudios en mujeres con SOP han demostrado que tienen un aumento en la amplitud de pulsos de la LH así como en su frecuencia, el aumento en esta última implica que la frecuencia de pulsos de GnRH están aumentados (33), Lanzone, Rossmannith y colaboradores, han encontrado que existe una secreción anormal de neurotransmisores (38, 39). Respecto a los patrones de secreción de la LH, en jóvenes postmenarcas que tienen SOP presentan un patrón diurno anormal, además de que existen evidencias de un mecanismo opioidogénico en la fase folicular temprana (32,39), ver fig. (3a y 3b).

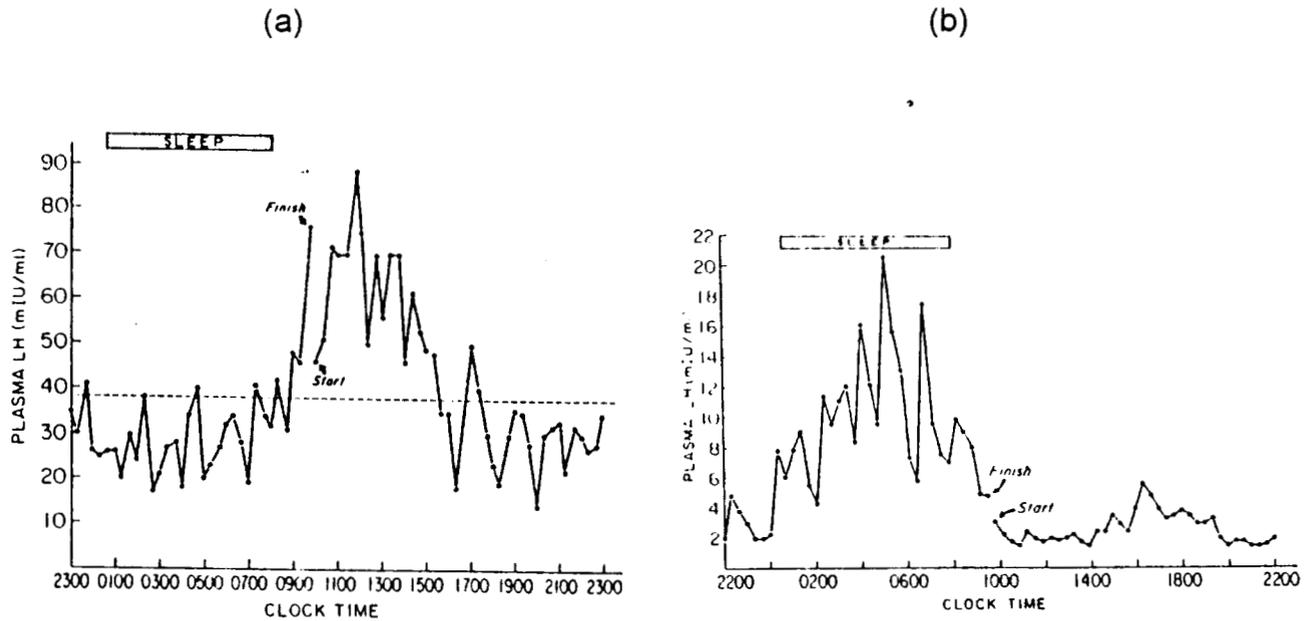


Figura 3a y 3b.

222474

En estas figuras se representan los diferentes perfiles de LH en una paciente de 13 años de edad con SOP (a), comparado al de una joven normal. (b) Notese que la secreción de LH está en cotérmino con el periodo nocturno de sueño, a diferencia de la secreción de LH desincronizada del período de sueño y el desplazamiento de siete u ocho horas después durante el transcurso del día, en la paciente con SOP.

(Zumoff y cols., 1983)

A la fecha se han propuesto diferentes hipótesis (40) y soluciones (41) relativas al SOP sin que aún nadie lo pueda definir y delimitar. Este proyecto de Tesis intenta dar un punto más en el esclarecimiento del SOP y de su posible origen hormonal por medio de la caracterización de las isoformas de LH.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La investigación básica ha demostrado que existen isoformas moleculares de la LH, habiéndose encontrado que poseen diferentes actividades inmunológicas y biológicas entre si y su aparición varía durante el transcurso de la vida y en función de los diferentes estados endocrinos normales y patológicos: Así mismo el SOP es una enfermedad cuya etiología aun no se conoce totalmente y es en parte, una serie de eventos cuyos ciclos de causa-efecto involucran varios desórdenes endocrinos, en los que participan las gonadotropinas en donde la LH tiene un papel preponderante, sin embargo no se ha investigado si en las pacientes con SOP existen alteraciones en las proporciones séricas fisiológicas de las isoformas de la LH.

JUSTIFICACION

En virtud de que las pacientes con SOP presentan alteraciones endocrinas que cursan, por lo general con amenorrea u oligomenorrea, elevadas concentraciones de la LH y bajas de la FSH, con normo o hiperprolactinemia e hirsutismo en diferentes grados y por el hecho de que existen patrones distintos de las isoformas de la LH en diversos estados patológicos con respecto a las mujeres de la población normal, es importante investigar la existencia y el papel que tienen estas isoformas en la fisiopatogenia del SOP, dado que la LH es un factor relevante en la presentación de este síndrome.

Ulloa-Aguirre y colaboradores (42) han estudiado las isoformas de FSH en diferentes especies, así como sus características biológicas en los diversos eventos reproductivos; otros grupos de trabajo (8, 13, 43, 44-46) han analizado las isoformas de ambas gonadotropinas, sin embargo a la fecha se conoce relativamente poco de las isoformas de la LH en estados patológicos y mucho menos en el desencadenamiento del SOP, el cual en nuestro país tiene una elevada incidencia.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y determinar los patrones de las isoformas moleculares de LH séricas de pacientes con SOP, comparándolas con el grupo control.

HIPOTESIS

En mujeres en edad reproductiva con SOP existen proporciones de isoformas moleculares de la Hormona Luteinizante circulante que son cuantitativa y cualitativamente diferentes a las de mujeres voluntarias sanas (grupo control).

PACIENTES

Se estudiarán 6 pacientes con SOP diagnosticado clínica y ultrasonográficamente por el Servicio de Ginecología Endocrina del Hospital de Ginecoobstetricia "Luis Castelazo Ayala". El grupo control estará representado por 6 mujeres voluntarias sanas.

CRITERIOS PARA LA SELECCION DEL GRUPO DE ESTUDIO

CRITERIOS DE INCLUSION

A las mujeres en edad reproductiva (de 20 a 35 años) que presenten trastornos menstruales; tipo opsomenorrea (ciclos menstruales mayores de 35 días) ó amenorrea (ausencia de menstruación por más de 90 días), hirsutismo clasificado de acuerdo a la escala de Moncada-Lorenzo modificada (34), así como un diagnóstico ultrasonográfico (ecografía abdominal) en el que se toma como parámetro positivo el hallazgo de más de 4 zonas ecolúcidas bilaterales de hasta 5 mm de diámetro en la superficie ovárica.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

Otras patologías (trastornos suprarrenales, tiroideos, neoplasias secretoras de andrógenos e hiperprolactinemia), embarazo y el uso de medicamentos que afecten la liberación de gonadotropinas durante el mes previo al estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Pacientes que no acepten continuar con el estudio o si en el transcurso del estudio se presenta cualquier patología agregada al SOP.

Los datos obtenidos al interrogatorio y a la exploración física serán concentrados en una hoja de captación de datos (anexo 1). Todas las pacientes serán informadas de lo que se va a realizar durante el estudio y deberán firmar la hoja de consentimiento informado para su inclusión en el protocolo (anexo 2).

CRITERIOS PARA LA SELECCION DEL GRUPO CONTROL

CRITERIOS DE INCLUSION

El grupo control estará representado por 6 mujeres voluntarias sanas en edades similares a las pacientes con SOP, con ciclos menstruales regulares.

CRITERIOS DE NO INCLUSION

La presencia de endocrinopatías, embarazo, el uso de medicamentos que afecten la liberación de gonadotropinas.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Las voluntarias que no acepten continuar con el estudio o por la aparición de una enfermedad intercurrente.

METODOLOGIA

-Selección de pacientes con SOP

mujeres normales

SUERO/RIA

-Separación de isoformas

FILTRACION EN
GEL

CROMATOENFOQUE/RIA
hLH

DIALISIS

LIOFILIZACION

Bioensayos en CL ——— RIA testosterona

-Evaluación de la actividad biológica de cada isoforma

METODOLOGIA

A las pacientes seleccionadas con SOP en la fase folicular temprana (días 3-5) de un ciclo menstrual espontáneo o después de un sangrado genital inducido con Clormadinona (2 mg/día durante 5 días) y a las voluntarias en la fase media del ciclo, se les tomó en ayuno, 3 muestras de sangre venosa de 10 - 15 ml a intervalos de 30 min (0, 30, 60), las muestras fueron centrifugadas, los sueros obtenidos se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta ser procesados. A los sueros obtenidos se les determinaron LH y FSH por radioinmunoanálisis (RIA). Las isoformas de la LH, fueron separadas por cromatoenfoco para cada una de las muestras, de acuerdo a las metodologías descritas por Grotjan y colaboradores (22, 23, 25, 46-48), de acuerdo al siguiente protocolo.

CROMATOENFOQUE (separación de las isoformas de la LH)

Primero: se llevó a cabo la filtración en gel preparativa en Sephadex G-25 superfino, empacándose en una minicolumna (1.5x2 cm), a la cual se le determinó el volumen vacío (excluido) con una solución de azul dextrán disuelto en el mismo amortiguador de corrimiento (PB 74 Pharmacia). La muestra se reconstituyó en amortiguador de inicio o de corrimiento según las condiciones óptimas para la muestra y fue eluida con el mismo amortiguador, la fracción obtenida se adicionó en la parte superior de la columna ver (anexo 3, para mayor información). En breve, se montaron 3 sistemas para formar gradientes de pH.

SISTEMA I GRADIENTE DE pH DE 7 A 4

resina	amortiguador de equilibrio	amortiguador de elución
PBE 94	Imidazol 0.025 mM, pH de 7.4	PB 74, 1:8, pH de 3.5

SISTEMA II GRADIENTE DE pH DE 8 A 6

resina	amortiguador de equilibrio	amortiguador de elución
PBE 94	Tris 0.025 mM, pH de 8.5	PB 96, 1:13, pH de 6.5

SISTEMA III GRADIENTE DE pH DE 11 A 7

resina	amortiguador de equilibrio	amortiguador de elución
PBE 118	Trietilamina 0.025 mM, pH de 11	Pharmalyte 10.5 a 8 1:45, pH de 6.5

NOTA: todos los amortiguadores y las resinas fueron desgasificados antes de usarse.

Cuando la columna alcanzó el pH de equilibrio, se adicionó la muestra en la parte superior de la columna y posteriormente se adicionó el amortiguador de elución. Se colectaron fracciones de 2 ml a una velocidad de flujo de 1 gota cada 12 segundos, a los tubos de colecta se les adicionaron previamente 100 ul de una solución de Albúmina Sérica Bovina al 0.01%. A las fracciones obtenidas se les midió el pH y cuando éstas alcanzaron el pH del amortiguador de elución, se le adicionó a la columna una solución de NaCl 1 M, suficiente para colectar 15 fracciones más. Las fracciones se almacenaron en congelación hasta el día en que se determinó el contenido de la LH inmunoreactiva (Cis BioLab y por RIA, estuche proporcionado por los Institutos Nacionales de Salud USA; hLH -I- SIAPF, Anti-hLH-2 Antisera y hFSH/LH RP, LER 907) en cada fracción.

En función a la determinación de la LH inmunoreactiva, los cromatoenfoques se dividieron en áreas según las regiones obtenidas, se mezclaron las fracciones correspondientes a las diferentes isoformas y se dializaron contra agua destilada en una cámara de microdiálisis (Amicon) durante toda la noche a una velocidad de flujo de 1 gota cada 8 segundos para eliminar el poliamortiguador y/o el Pharmalyte de los cromatoenfoques, las mezclas

posteriormente se liofilizaron y se resuspendieron en agua bidestilada y desionizada para evaluar la actividad biológica de cada isoforma.

EVALUACION BIOLOGICA

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar normales adultas, provenientes del bioterio de la UAM-I, Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, extirpándose los testículos por vía abdominal, los cuales se colocaron en solución salina (0.9%), para lavarlos, posteriormente se descapsularon eliminándose la vena central, colocándose en solución de KREBS (NaCl 125mM, KCl 5mM, MgSO₄ 1mM, Tris 35mM, NaH₂PO₄ 1mM, pH 7.4, glucosa al 2%, gentamicina al 0.05%), a cada par de testículos se les adicionó 7 ml de KRBG+colagenasa 1 mg/ml e incubándose a 37°C durante 18 min, se suspendió la digestión al adicionar 15 ml de sol. salina, agitándose y dejándose reposar durante 10 min, la suspensión se filtró y la fracción intersticial cruda se centrifugó a 1500 g durante 10 min a 5°C, el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de KRBG, que se adicionó sobre 8 ml de una solución KRBG-albúmina (ficoll 400 al 13% y Albúmina al 0.2%, pH 6.5), centrifugándose a 1000 g durante 15 min a 5°C, el botón obtenido se resuspendió en 2 ml de KRBG, realizándose el conteo celular en una cámara de New Bauer ajustándose la densidad celular a 3×10^5 cel/ml sembrándose 200 000 cel/tubo (49,50). Las células fueron estimuladas con las diferentes mezclas de isoformas, utilizando la LH humana (hFSH/LH, LER 907, muestra 433, con una potencia biológica de 1 mg de LER 907 equivalente a 277 UI de la LH en términos del 2nd IRP-HMG), como referencia e incubándose por 3 hrs a 37°C, posteriormente las células y el medio se congelaron hasta el día que se determinó la testosterona por RIA.

La evaluación estadística comprendió un análisis de varianza no paramétrico ($n > 3$), así como la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis

para la distribución normal de grupos y el análisis entre grupos comparando con el control. El análisis de regresión se utilizó para determinar el grado de correlación entre la cantidad de las isoformas de la LH recobrada dentro de un rango específico de pH de cada grupo (51, 52).

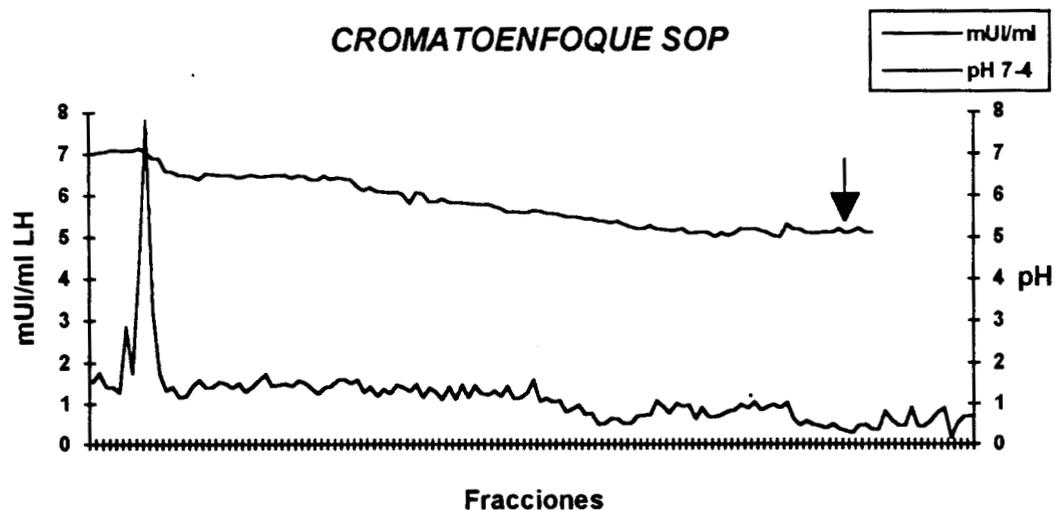
RESULTADOS

CROMATOENFOQUES

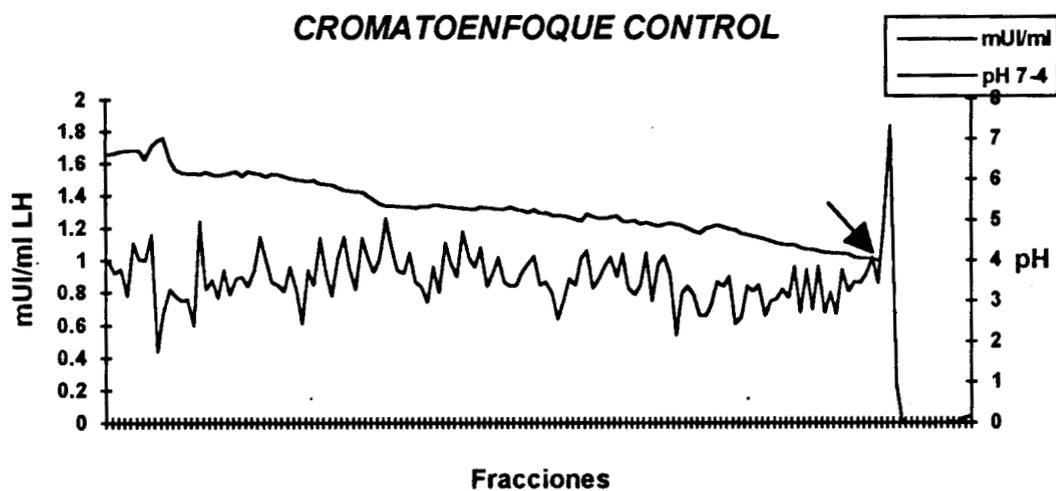
SISTEMA I

Este sistema genera un gradiente de pH de 7 a 4 con variaciones de 0.1 de pH por fracción de 2 ml, lo que permite separar las isoformas de la LH en función de su pl.

222474



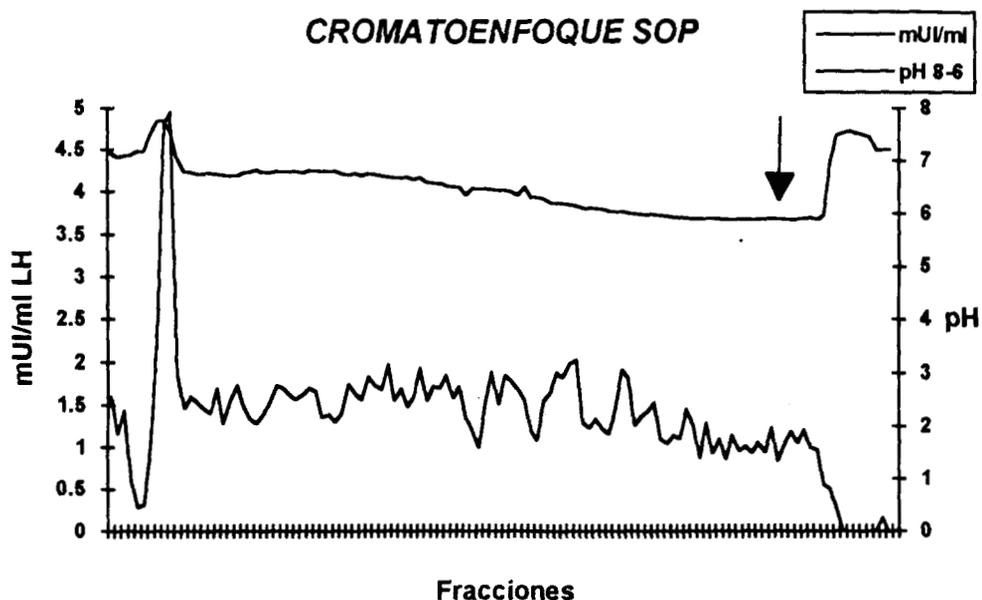
Gráfica 1. Cromatoenfoque de LH sérica de una mujer con SOP en fase folicular temprana, en este se observa un pico y un hombro de LH al principio del gradiente de pH, con un consecuente barrido restante, la máxima concentración de LH fue de 8 mUI/ml no se revela nada después de la adición del NaCl.



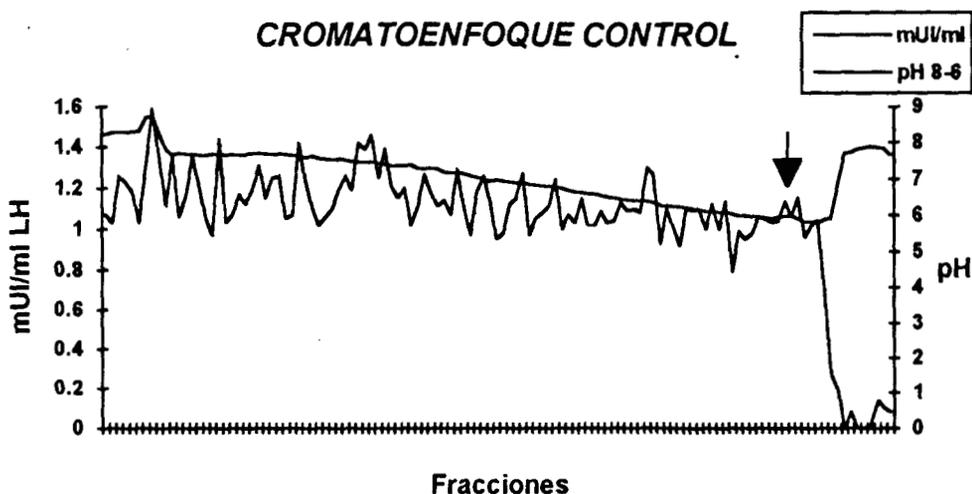
Gráfica 2. Cromatoenfoque de LH sérica de una mujer del grupo control, se observa que existe un patrón en el gradiente de pH, observándose zonas de las diferentes formas de LH, después de la adición del NaCl se revela un pico de LH. Hay que notar que la máxima concentración de LH es menor de 2 mUI/ml.

SISTEMA II

Este sistema genera un gradiente de pH de 8 a 6 con variaciones de 0.1 de pH por fracción de 2 ml, lo que permite separar las isoformas de la LH en función de su pI.



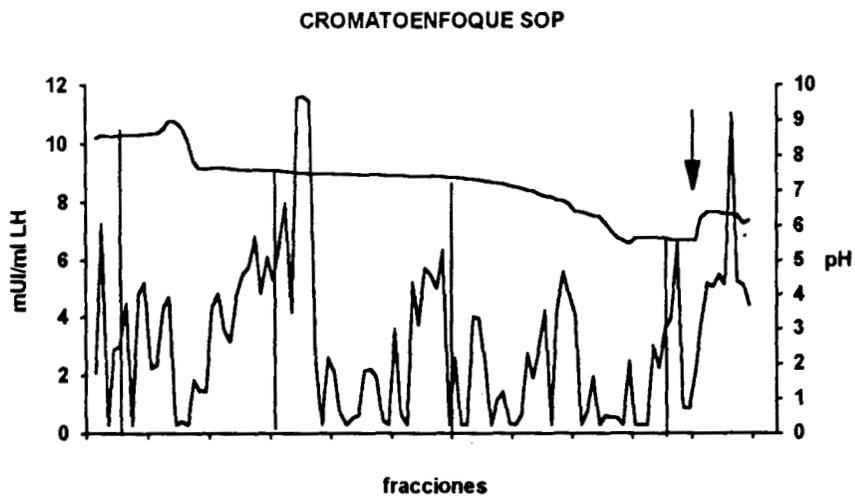
Gráfica 3. En este cromatoenfoco se observa que existe un gran pico de LH inmunoreactiva al inicio del gradiente de pH, en el que la concentración máxima de LH es cercana a 5 mUI/ml, observándose además que la mayoría de las fracciones tienen entre 2 y 1 mUI/ml.



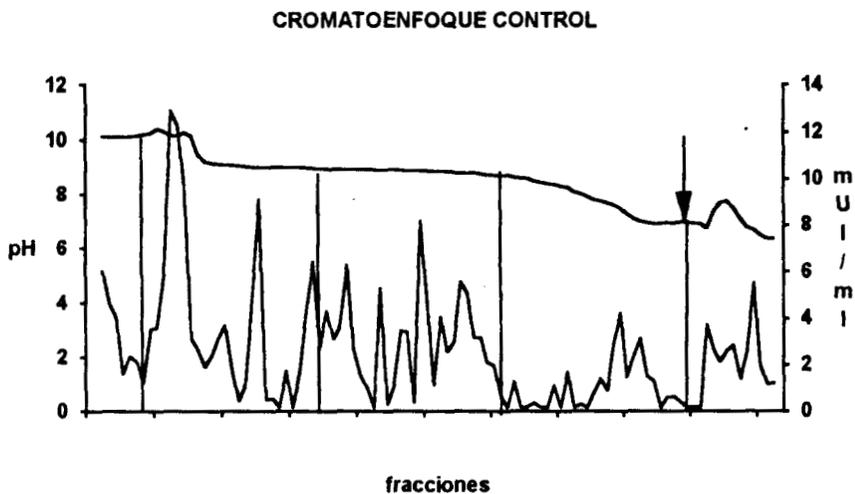
Gráfica 4. En este cromatoenfoco la LH inmunoreactiva revela una serie de picos no muy bien definidos, que fluctúan entre 1 y 1.5 mUI/ml durante todo el cromatoenfoco, no se revela LH inmunoreactiva después de que se adicionó el NaCl.

SISTEMA III

En este sistema genera un gradiente de pH de 11 a 7 con variaciones de 0.1 de pH por fracción de 2 ml, lo que permite separar las isoformas de la LH en función de su pI.

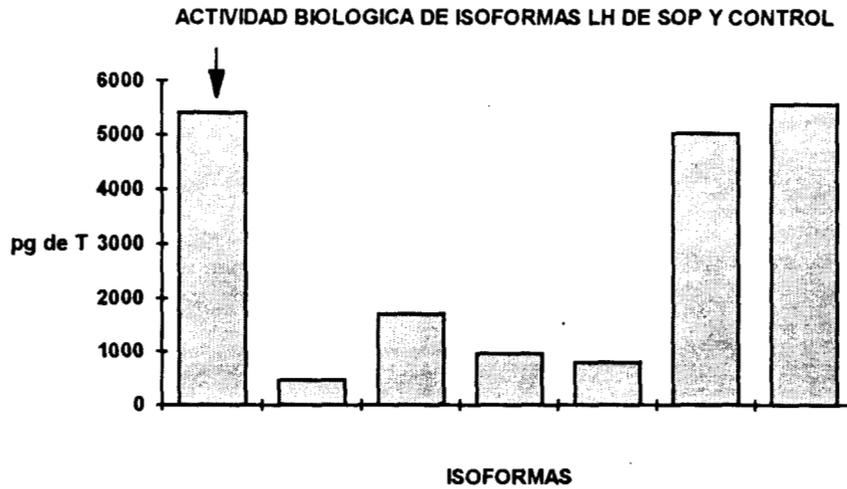


Gráfica 5. En este cromatoenfoco se observa que existen una serie de picos de LH inmunoreactiva desde el inicio del gradiente de pH, hasta el final de este, la concentración máxima de LH es de aproximadamente 12 mUI/ml, se observa además la presencia de un pico muy representativo, después de que se adicionó la solución salina.



Gráfica 6. En este cromatoenfoco se observa que existen una serie de picos de LH inmunoreactiva desde el inicio del gradiente de pH, hasta el final de este, la concentración máxima de LH es se presenta al inicio del gradiente, aprox, 12 mUI/ml, se observa además, que la mayoría de las fracciones tienen entre 8 y 1 mUI/ml de LH.

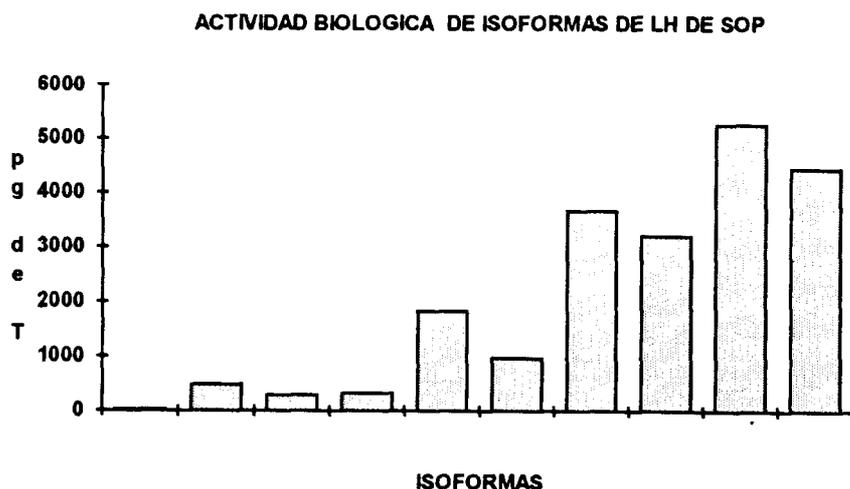
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA
SISTEMA I
GRADIENTE DE pH DE 7 A 4.



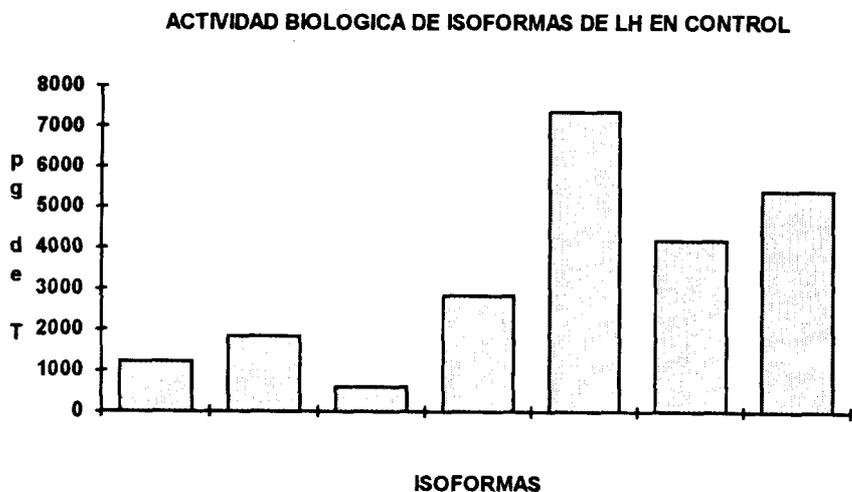
Gráfica 7. Se observa una sola forma de LH de una paciente con SOP (flecha), y 6 isoformas de una mujer del grupo control, donde 2 de las formas más ácidas (incluyendo la que contiene el pico de sal) presentan mayor actividad biológica, con una producción entre 5000 y 6000 pg de T.

SISTEMA II

GRADIENTE DE pH DE 8 A 6.



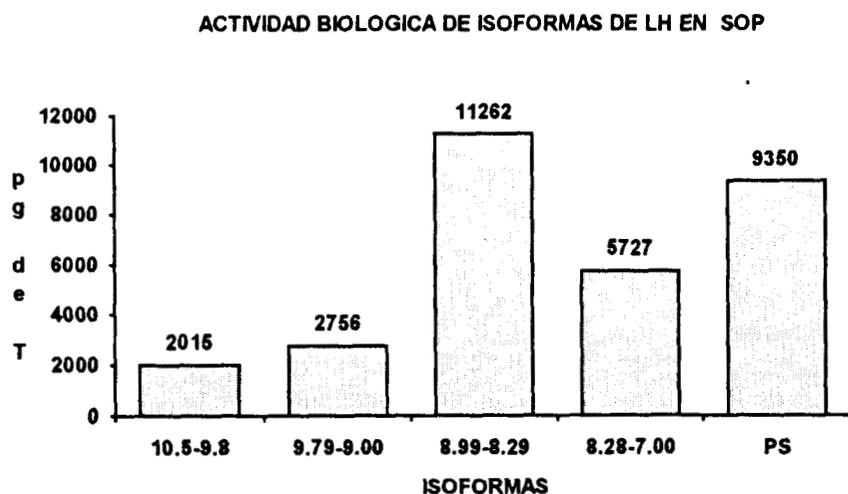
Gráfica 8. En esta se observan 10 isoformas, las más ácidas tienen mayor actividad biológica, junto con la que contiene el pico de sal, con una producción entre 3200 a 5500 pg de T entre estas.



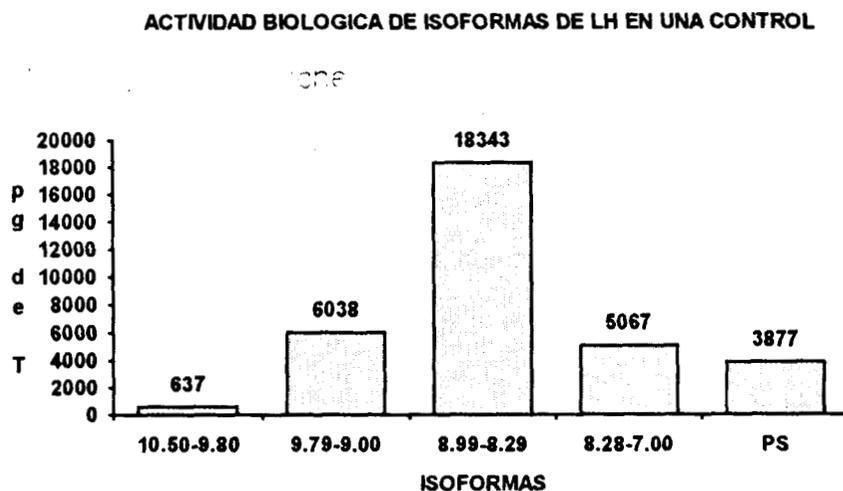
Gráfica 9. En esta se observan 6 isoformas, las que presentaron mayor actividad biológica fueron las más ácidas, con un rango de producción entre 2700 a 7300 pg de T, incluyendo la que contiene el pico de sal.

SISTEMA III

GRADIENTE DE pH DE 11 A 7.



Gráfica 10. En esta se observan 5 límites de posibles isoformas, la mayor actividad biológica se presenta en las isoformas que se encuentran en los rangos de pH: 10.50-9.80, 8.99-8.29, 8.28-7.00 y en el pico de sal (PS) con una producción de 11262 a 5727 pg de T.



Gráfica 11. En esta se observan 5 límites de posibles isoformas, la mayor actividad biológica se presenta en el rango de pH de 8.99-8.29, con una producción de 18343 pg de T.

RECONOCIMIENTO INMUNOLOGICO DE LAS ISOFORMAS DE LA LH EN GRADIENTES DE pH DE 11 A 7.

LIMITE	RANGO DE pH	SOP	CONTROL
		%	%
1	10.50 - 9.80	23	14.58
2	9.79 - 9.00	19.94	18.55
3	8.99 - 8.29	31.25	31.76
4	8.28 - 7.00	13.90	23.44
PS	< 6.99	11.90	11.65

Tabla 1. En esta tabla observamos que la actividad inmunológica del limite 1 en SOP es mayor que en el grupo control, los limites 2 y 3 presentan actividades inmunológicas similares, el SOP en el limite 4 tiene menor actividad que el grupo control y finalmente en el PS ambos presentan la misma actividad.

ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS ISOFORMAS DE LA LH EN GRADIENTES DE pH DE 11 A 7.

LIMITE	RANGO DE pH	SOP	CONTROL
		%	%
1	10.50 - 9.80	7.11	5.98
2	9.79 - 9.00	11.71	18.83
3	8.99 - 8.29	38.48	42.85
4	8.28 - 7.00	18.25	23.30
PS	< 6.99	24.42	9.01

Tabla 3. En esta tabla observamos que la actividad biológica del limite 1 en SOP es mayor que en el grupo control, para el limite 2 es menor, el limite 3 presenta actividades biológica similar, en el SOP el limite 4 tiene menor actividad que el grupo control y finalmente en el PS el SOP presenta más del doble de la actividad biológica.

DISCUSION

Se realizaron cromatofocos en diferentes gradientes de pH (SISTEMA I, SISTEMA II Y SISTEMA III).

Empezamos trabajando con gradientes de pH de 7 a 4 (SISTEMA I), este gradiente no fue el adecuado para que se alcanzaran a observar las isoformas de la LH, por lo que se adecuó la metodología para realizar gradientes de pH de 8 a 6 (SISTEMA II), sin embargo en éste tampoco se alcanzaron a observar las isoformas de las pacientes con SOP y si las isoformas del grupo control, por lo que se realizaron gradientes de pH aun más alcalinos (SISTEMA III).

SISTEMA III

222474

Se formaron gradientes de pH de 11 a 7, estudios realizados por Grotjan y colaboradores han reportado la presencia de isoformas de la LH en bovinos y en ovinos en este rango de pH (19, 23, 48), cabe destacar que en este rango de pH no existen reportes en la bibliografía que describan el aislamiento de isoformas de la LH en Humanos, sólo Huhtaniemi ha reportado la presencia de isoformas de la LH en el rango de pH de 9 a 7.

Se observó que el comportamiento de las isoformas de las pacientes con SOP al igual que las isoformas de las voluntarias del grupo control en este tipo de gradientes se alcanzaron a separar de manera adecuada, se realizan 6 cromatofocos para el grupo de estudio y 6 para el grupo control, se muestran dos, (ver resultados: gráfica 5 y 6). formandose 5 limites de pH, de la siguiente forma: 1 de 10.50 a 9.80, 2 de 9.79 a 9.00, 3 de 8.99 a 8.29, 4 de 8.28 a 7.00 unidades de pH, por último el que contiene el pico de sal (PS). El reconocimiento inmunológico en el limite 1 fue mayor para las pacientes con SOP con 23 %, a diferencia del grupo control que presentó un 14.58 %, con lo que respecta a el limite 2 este reconocimiento fue casi lo mismo para ambos grupos, 19.94 y 18.55, respectivamente, presentandose de manera análoga al limite 3 (31.25 y 31.76), respecto al limite 4 fue menor en las pacientes con SOP en las del grupo control (13.90 y 23.44, respectivamente) y en el PS el reconocimiento inmunológico fue similar para cada grupo (11.90 y 11.65). Resumiendo, en el limite 1 las pacientes con SOP tienen una mayor reconocimiento inmunológico, hay que notar que éste limite de pH es el más alcalino, de 10.50 a 9.80 unidades de pH y en el limite 4 es inverso, presentándose mayor reconocimiento

inmunológico en el grupo control, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Huhtaniemi, a pesar de que él utilizó gradientes de pH de 9 a 7.

BIOENSAYOS EN CELULAS DE LEYDIG DE LAS ISOFORMAS:

Los resultados obtenidos demuestran la presencia de actividad biológica de las isoformas de la LH en la región más alcalina (límite 1) en el SOP, la actividad biológica fue mayor en las isoformas provenientes de pacientes con SOP, indicando que ésta se relaciona con la alcalinidad y no con la cantidad presente o reconocida radioinmunológicamente de las isoformas pertenecientes al grupo control, las cuales presentan menor actividad biológica, respecto al límite 2 las isoformas del grupo control presentan mayor actividad biológica 18.83 % a 11.71%, al igual que en los límites 3 y 4, sin embargo en el PS las isoformas que presentan mayor actividad biológica son las de los pacientes con SOP con un 24.42% a siendo el grupo control de un 9.01%, sin embargo, el reconocimiento inmunológico fue el mismo, por lo que las isoformas que se encuentran en el PS de las pacientes con SOP fueron biológicamente más activas.

CONCLUSIONES

Las gonadotropinas LH y FSH son una familia de glicoproteínas muy cercana, en cuanto a estructura se refiere que en las diferentes especies de mamíferos estas gonadotropinas muestran un alto grado de conservación en la secuencia de sus aa, ambas no están representadas por estructuras moleculares uniformes (4, 5, 7, 11, 13), sino por un arreglo de isoformas que son reguladas hormonalmente (4), estando formadas por dos heterodímeros llamados α y β , estos heterodímeros de cada hormona contienen uno o dos oligosacáridos heterogéneos unidos a asparagina con diferentes grados de sulfatación y cantidad de ácido siálico. Este amplio espectro en la glicosilación, contenido de ácido siálico y sulfatación constituyen las bases químicas para la formación de las isoformas y la gran heterogeneidad de carga observada en estas hormonas (14, 16, 17, 18). Concluyo que con estos resultados la LH en el SOP se encuentra en límites de pH entre 11 a 7, aumentando casi linealmente su actividad biológica conforme el pH va aumentando, y siendo el reconocimiento inmunológico mayor en la región más alcalina.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1.-Williams Textbook of Endocrinology, Edited by Jean D. Wilson and Daniel W. Foster, 8th Edition, W. B. Saunders Co. 1992.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1.- Kalra, SP, Kalra PS, Regulation of Gonadotropins Secretion, Emerging new Concepts In: The Pituitary Gland, Editor Hiro Imura, Comprehensive Endocrinology, 1994, Raven Press, New York.
- 2.- Apter, D, Butzow T, Laughlin GA, Yen SCC. 1995, Metabolic Features of Polycystic Ovary Syndrome are Found in Adolescent Girls with Hyperandrogenism, J Clin Endocr Metab, 80(10):2966-2973.
- 3.- Knobil, E. 1980, The Neuroendocrine control of the menstrual cycle, Recent Prog Horm Res, 36:53-88.
- 4.- Mercer, JE, Chin WW. 1995, Regulation of Pituitary Gonadotrophin Gene Expression, Human Reprod UpDate 1(14):363-384.
- 5.- Pierce, JG, Parsons FT. 1981, Glycoproteins Hormones: structure and function. Ann Rev Biochem, 50:465-495.
- 6.- Patel, DJ. 1994, A Clapsed Embrace: Glycoprotein Hormones, Nature, 369:483-439.
- 7.- Ryan, RJ, Charlesworth MC, Mc Cormick DJ, Milius RP, Keutman HT. 1988, The Glycoprotein Hormones: recent studies of structure-function relationships. FASEB J, 2:2661-2669.
- 8.- Ryan, RJ, Keutman HT, Mc Cormick DJ, Charlesworth MC, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T. 1987, Structure-Function relationships of gonadotropins. Rec Prog Horm Res, 383-429.
- 9.- Rademacher, TW, Parekh RB, Dwek RA. 1988, Glycobiology, Ann Rev Biochem, 57:785-838.
- 10.- Reddy, PV, Menom KM. 1981, Existence of Multiple Molecular Forms of Luteinizing Hormone in Rat different in Immunological and Biological Activities between stored and Circulating forms, Acta Endocrinologica, 97:33-41.
- 11.- Nagaya, T, Jameson JL, Structural Features of the Glycoprotein Hormone Genes and their Encoded Proteins In: The Pituitary Gland, Editor Hiro Imura, Comprehensive Endocrinology, 1994, Raven Press, New York.
- 12.-Farnworth, PG. 1995, Gonadotrophin Secretion Revisited. How many ways can leave a gonadotroph, J Endocrinol, 145:387-395.
- 13.- Gray, CJ. 1988, Glycoprotein Gonadotropins: structure and function. Acta Endocrinol, 288:20-27.

- 14.- Baezinger, JU. 1988, Structure synthesis and function of the pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides. *J Cell Biochem*, 287:1123-1134.
- 15.- Veerasingham, PB, Katlic AW. 1979, The Interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins: the role of sialic acid. *J Biol Chem*, 10:4000-4008.
- 16.- Baezinger, JU, Green ED. 1988, Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the Asn-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem Biophys Acta*, 947:287-306.
- 17.- Kornfeld, R, Kornfeld S. 1985, Assembly of Asparagina-linked Oligosaccharides, *Ann Rev Biochem*, 54:631-664.
- 18.- Baezinger, JU, In; Chin, WW, Boimel, 1990, Glycoprotein Hormones, Structure, Synthesis and Biological Function, United Press, Serono Symposia, Norwell Massachusetts USA.
- 19.- Stumpf, TT, Wolfe MW, Robertson MS, Caddy G, Rittok RJ, Schanbacher BD, Grotjan HE, Kinder JE. 1992. Bovine Luteinizing Hormone (LH) Isoforms and Amount of Messenger Ribonucleic Acid for Alpha- and LH Beta- Subunits in Pituitaries of Cows Immunized against LH - Releasing Hormone, *Biol Reprod*, 47:776-781.
- 20.- Robertson, DM, Foulds SM, Ellis S. 1982, Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology*, 111:385-91.
- 21.- Phillips, DJ, Wide L.1994, Serum Gonadotropins Isoforms Become More Basic After an Exogenous Challenge of Gonadotropins-Releasing Hormone in Children Udergoing Pubertal Development, *J Clin Endocr Metab*, 79:814-819.
- 22.- Keel, BA, Schanbacher BD. 1987, Charge Microheterogeneity of Ovine Follicle-Stimulating Hormone in Rams and Steroid-Treated Weathers, *Biol Reprod*, 37:386-796.
- 23.- Zalesky, DD, Nett TM, Grotjan HE. 1992, Ovine Luteinizing Hormone: Isoforms in the Pituitary During the Follicular and Luteal Phase of the Estrus Cycle and During Anestrus, *J Anim Sci*, 70:3851-3856.
- 24.- Wide, L, Naesén T. 1994, 17 β -Oestradiol Counteracts the Formation of the More Acid Isoforms of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone after Menopause, *J Clin Endocrinol*, 40:783-789.
- 25.- Keel, BA, Schanbacher BD, Grotjan HE.1987, Ovine Luteinizing Hormone. II Effects of Castration And Steroid Administration on the Levels of Un convined Subunits within the Pituitary, *Biol Reprod*, 36:1114-1124.
- 26.- Keel, BA, Schanbacher BD, Grotjan HE.1987, Ovine Luteinizing Hormone. I Effects of Castration And Steroid Administration on the Charge Heterogeneity of Pituitary Luteinizing Hormone, *Biol Reprod*, 36:1102-1113.

- 27.- Mitchell, R, Bauerfeld S, Chaefer F, Sharer K, Robertson WR. 1994, Less Acid Forms of Luteinizing Hormone are Associated with lower Testosterone Secretion in Men on Haemodialysis Treatment, *J Clin Endocrinol*, 41:65-73.
- 28.- Yen, SSC. 1980, The Polycystic Ovary Syndrome, *Clin Endocrinol*, 12:177-208.
- 29.- Herman, DA, Barnes RB, Rosenfield RL. 1995, Polycystic Ovary Syndrome as a Form of Functional Ovarian Hyperandrogenism Due to Dysregulation of Androgen Secretion, *Endocrine Rev*, 16(3):322-353.
- 30.- Heineman, MJ, Thomas CMG, Doesburg WH, Rolland R. 1984, Hormonal characteristics of women with clinical features of the polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol*, 17:263-271.
- 31.- Zumoff, B, Freeman R, Coupey S, Saenger P, Markovitz M, Kream J. 1983, A Chronobiologic Abnormality in Luteinizing Hormone Secretion in Teenage Girls with the Polycystic Ovary Syndrome, *New England J Medicine*, 309(20):1206-1209.
- 32.- Purcu, E, Venturoli S, Magrini O, Gabbi D, Paradisi R, Fabbri R, Flamigni C. 1987, Circadian Variations of Luteinizing Hormone can have Two Different Profiles in Adolescent Anovulation, *J Clin Endocr Metab*, 65(3):488-492.
- 33.- Lobo, RA, Kletschy OA, Campeau DJ, DiZerga GS. 1983, Elevated Bioactive Luteinizing Hormone in Women with Polycystic Ovarian Syndrome, *Fertil Steril*, 39(5):674-678.
- 34.- Moncada-Lorenzo, E. 1970, Familial study of hirsutism, *J Clin Endocr* 31:556-564.
- 35.- Hsueh, AJW, Billig H, Tsafari A. 1994, Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process, *Endocrine Rev*, 15(6):707-724.
- 36.- Richards, SJ. 1994, Hormonal Control of Gene Expression in the Ovary, *Endocrine Rev*, 15(6):725-751.
- 37.- Gougeon, A. 1996, Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypothesis, *Endocrine Rev*, 17(2):121-155.
- 38.- Lanzone, A, Fulghesu AM, Cucinelli F, Ciampelli M, Caruso A, Mancuso S. 1995, Evidence of a Distinct Derangement of Opioid Tone in Hyperinsulinemic Patients with Polycystic Ovarian Syndrome: Relationship with Insulin and Luteinizing Hormone Secretion, *J Clin Endocr Metab*, 80(12):3501-3506.
- 39.- Rossmannith, WG, Yen SSC. 1987, Sleep-Associated Decrease in Luteinizing Hormone Pulse Frequency During the Early Follicular Phase of the Menstrual Cycle: Evidence for an Opioidergic Mechanism, *J Clin Endocr Metab*, 65(4):715-718.
- 40.- Rosenfield, RL, Barnes L, Cara JF, Lucky AW. 1990, Dysregulation of Cytocrome P450c17 α as the Cause of Polycystic Ovarian Syndrome, *Fertil Steril*, 53(5):785-791.
- 41.- Jaatinen, T-A, Anttila L, Erkkola R, Koskinen P, Laippala P, Ruutiainen K, Scheinin M, Irjala K. 1993, Hormonal Responses to Physical Exercise in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome, *Fertil Steril*, 60(2):262-267.

- 42.-Ulloa-Aguirre, A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. 1995, Follicle-Stimulating Isohormones: Characterization and Physiological Relevance, *Endocrine Reviews*, 16(6):765-787.
- 43.- Wide, L. 1985, Median Charge Heterogeneity of Human Pituitary FSH, LH and TSH I. Zone Electrophoresis in Agarose Suspension, *Acta Endocrinologica*, 109:181-189.
- 44.- Wide, L. 1985, Median Charge Heterogeneity of Human Pituitary FSH, LH and TSH II. Relationship to Sex and Age, *Acta Endocrinologica*, 109:190-
- 45.- Chappel SC.1995, Heterogeneity of Follicle Stimulating Hormone: Control and Physiological Function, *Human Reproduction Update*, 1(5):479-487.
- 46.- Zalesky, DD, Grotjan HE. 1991, Comparasion of the Intracelular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone, *Biol Reprod* 44:1016-1024.
- 47.- Keel, BA, Harms RL, Grotjan HE. 1991, Characterization of the Acid Forms of Ovine Pituitary Luteinizing Hormone, *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 123:563-570.
- 48.- Keel, BA, Schanbacher BD, Grotjan HE. 1987, Ovine Luteinizing Hormone. III Relationship Between the Charge Heterogeneity of Partially Purified Subunits in the Native Hormone, *Biol Reprod*, 36:1125-1133.
- 49.- Grotjan, HE, Steinberg E. 1978, On the Relative Biological and Immunoreactive Potencies of Luteinizing Hormone in the Oestradiol Benzoate-Treated Male Rat, *Acta Endocrinologica*, 89:538-550.
- 50.- Bermúdez, JA, Mendieta E, Herrera J. 1988, Evaluación de los Métodos de Aislamiento y Purificación de Celulas de Leydig y de Sertoli. *Arch Inv Med*, 19:291.
- 51.- Canavos, GC, Probabilidad y estadística, aplicaciones y métodos, trad, McGraw-Hill, 1988, México.
- 52.- NOPANDEV, Facultad de Psicología, UNAM, 1989.

ANEXO 1

**SECCION DE GINECOLOGIA ENDOCRINA
HOJA DE CAPTACION DE DATOS PARA PROTOCOLO
PAC. No _____**

I. DATOS GENERALES

Nombre: _____ Cédula: _____ E
dad: _____ Edo. Civil: _____ Domicilio: _____
Tel: _____ Fecha de Ingreso: _____

II. MOTIVOS DE LA CONSULTA

1) Esterilidad: a) Primaria _____ b) Secundaria _____ 2) Hirsutismo _____
3) Obesidad _____ 4) Acné _____ 5) Transtornos Menstruales a) Tipo _____
6) Amenorrea: a) Primaria _____ b) Secundaria _____ 7) Galactorrea _____
Mastalgia _____
9) Dismenorrea _____ 10) Otros _____ 11) Tiempo de Evolución _____

III. ANTECEDENTES

Heredo-Familiares:

12) Diabéticos _____ 13) Hipertensivos _____ 14) Cáncer _____
15) Otros _____

Personales Patológicos:

16) Diabetes _____ 17) Hipertensión _____
18) Tiroideos _____ 19) Enfermedades de Transmisión Sexual _____
20) Hepatitis _____ 21) Cirugías _____
22) Otros _____

Gineco-Obstétricos:

23) Menarquía _____ 24) Telarca _____ 25) Pubarca _____
26) Ritmo Menstrual _____/_____ a) regular _____ b) irregular _____ c) cortos _____
d) largos _____ 27) Sangrado: a) normal _____ b) abundante _____ c) escaso _____ 28) Ultima
Menstruación _____ 29) Dismenorrea no _____ si _____
a) premenstrual _____ b) transmenstrual _____ 30) Inicio Vida Sexual Activa _____
31) Coital _____ 32) Compañero (s) _____ Sexual (es) _____ a) Edad _____)
Circuncidado _____ 33) Embarazos _____ 34) Partos: a) Término _____ b)
Pretérmino _____ 35) Abortos _____ 36) Cesáreas _____ a)
Causas _____ b) Fechas _____
37) Hijos: Vivos _____ 38) Mortinatos _____ 39) Lactancia _____ a) si _____ b)
no _____ c) duración _____ 40) Anticoncepción: a) si _____ b) no _____
c) duración _____ 41) Tratamientos hormonales a) no _____ b) si _____ c) tipo _____
d) duración _____ e) fecha _____ f) último tratamiento _____
42) Cirugías Ginecológicas a) no _____ b) si _____ c) tipo _____
43) Legrados _____ 44) Secreción Mamaria a) no _____ b) si _____ c) serosa _____ d)
lactea _____
tiempo de evolución _____ 45) Acné a) no _____ b) si _____ c) tratamiento _____
46) Observaciones _____

IV. EXPLORACION FISICA

- 1) peso _____ kg 2) talla _____ 3)IMC _____ kg/m² 4) Cintura _____ cm
 5) Cadera _____ cm 6) ICC _____
 7) Acné a) no _____ b) leve _____ c) moderado _____ d) severo _____
 8) distribución a) facial _____ b) Tórax anterior _____ c) Torax posterior _____
 9) Hirsutismo a) puntaje _____ b) clasificación c) mínimo _____ d) leve _____
 e) moderado _____ f) severo _____ 10) Vello púbico a) ginecoide _____ b) androide _____
 11) Mamas a) Tanner _____ b) simétricas _____ c) asimétricas _____ Alteraciones especificar _____
 12) Genitales externos a) normales _____ b) anormales _____ c) especificar _____
 13) Himen a) integro _____ b) Carúnculas himeneales _____ 14) Vagina a) normal _____ b) anormal _____ c) especificar _____ d) leucorrea _____
 a) no _____ b) si _____ 15 Moco cervical a) ausente _____ b) escaso _____ c) moderado _____ d) abundante _____ f) filancia _____ cm 16) Utero a) forma _____ b) tamaño _____ c) situación _____ d) anomalias _____
 17) Ovario derecho a) normal _____ b) anormal _____ c) especificar _____
 18) Ovario izquierdo a) normal _____ b) anormal _____ c) especificar _____
 19) Otros hallazgos en la exploración _____

V. EXAMENES DE LABORATORIO

fecha	FSH	LH	E ₂	Protactina	Día del ciclo
_____	_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____	_____

Otros exámenes

fecha	Resultados
_____	_____
_____	_____
_____	_____

VI. ULTRASONIDO

fecha	Resultado
_____	_____
_____	_____
_____	_____

ANEXO 2

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

MEXICO, D. F. a de de 199

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado **"CARACTERIZACION DE LAS ISOFORMAS MOLECULARES DE LH EN PACIENTES CON SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO"**. El objetivo de este estudio es caracterizar las isoformas de LH séricas en pacientes con síndrome de ovario poliquístico.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en lo siguiente: Se realizará una toma basal y una prueba aplicando una solución fisiológica (suero), en una vena del antebrazo tomando seis muestras de sangre por venoclisis. La toma basal consiste en sacar un volumen de sangre determinado, cada 30 min. y la prueba es la aplicación intravenosa de un medicamento (hormona liberadora de gonadotropinas). Se realizará cada una en un día, al finalizar se retirará la venoclisis.

Se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados en mi participación en el estudio, que son los siguientes: La prueba no reviste complicación alguna y la cantidad de sangre extraída, no repercutirá en mi estado físico. Al aplicar el medicamento mencionado, es probable que se provoque una ovulación prematura, y en caso de no desear embarazo y tener relaciones sexuales, es recomendable que se emplee algún método anticonceptivo.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo o adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee a cerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. también se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

nombre y firma del paciente

nombre, matrícula y firma del investigador principal

testigo:

testigo:

ANEXO 3

222474

El poliamortiguador es una sustancia amortiguadora diseñada para usarse con intercambiadores de poliresina, para cromatoenfoco, el poliamortiguador es usado normalmente a una dilución final de entre 1:8, 1:13 y 1:45 (para anfolitos), el poliamortiguador esta diseñado para operar sobre intervalos máximos de 3 unidades de pH.

En el cromatoenfoco un gradiente de pH es formado al equilibrar la columna con un amortiguador de inicio a un pH alto y un eluyente con un poliamortiguador a un pH bajo, si el punto isoeléctrico de los componentes de la muestra es conocido entonces el rango de pH es elegido para que el componente de interés eluya después de aproximadamente a 1/3 ó 1/2 del gradiente de pH.

Un volumen de 20 a 30 ml de poliresina es suficiente para la separación de muestras que contienen concentraciones de 1 a 200 mg de proteína/unidad de pH en el gradiente, sin embargo la cantidad precisa de la poliresina puede depender de la resolución requerida y puede ser descubierto empíricamente, la poliresina se dispersa en un volumen pequeño del amortiguador de inicio (aprox. 50% del volumen de cama asentada), para hacer el gel

El ion intercambiador normalmente es el cloruro, aniones monovalentes pueden ser usados como intercambiadores, pero es crítico que estos aniones tengan un pKa al menos 2 unidades de pH por abajo del punto mínimo del gradiente elegido, los iones bicarbonato causan fluctuaciones en el gradiente de pH, por lo que todos los amortiguadores y el gel deben ser desgasados antes de usarse.

La columna es montada verticalmente, la manguera de salida debe de tener 50 cm aproximadamente por abajo de la parte superior de la columna, la cual debe de estar cerrada, se colocan de 2 a 3 ml de amortiguador de inicio, para adicionar el gel previamente agitado, se abre la válvula y se deja que el gel se asiente en la columna, se continua empacando a un flujo inicial de 100 cm /hr, si el intercambiador del poliamortiguador no ha sido equilibrado al empacar la columna, entonces se necesitan de 10 a 15 volúmenes de cama de columna, del amortiguador de inicio para la equilibración, la cual se debe de llevar

a cabo a una velocidad de flujo baja, la columna ha alcanzado el equilibrio cuando el pH y la conductividad del eluyente se emparejan al amortiguador de inicio, para verificar el buen empaquetamiento de la columna se recomienda hacer una solución de citocromo C de bovino de 2 a 3 mg/ml, ya que es coloreado y fuertemente alcalino (pI 10.5) siendo repelido por el gel, eluyendolo con amortiguador de inicio, se debe de observar una distribución del la solución en forma de "plato".

Para la preparación de la muestra, se pueden aplicar de 1 a 200 mg de proteína por 10 ml del volumen de cama, el volumen de la muestra no es muy importante, la composición de esta no debe de tener grandes cantidades de sales, la muestra puede ser equilibrada con amortiguador de inicio o amortiguador de corrimiento al usar la filtración en Sephadex G-25 (para desalinizar).

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 30 de julio de 1997.

Dr. José Arturo Bermúdez

M. en C. Pablo Damián Matsumura

M. en C. Joaquín Herrera Muñoz