

## Trabajos originales

Instituto Nacional de Endocrinología.  
Laboratorio de Reproducción Asistencial

### CONCENTRACIONES DE LEPTINA Y PROLACTINA BIOACTIVA E INMUNORREACTIVA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL NORMAL

Lic. Victor M. Cabrera Oliva<sup>1</sup>

#### RESUMEN

---

Se determinaron las concentraciones de leptina durante el ciclo menstrual normal de un grupo (n=19) de mujeres fértiles y las concentraciones diarias de estradiol, HL y HFS. Se precisó la actividad inmunológica de la prolactina por radioinmunoensayo (RIA) y la actividad biológica (BIO), por un bioensayo de proliferación de las células Nb2 de linfoma de rata. Se establecieron las relaciones RIA/BIO para la prolactina. Se encontró un aumento de las concentraciones de prolactina (RIA) coincidente con el pico ovulatorio de HL. Se concluyó que las concentraciones de prolactina bioactiva (BIO) fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) durante las fases periovulatoria y lútea. La correlación RIA/BIO para la prolactina osciló entre 0,8 y 2,8. Las concentraciones de leptina mostraron una gran variabilidad entre los ciclos, pero aumentaron durante la fase lútea temprana de ciclo menstrual, aunque no fueron estadísticamente significativas.

*Descriptores DeCS:* LEPTINAS; PROLACTINA; CICLO MENSTRUAL; RADIOINMUNOENSAYO.

---

Durante los últimos años se ha acumulado una enorme cantidad de información derivada de los estudios relacionados con las determinaciones de las hormonas implicadas en los mecanismos de funcionamiento del ciclo menstrual normal,<sup>1</sup> sin embargo, el descubrimiento de nuevas

sustancias con potencialidades reguladoras sobre el ciclo menstrual, como las leptinas y las variantes moleculares o isoformas de FSH y prolactina<sup>2,3</sup> han dado una nueva proyección a estos estudios. Está perfectamente establecido que la FSH en forma basal o estimulada por GnRh se presenta en

---

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica.

diversas formas isoeléctricas con una distribución que varía a lo largo del ciclo menstrual.

La leptina (s) es un producto genético de 16 kDa conocido como factor de obesidad, que se deriva principalmente de las células grasas, se relaciona directamente con el consumo y distribución de la energía y al parecer está asociada con la homeostasis del peso corporal.<sup>4</sup> Recientemente se ha demostrado que la expresión del gen de la obesidad (Ob) y los niveles circulantes de leptina están modulados *in vivo* por una serie de factores que incluyen la insulina, los glucocorticoides y las citocinas. Se ha demostrado la producción de leptina en el tejido placentario, músculo esquelético de rata, estómago de rata, en las células epiteliales del tejido mamario humano y en las células hipofisarias de ratas y ratones.<sup>5</sup> De acuerdo con su homología estructural, la prolactina (Prl) es una citocina y pertenece a la familia de estos péptidos. Los procesos biológicos activados por la Prl mediante sus receptores conducen hacia patrones específicos de transcripción genética y son dependientes de las líneas celulares y de su estadio de desarrollo.

La Prl es una hormona hipofisaria que influye en varios procesos fisiológicos, dentro de los cuales se encuentran el desarrollo de las glándulas mamarias, iniciación y mantenimiento de la lactancia, la inmunomodulación, la osmorregulación y el metabolismo de los lípidos. Se ha informado que la Prl puede actuar sobre el tejido adiposo porque los receptores de esta hormona aumentan durante la diferenciación de los adipocitos y pudieran estar relacionados tanto con el desarrollo fetal como con el metabolismo lipídico de los adipocitos maduros.<sup>6</sup> La Prl presenta un

marcado polimorfismo molecular. La heterogeneidad molecular se ha propuesto como uno de los posibles mecanismos para explicar la diversidad de funciones de algunas hormonas.

El aumento de los niveles circulantes de Prl se asocia frecuentemente con la infertilidad, por los trastornos que produce la hormona sobre el metabolismo y la biosíntesis de las células del ovario,<sup>7,8</sup> sin embargo, se ha demostrado la existencia de niveles circulantes elevados de Prl con función ovárica conservada.<sup>9</sup> Esta dicotomía significa que la presencia de diversas variantes de pesos moleculares de la prolactina y/o la variabilidad en su actividad biológica pudiera ser la causa de los efectos de la hormona en el ciclo menstrual. En 1973, *Robyn* y otros<sup>10</sup> describieron un patrón de secreción bifásico de Prl durante el ciclo menstrual, con un pico de secreción a mediados del ciclo y niveles elevados durante la fase luteal, pero estos resultados no pudieron ser confirmados.

Algunos autores han encontrado una elevación de las concentraciones de Prl a mediados del ciclo. Estudios realizados por *Franchimont* y otros (1976)<sup>11</sup> establecieron que existe una tendencia al aumento de las concentraciones de Prl durante la fase folicular.

*Subramanian* y otros<sup>12</sup> compararon los niveles de Prl inmunorreactiva y bioactiva durante el ciclo menstrual en un grupo de mujeres con infertilidad de causa no explicada. Estos autores encontraron un aumento de la actividad biológica e inmunológica a mitad del ciclo menstrual en un grupo de mujeres normales. Cuando se compararon las concentraciones de Prl a mitad del ciclo menstrual entre ambos

grupos, sólo encontraron diferencias para la forma bioactiva de la hormona.

El aumento en la actividad biológica e inmunológica encontrada a mitad del ciclo en el grupo de mujeres controles, no se pudo demostrar para el grupo de mujeres con infertilidad de causa no explicada. De acuerdo con el criterio de los autores, las alteraciones en la dinámica de secreción de la Prl podrían ser parte de las diferencias sutiles que aparecen entre los ciclos de mujeres normales y los de mujeres con infertilidad de causa no explicada.

Debido a que recientemente han aparecido publicaciones en las cuales se ha demostrado que las leptinas están implicadas en las funciones de la hipófisis anterior,<sup>13</sup> se decide desarrollar la presente investigación para determinar si existen cambios cíclicos de las leptinas durante el ciclo menstrual normal y cómo se correlacionan las concentraciones de esta hormona con la actividad biológica e inmunológica de la Prl.

## MÉTODOS

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS

Para la presente investigación estudiamos los ciclos menstruales de 19 mujeres sanas, con historia de ciclos ovulatorios y que participaron en el estudio en forma voluntaria.

Obtuvimos las muestras diariamente durante todo el ciclo menstrual. En cada extracción tomamos 5 mL de sangre por punción antecubital en tubos heparinizados los cuales centrifugamos durante 5 min a 2 000xg y 4 °C y conservamos el plasma a -20 °C hasta su procesamiento.

## DETERMINACIONES HORMONALES

Determinamos de forma enzimática la Prl inmunorreactiva, FSH y LH y el E<sub>2</sub>, por RIA, mediante un trazador tritiado de acuerdo con los procedimientos y los reactivos suministrados por el Programa de Reactivos Pareados para Investigaciones Clínicas en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (WHO/HRP).<sup>14</sup> Analizamos todas las muestras plasmáticas y los controles de calidad por duplicado y en forma paralela para comprobar la reproducibilidad y la repetibilidad a concentraciones altas, medias y bajas según la curva patrón utilizada.

La sensibilidad y los coeficientes de variación intra e interensayo para el ELISA de Prl fueron de 12 mUI/mL, 6,6 y 11,5 %, respectivamente. Para la LH estos valores fueron de 0,2 UI/L, 8,2 y 13,6 %. Los valores de sensibilidad, porcentaje de coeficiente de variación intraensayo e interensayo para la FSH fueron de 0,8 UI/L, 7,6 % y 15,4 %, respectivamente. Para determinar las concentraciones de E<sub>2</sub> por RIA empleamos un anticuerpo de estradiol-6-CMO-BSA levantado en conejo, a una dilución final de 1:210 000. La sensibilidad del ensayo fue de 6,4 pg/mL y la repetibilidad y reproducibilidad general del ensayo fue de 8,4 y 12,5 %, respectivamente.

Precisamos las concentraciones plasmáticas de leptinas de acuerdo con el procedimiento descrito<sup>15</sup> y mediante un juego de reactivos (*Linco Research Inc., St Louis, MO*). El límite de sensibilidad fue de 0,5 µg/L y los coeficientes de variación intra e interensayo para concentraciones de 1,6 y 11,6 µg/L fueron de 2,4 y 4,6 % y de 4,8 y 5,7 %, respectivamente.

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROLACTINA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL. BIOENSAYO CON LAS CÉLULAS Nb<sub>2</sub> DE LINFOMA DE RATA

La línea celular Nb<sub>2</sub> fue originalmente obtenida por cortesía del Dr. *PW Gout* (Vancouver, Canadá). Determinamos la bioactividad de la Prl en el medio condicionado linfocitario utilizando el ensayo de actividad proliferativa de la hormona sobre las células Nb<sub>2</sub>, de acuerdo con el método descrito por *Tanaka* y otros<sup>16</sup> con ligeras modificaciones. Mantuvimos las células a 37 °C en medio Fischer que contenía 10 % de suero fetal bovino (sfb) y 10 % de suero de caballo (hs) como fuentes de lactógeno, 10<sup>-4</sup> M de 2-mercapto-etanol, 50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina.

Detuvimos las células en la fase G21 temprana del ciclo celular por preincubación durante 24 h en el medio anteriormente descrito, pero con sfb al 1 %. Bajo estas condiciones estimulamos las células por adición de las muestras en estudio o por adición de concentraciones crecientes de Prl humana purificada (NIDDK hPRL-2).

Determinamos la actividad de Prl en fracciones alícuotas del medio condicionado (50 µL), en forma directa o diluidas, para determinar la existencia de paralelismo por comparación contra la curva patrón utilizada. Desarrollamos los cultivos y la determinación de la capacidad proliferativa según los procedimientos descritos anteriormente.<sup>17</sup> Las variaciones inter e intraensayo del bioensayo de las células Nb<sub>2</sub> fueron de 3,4 y 6,2 %, respectivamente. El rango dinámico del bioensayo fue desde 3,9 hasta 500 pg/mL y la sensibilidad, de 1,9 pg/mL.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Realizamos el análisis estadístico mediante la prueba de la t de Student y consideramos estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Determinamos las concentraciones de FSH, LH y E<sub>2</sub> a través de los ciclos menstruales estudiados para determinar si éstos se correspondían con los perfiles característicos para ciclos menstruales normales. Las concentraciones de todas las hormonas estudiadas oscilaron dentro de los rangos esperados (fig.1) y estuvieron de acuerdo con las variaciones biológicas individuales esperadas. El patrón de secreción de Prl biológicamente activa (fig.2) se caracterizó por un aumento a partir de la fase folicular tardía del ciclo menstrual que alcanzó los valores máximos durante la fase periovulatoria, una disminución durante los primeros días de la fase luteal y un nuevo aumento a finales de esa fase para alcanzar valores similares a los observados durante el inicio de la fase folicular.

Las concentraciones de Prl inmunológicamente activa (RIA) se muestran en la figura 3.

Los valores máximos aparecieron durante la fase periovulatoria del ciclo menstrual, lo que coincidió con el pico ovulatorio de la LH (LH=0). De acuerdo con las relaciones entre las concentraciones de la Prl bioactiva (BIO) e inmunorreactiva (RIA) (fig.4), durante la fase folicular temprana la relación entre las actividades biológicas e inmunológicas fue de aproximadamente 1 y luego se observaron 2 zonas con relación Bio/Inmuno igual o superior a 2, las cuales

quedaron separadas por un valle a lo largo de la fase periovulatoria.

En la figura 5 se muestran los valores de actividad biológica e inmunológica distribuidas en las diferentes fases del ciclo menstrual.

Durante la fase folicular, las concentraciones de Prl-BIO y Prl-RIA oscilaron entre 3 y 14 ng/mL, pero las diferencias entre ambas actividades no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, sin embargo, las concentraciones

FIG. 1. Determinación de las concentraciones de estradiol (E2), LH y FSH durante el ciclo menstrual en un grupo de mujeres normales fértiles. Las concentraciones de E2 se expresan en nmol/L, y las de LH y FSH en UI/L. Se analizaron 19 ciclos menstruales normales.

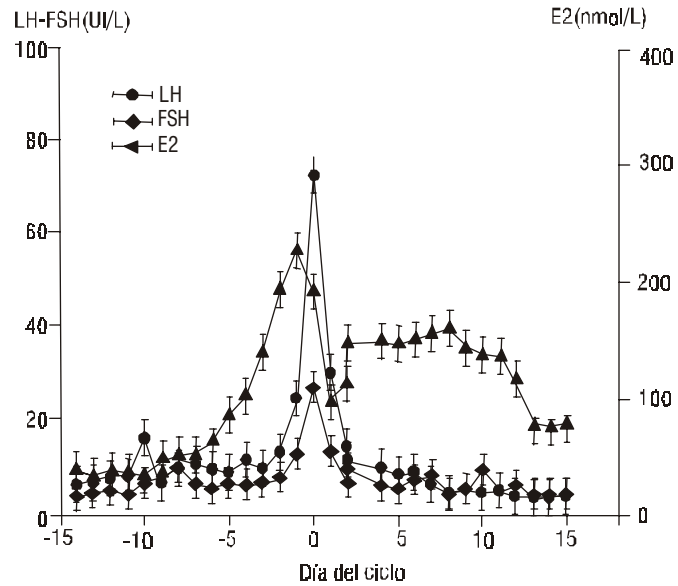
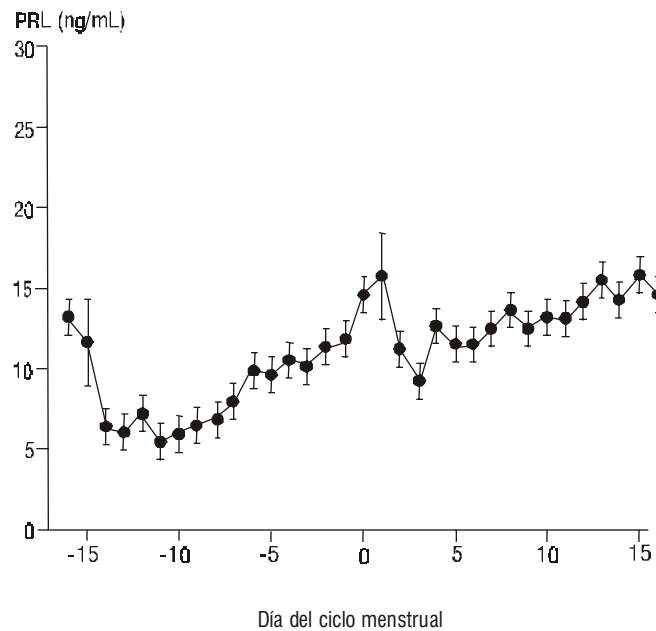


FIG. 2. Determinación de las concentraciones de prolactina bioactiva (Prl-Bio) durante el ciclo menstrual normal. Las concentraciones se expresan en ng/mL. Se analizaron 19 ciclos menstruales normales.



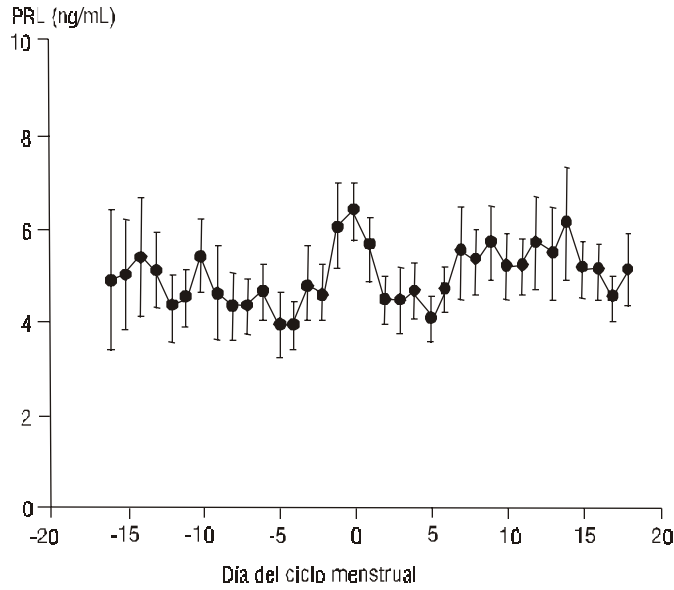


FIG. 3. Determinación de las concentraciones de prolactina inmunorreactiva (PrI-RIA) durante el ciclo menstrual normal. Las concentraciones se expresan en ng/mL. Se analizaron 19 ciclos menstruales normales de mujeres con historia de fertilidad probada.

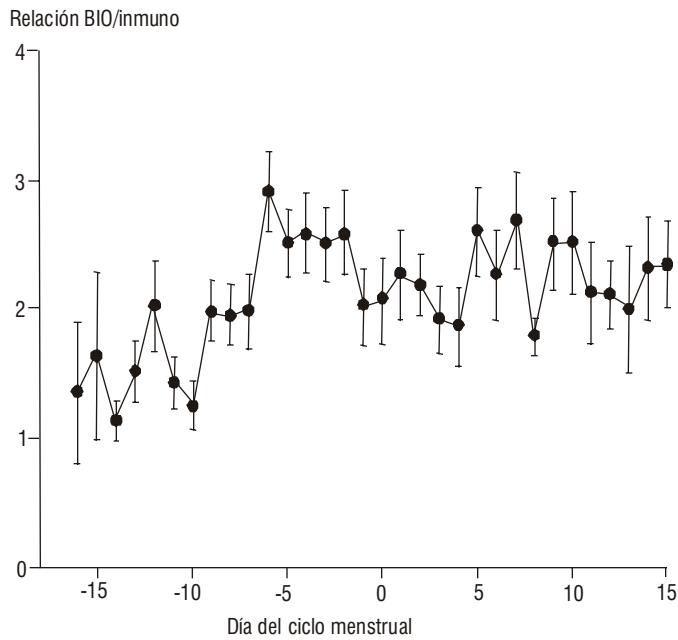


FIG.4. Relación entre las actividades biológica (BIO) e inmunológica (RIA) de la prolactina durante el ciclo menstrual normal. Los valores se expresan en unidades relativas y se analizaron 19 ciclos normales de mujeres con historia de fertilidad probada.

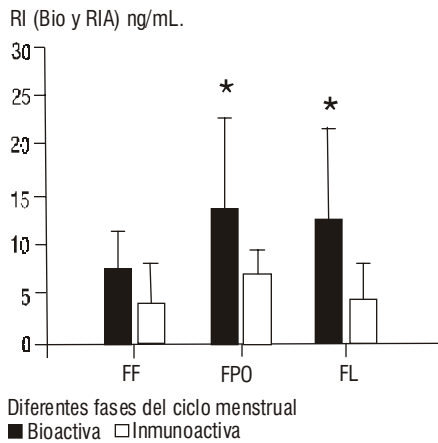


FIG. 5. Determinación de las concentraciones de prolactina bioactiva (BIO) e inmunorreactiva (RIA) en diferentes fases del ciclo menstrual normal. Las concentraciones se expresan en ng/mL. Se analizaron 19 ciclos menstruales normales correspondientes a mujeres con historia de fertilidad probada. \*  $p < 0,05$  es el valor de significación para las diferencias estadísticas.

de Prl-BIO fueron siempre superiores. Durante las fases periovulatoria y folicular, las concentraciones de Prl-BIO fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a la Prl-RIA. Las concentraciones de Prl-RIA durante las 3 fases del ciclo menstrual fueron muy similares. Las concentraciones de leptina mostraron un comportamiento variable a lo largo de los ciclos menstruales, pero de acuerdo con el perfil observado, las concentraciones aumentan a partir de la fase folicular temprana y disminuyen en los días cercanos a la fase periovulatoria (fig.6). A partir del día LH=5 del ciclo menstrual, se produjo un aumento de las concentraciones de leptinas, las cuales disminuyen a finales de la fase lútea hasta alcanzar concentraciones similares a las observadas durante la fase folicular temprana.

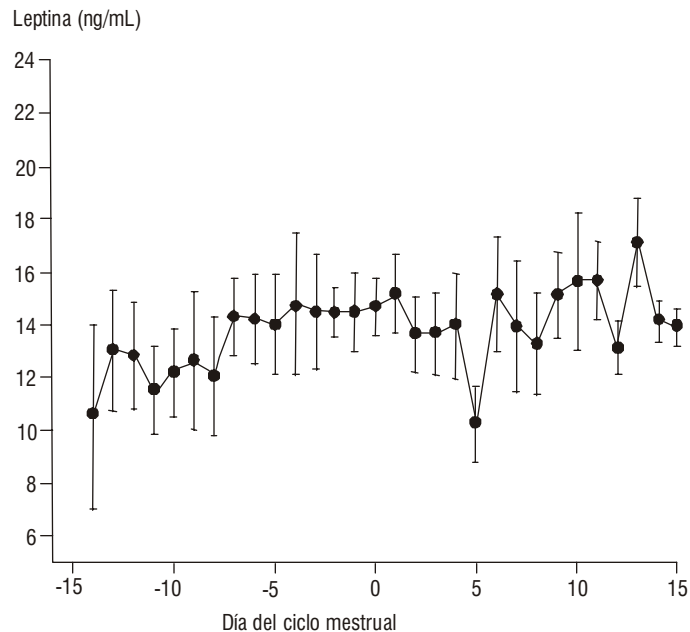


FIG. 6. Determinación de las concentraciones plasmáticas de leptina durante el ciclo menstrual. Las concentraciones se expresan en ng/mL. Se analizaron 19 ciclos menstruales normales. Las concentraciones de leptina se determinaron por RIA.

## DISCUSIÓN

El ciclo menstrual es una secuencia de procesos bioquímicos y fisiológicos cuya finalidad es producir un óvulo capaz de ser fecundado por un espermatozoide. En la regulación del ciclo menstrual intervienen factores hipotalámicos, hipofisarios y ováricos, principalmente. La síntesis inusual de hormonas, factores liberadores e inhibidores y efectores inmunológicos solubles pueden tener un efecto negativo y producir ciclos menstruales anovulatorios. Los mismos factores son capaces de producir cuerpos lúteos insuficientes e incapaces de mantener una producción sostenida de progesterona necesaria para mantener el óvulo fertilizado en los primeros estadios de la implantación. Estos ciclos menstruales son frecuentes en mujeres abortadoras habituales.

La Prl es la hormona que más efectos tiene sobre el ciclo menstrual. La mayor cantidad de estudios relacionados con los efectos de la Prl sobre el ciclo menstrual, han estado relacionados con la producción exagerada de la hormona. Mientras que se conoce muy poco sobre los efectos de la producción de Prl en concentraciones consideradas como fisiológicamente bajas. La producción elevada de Prl puede estar motivada por la presencia de microadenomas hipofisarios, hipotiroidismo, medicamentos que estimulan la síntesis y liberación de Prl, determinadas situaciones fisiológicas normales o patológicas o causas asociadas a la presencia de hiperprolactinemia funcional de origen desconocido. La hiperprolactinemia o presencia de niveles elevados de Prl producen anovulación y trastornos menstruales, galactorrea con amenorrea o sin ella, y otros trastornos

metabólicos secundarios. Los efectos más significativos de la producción disminuida de la síntesis de Prl, parecen estar relacionados, en un mayor nivel, con defectos en la regulación de la respuesta inmune y con el funcionamiento de determinadas líneas celulares del sistema inmune.<sup>18-20.</sup>

La presencia de hiperprolactinemia en mujeres con función ovárica conservada demuestra la importancia que tiene la existencia de especies moleculares con actividad biológica variable, sobre el funcionamiento y desarrollo de los folículos ováricos. De acuerdo con los resultados encontrados, la producción de Prl durante el ciclo menstrual sigue un patrón de secreción muy parecido al de la FSH, pero con diferentes perfiles de actividad biológica e inmunológica. No se conoce actualmente cuáles son las relaciones entre los patrones de actividad biológica de la FSH y la Prl, pero sí se ha demostrado que durante el ciclo menstrual normal aparecen diferentes formas de FSH que cambian su carácter ácido-base según las fases del ciclo menstrual.

Las leptinas, como hormonas reguladoras del metabolismo energético y lipídico, podrían tener un efecto general regulatorio sobre el comportamiento del ciclo menstrual, sin embargo, será necesario analizar un mayor número de muestras para determinar si las variaciones encontradas no son producidas por factores de tipo metodológico. En estudios posteriores será posible determinar si algunas funciones que se le atribuyen a la Prl y que están relacionadas con los sitios reguladores del hambre y satisfacción, no son funciones inherentes propiamente a las leptinas.

## SUMMARY

The concentrations of leptins during the normal menstrual cycle of a group (n=19) of fertile women and the daily concentrations of estradiol, HL and HFS were determined. The immunological activity of prolactin was determined by radioimmunoassay (RIA), whereas the biological activity (BIO) was determined by a proliferation bioassay of Nb2 cells from rat lymphoma. The RIA/BIO relations for prolactin were established. It was found an increase of the concentrations of prolactin (RIA) coinciding with the HL ovulatory peak. It was concluded that the concentrations of bioactive prolactin (BIO) were significantly higher ( $p < 0.05$ ) during the periovulatory and luteal phases. The RIA/BIO correlation for prolactin oscillated between 0.8 and 2.8. The concentrations of leptin showed a great variability between cycles, but they increased during the early luteal phase of the menstrual cycle, although they were not statistically significant.

*Subject headings:* LEPTINS; PROLACTIN; MENSTRUAL CYCLE; RADIOIMMUNOASSAY.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bohnet HG, McNeilly AS. Prolactin: assessment of its role in the human female. *Horm Metab Res* 1979;11:533-46.
2. Timossi CM, Barrios-de-Tomassi J, González Suárez R, Arranz MC, V Padmanabhan, Con PM, Ulloa-Agurre A. Differential effects of the charge variants of human follicle stimulating hormone. *J Endocrinol* 2000;165:193-205.
3. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995;16:354-69.
4. Gualillo O, Lago F, García M, Méndez C, Señaris R, Casanueva FF, et al. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 1999;140:5149-53.
5. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura KY, Kulig E, et al. leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000;141:333-9.
6. McAveney MK, Gimble JM, Yu Lee LY. Prolactin receptor expression during adipocytes differentiation of bone marrow stroma. *Endocrinology* 1996;137:5723-6.
7. Larsen JL, Bhanu A, Odell WD. Prolactin inhibition of pregnant mare's serum stimulated follicle development in the rat ovary. *Endocrine Res* 1990;16:449-59.
8. Cutie ER, Andino NV. Prolactin inhibits the steroidogenesis in midfollicular phase human granulosa cells cultures in a chemically defined medium. *Fertil Steril* 1985;49:7-7.
9. Larrea F, Méndez I, Escorza A, Veayra F, Cariño C, Cravioto MC. Prolactin size variants during pregnancy in women with ovulatory hyperprolactinemia: characterization by isoelectric focusing and lectin-affinity chromatography. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;44:91-100.
10. Robyn CP, Delvaye J, Nakin M, Vekemans H, Bodawi FR, Pérez-López M, et al. Prolactin and human reproduction. En: Pasteels JL, Robyn C, eds. *Human prolactin*. Amsterdam: Excerpta Médica, 1973:167-88. (International Congresses. Series, 138).
11. Francimont PG, Donrey JJ, Legros A, Reuter Y, Vrinats-Gevaert JR, Van Cauwenberger PR van, et al. Dosage de la prolactine dans les conditions normales et pathologiques. *Ann Endocrinol* 1976;37:127-36.
12. Subramanian MG, Kowalczyk CL, Leach RE, Lowson DM, Blacker CM, Ginsburg KA, et al. Midcycle increase of prolactin seen in normal women is absent in subjects with unexplained infertility. *Fertil Steril* 1997;67:644-7.
13. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Kananth S, SM McCann. Role of leptin in hypothalamic-Pituitary function. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997;94:1023-8.
14. Matched Reagent Program for Research in Human Reproduction. RIA for Estradiol, Geneva: WHO-HRP, 1998:44-8.

15. Pinilla L, Seoane LM, González L, Carro E, Aguilar E, Casanueva FF, et al. Regulation of serum Leptin levels by gonadal function in rats. *Eur J Endocrinol* 1999;140:468-73.
16. Tanaka T, Shiu RPC, Gout OPW, Beer C, Noble RL, HG Friesen. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormone measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1058-63.
17. Larrea F, Castillo-Martínez A, Cabrera OV, Alcocer-Varela J, Queipo G, Cariño C, et al. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3664-9.
18. Berczi I. The immunology of prolactin. *Semin Reprod Endocrinol* 1992;10:196-219.
19. Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *PSEBM* 1991;198:513-27.
20. Matera L. Prolactin and the immune network. *Adv neuroimmunol* 1991;1:158-72.

Recibido: 4 de octubre de 2000. Aprobado: 8 de noviembre de 2000.

Lic. *Víctor M. Cabrera Oliva*. Instituto Nacional de Endocrinología, Laboratorio de Reproducción Asistencial. Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.