



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

346  
13  
2eje.

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTOS *IN VIVO* E *IN VITRO*  
DE LAS DIFERENTES FORMAS MOLECULARES  
DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
:MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

ELENA ZAMBRANO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR. ALFREDO ANTONIO ULLOA AGUIRRE

MEXICO, D.F.

1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de investigación es un reflejo de labor organizada y de equipo, que no hubiera sido posible realizar sin la ayuda de mis compañeros de laboratorio. Particularmente quiero agradecer a **Aleida Olivares** y a **Raquel Faradji** por su enorme participación y paciencia; a la colaboración del **Dr. Roberto Domínguez Casalá**, y por supuesto, a la atinada dirección y enseñanza del **Dr. Alfredo Ulloa Aguirre**.

Al comité tutorial, mi agradecimiento por su tiempo, crítica y consejo.

Fue para mí una distinción haber tenido la oportunidad de realizar la presente tesis en el laboratorio de "Mecanismo de Acción Hormonal II", del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría del **Dr Alfredo Ulloa Aguirre**, así como el haber recibido el apoyo financiero de una beca otorgada por el Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	3
<b>I. HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE</b>	3
- Estructura	3
- Control de la síntesis y de la secreción	4
<b>II. FUNCION DE LA FSH</b>	7
1. Acción en ovario	8
A. Regulación de la maduración folicular	8
B. Ciclo menstrual	9
<i>a. Fase Folicular</i>	9
<i>b. Fase Ovulatoria</i>	10
- <i>Ovulación</i>	10
- <i>Sistema activador de plasminógeno-plasminógeno</i>	11
- <i>Relación entre la FSH, el APt y la ovulación</i>	12
<i>c. Fase Lútea</i>	13
2. Acción en testículo	14
<b>III. MICROHETEROGENEIDAD</b>	14
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>HIPOTESIS</b>	20
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	21
<b>RESULTADOS</b>	29
<b>DISCUSION</b>	55
<b>CONCLUSIONES</b>	60
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	61

## INTRODUCCION

La reproducción de los mamíferos es un fenómeno complejo, en el que participan todos los sistemas biológicos del organismo, entre ellos el sistema neuroendócrino. Las glándulas endócrinas involucradas directamente en este proceso, son las gónadas y la hipófisis. Las gónadas tienen la doble función de producir los gametos y las hormonas sexuales, que prepararán el aparato reproductor para el apareamiento y la nutrición adecuada de la progenie. La hipófisis, debido a su interrelación con el sistema nervioso central, regula el funcionamiento de la gónada y sincroniza los eventos del proceso reproductivo en respuesta a señales del medio externo e interno.

En la reproducción humana intervienen una serie de procesos, los cuales son regulados y dirigidos de una manera muy hermética, en particular, la función ovárica, está controlada fundamentalmente por las hormonas hipofisiarias gonadotrópicas, las cuales son dos: la hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH). A su vez, la síntesis y secreción de estas hormonas está controlada por el hipotálamo, mediante la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

El enfoque de esta tesis, es particularmente sobre la FSH, la cual es una proteína compuesta por dos subunidades (alfa y beta), y que dentro de sus funciones principales, están el de regular los procesos de gametogénesis, esteroidogénesis y ovulación.

La FSH no es una molécula de estructura única, sino que se sintetiza y secreta en múltiples isoformas, debido a que a la proteína base se le adicionan oligosacáridos, dando como producto final una serie de moléculas similares, pero diferentes entre sí por la composición de carbohidratos, siendo el más importante el ácido siálico. En base a estas diferencias podemos hablar del término "microheterogeneidad". Bioquímicamente cada una de las formas constituye una isohormona (o isoforma), que tiene propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes, por ejemplo, punto isoeléctrico, carga media, unión al receptor y potencia biológica (*in vivo* e *in vitro*).

Las isoformas de la FSH, han sido detectadas, aisladas y caracterizadas en diversos sitios, como la hipófisis anterior, el suero y la orina de diferentes especies de animales, incluyendo al humano. Sus formas y cantidades relativas dependen de variables como la técnica utilizada en

su separación, el tejido de extracción y el estado fisiológico del donador en el momento de la obtención de la muestra.

Aún se ignora la influencia de las formas existentes sobre procesos esenciales como es la regulación del ciclo menstrual; no se conocen las isohormonas ni la cantidad que de ellas predominan durante los diferentes estados fisiológicos, la complejidad funcional de las isoformas es en forma análoga a piezas de un rompecabezas, que no se sabe si pertenecen a un solo juego o a diversos.

Este estudio está basado en investigaciones previas, de donde a manera general se sabe que las formas más ácidas son más abundantes que las menos ácidas, tienen una mayor vida media plasmática y como consecuencia una mayor potencia biológica *in vivo*. Asimismo, las formas menos ácidas, al contener menor cantidad de ácido siálico, presentan una mejor unión al receptor, y una mayor potencia biológica *in vitro*.

Por otro lado, se ha observado en animales de experimentación, que proporciones mayores de isoformas menos ácidas se secretan cuando hay una alta sensibilidad hipofisiaria a GnRH y una elevada concentración de estrógenos, situación similar en la que se encuentra la mujer en el momento preovulatorio.

Mucho se sabe del control y la regulación de la reproducción, pero sin duda, hay una serie de procesos desconocidos, que el entenderlos nos ofrecerían una explicación a fenómenos complejos ocurridos durante el ciclo menstrual. Son bien comprendidos los procesos más evidentes y los estadios más importantes, pero entre ellos, hay una serie de reacciones en el microambiente folicular, que el estudiarlas y detectarlas, darían una luz importante acerca de las diversas situaciones ocurridas durante la maduración folicular y la ovulación.

Con la presente tesis se pretendió estudiar los cambios en la microheterogeneidad de la FSH secretada, que se presentan durante las diferentes fases del ciclo menstrual, y evaluar el posible impacto fisiológico de las modificaciones detectadas.

## ANTECEDENTES

### I.- HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)

#### 1.- Estructura

Las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y estimulante de la tiroides (TSH), así como la gonadotropina coriónica (CG), proveniente de la placenta, pertenecen a la misma familia de glicoproteínas. Tienen 2 estructuras polipeptídicas, la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ , asociadas de manera no covalente, con alta afinidad, que dan estabilidad a la estructura terciaria de la molécula<sup>(1,2)</sup>. La cadena  $\alpha$  es idéntica en las 4 hormonas, mientras que la  $\beta$  es diferente para cada una de ellas, lo que le confiere especificidad biológica e inmunológica<sup>(1,3,4)</sup>. La subunidad  $\alpha$  contiene la mayoría de los sitios de reconocimiento del receptor de la célula blanco. La  $\beta$  adquiere su conformación activa únicamente cuando está en combinación con la  $\alpha$ <sup>(5)</sup>.

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos en diversas especies, incluyendo la humana, teniendo 92 aminoácidos la subunidad  $\alpha$  y 118 la  $\beta$ <sup>(5)</sup>. Cada polipéptido mantiene su estructura tridimensional mediante puentes disulfuro cruzados, 5 en la  $\alpha$  y 6 en la  $\beta$ , sin existir puentes disulfuro entre las subunidades<sup>(5)</sup>.

Ambas cadenas sufren modificaciones post-traduccionales. En las dos cadenas polipeptídicas existen oligosacáridos ligados a residuos de asparaginas, con diferentes grados de sulfatación y sialidación<sup>(6)</sup>, lo que constituye la base química más importante para la existencia de las isoformas (microheterogeneidad).

La FSH tiene un peso molecular aproximado de 30 KDa; no se puede establecer su peso exacto por la gran variabilidad de los oligosacáridos unidos<sup>(5)</sup>. La FSH humana (hFSH) posee 4 cadenas laterales de carbohidratos, que están unidas a residuos de asparagina en las posiciones 52 y 78 de la subunidad  $\alpha$ , y en las 13 y 30 de la  $\beta$ . Los monosacáridos son manosa, fructosa, galactosa, glucosamina, galactosamina y ácido siálico. Cada oligosacárido está ramificado y es heterogéneo en su periferia, con bifurcaciones que terminan en ácido siálico, sulfato, fructosa o galactosa<sup>(6)</sup>.

El ácido siálico terminal protege a la molécula de la acción degradante de las enzimas hepáticas. Por esta razón, su presencia es de suma importancia en la regulación de la vida media de la hormona en la circulación<sub>(6)</sub>. La remoción del ácido siálico de la hFSH con tratamientos enzimáticos, disminuye la actividad biológica *in vivo* de la hormona, al reducir su vida media plasmática<sub>(7,8,9)</sub>.

La deglicosilación total de la FSH mediante tratamientos químicos, no altera la capacidad de la hormona para la unión al receptor, sin embargo, reduce la estimulación de la producción de AMPc, y por lo tanto, disminuye sus efectos biológicos<sub>(10)</sub>. Se ha observado que si la subunidad  $\alpha$  es deglicosilada y la  $\beta$  se mantiene intacta, ocurre la inducción de la producción de AMPc, lo que demuestra la importancia de los carbohidratos en la subunidad  $\beta$  para la inducción de la respuesta<sub>(10)</sub>.

## 2.- Control de la síntesis y de la secreción

La FSH y la LH son sintetizadas por los gonadotropos hipofisarios, y representan en ambos sexos el principal estímulo para las funciones de las gónadas<sub>(10)</sub>.

La secreción de las hormonas de la adenohipófisis es regulada por núcleos del hipotálamo, cuyas neuronas secretan hormonas de naturaleza peptídica. El factor hipotalámico que controla la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual es un decapeptido en forma de horquilla que tiene una vida media corta, entre 2 y 8 minutos<sub>(11)</sub>. Los aminoácidos 1, 6 y 10 de la GnRH, son esenciales para el mantenimiento de la configuración de la molécula, lo que permite su unión a los gonadotropos hipofisarios. Una vez que la GnRH se ha unido a los receptores hipofisarios, induce cambios en la permeabilidad celular, acompañado de la movilización del calcio extracelular<sub>(12)</sub>. El flujo de calcio da lugar a una elevada concentración intracelular del mismo, que como resultado final, causa la liberación por exocitosis de gránulos secretores de la hormona. La calmodulina, media el efecto del calcio sobre la liberación de gonadotropinas<sub>(12)</sub>. La unión de GnRH también activa a la proteína Cinasa C, encargada de la fosforilación de proteínas del citoplasma, lo que



promueve en último lugar la síntesis de gonadotropinas<sub>(12)</sub>. Cada célula gonadotrópica hipofisiaria contiene aproximadamente 10,000 receptores a GnRH. Con ocupar el 10% de estos receptores es suficiente para producir la liberación máxima de gonadotropinas<sub>(13)</sub>.

La secreción de la FSH y de la LH, ocurre por estímulo de la GnRH hipotalámica, la cual tiene una vida media de unos cuantos minutos y se libera a manera de pulsos, mismos que se reflejan en la secreción de las gonadotropinas, particularmente de la LH<sub>(14)</sub>. Por lo tanto, el control hipotalámico del ciclo menstrual, es debido a descargas rítmicas de GnRH. La regulación del ciclo menstrual se da por una interrelación compleja y coordinada entre la GnRH hipotalámica, las gonadotropinas adenohipofisarias y los esteroides gonadales, mediante una serie de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.

La pulsatilidad de la GnRH varía dependiendo del momento y del estado endócrino. Por ejemplo, en las noches de la fase folicular, la frecuencia de los pulsos de GnRH es reducida lo que coincide con los pulsos de la LH durante el sueño de la misma fase. Cuando la concentración de estrógenos y progesterona empieza a disminuir al final de la fase lútea, hay un aumento temporal de los pulsos de GnRH, y se van incrementando durante los primeros días de la fase folicular<sub>(15)</sub>. La frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH, son críticos para determinar la biosíntesis de la subunidad de la gonadotropina, así como el acoplamiento y la glicosilación por el gonadotropo<sub>(16)</sub>.

En un modelo *in vivo* en el que se desconectó funcionalmente el hipotálamo de la hipófisis, y posteriormente se administró GnRH de manera pulsátil, con una frecuencia fisiológica (1 pulso/h), mostró que la reactivación de la secreción, tanto de LH como de FSH, se debía a la pulsatilidad de la GnRH. El incremento en la frecuencia (3 pulsos/h), ocasionó una baja en la regulación de la respuesta hipofisiaria, y por lo tanto, una marcada reducción de la secreción de LH y FSH. Al disminuir la frecuencia (1 pulso/3 h), se indujo preferencialmente la secreción de FSH<sub>(17)</sub>.

Estudios realizados en humanos, donde se bloquearon los receptores para GnRH con antagonistas, ocasionó la reducción de la bioactividad, más que la inmunoreactividad, de la LH y de la FSH, lo que permite sugerir que el deterioro del procesamiento de gonadotropinas ocurrió como resultado de la privación del GnRH. Para la glicosilación y el acoplamiento de las subunidades, se requiere de un apropiado gasto de GnRH, que genere moléculas de

gonadotropinas biológicamente activas<sub>(18)</sub>.

Una característica esencial para el control de la función ovárica, es la pulsatilidad de la secreción de la LH y de la FSH por la hipófisis. La frecuencia y la amplitud de los pulsos de las gonadotropinas, está modulada, en parte, por los esteroides ováricos. En ausencia de esa retroalimentación gonadal, como en el caso de las mujeres postmenopáusicas y en las ovariectomizadas, se mantienen altos los valores séricos de gonadotropinas, y hay una gran amplitud y frecuencia en los pulsos de LH, mientras que las mujeres normales, presentan un patrón de alta frecuencia y baja amplitud durante la fase folicular, y de baja frecuencia y alta amplitud durante la fase lútea. El estradiol parece ser más efectivo en modular la amplitud, mientras que la progesterona actúa como un reductor de la frecuencia de la pulsatilidad<sub>(19)</sub>. Durante la fase lútea media se han observado secreciones pulsátiles de estradiol, progesterona y LH, lo que permite sugerir que existe una señal coordinada y sincrónica entre sus pulsos<sub>(20)</sub>.

La secreción tónica de LH y FSH está controlada por una retroalimentación negativa. El estradiol y la progesterona tienen un efecto sinérgico, que es la principal señal de la retroalimentación negativa. Si una mujer cíclica normal, es ovariectomizada, se interrumpe dicha retroalimentación, lo que origina un incremento abrupto de las concentraciones de gonadotropinas. El efecto contrario de esta hipersecreción, se observa al administrar estradiol a mujeres con hipogonadismo<sub>(21)</sub>.

El inicio del "pico" preovulatorio de gonadotropinas es una consecuencia de una retroalimentación positiva del estradiol<sub>(22)</sub>. Aunque el estradiol puede dar una retroalimentación positiva y negativa, para que se desarrolle la positiva, se requiere de la anterior negativa. El principal sitio de acción del estradiol, es la hipófisis, aunque también tiene un efecto importante a nivel hipotalámico<sub>(22)</sub>.

La inhibina está considerada como la más importante proteína ovárica que interviene en el control de la secreción de la FSH. Es un producto del folículo en desarrollo, por lo que se encuentra en grandes cantidades en el fluido folicular, aunque también es secretado por el cuerpo lúteo<sub>(23)</sub>. Es un heterodímero, formado por una cadena alfa y una beta, unidas por puentes

disulfuro. La inhibina es derivada de tres pro-hormonas y la actividad biológica de la subunidad está en la región terminal de cada precursor. Su función es la supresión selectiva de la liberación de la FSH y su acción es independiente de la GnRH.

La activina está formada por dos cadenas beta de inhibina. Tiene el efecto opuesto al de la inhibina, tanto en la secreción hipofisiaria de FSH como en la función del ovario<sup>(24)</sup>.

En la fase lútea, la subunidad alfa de la inhibina puede actuar en el ovario, suprimiendo la acción de la FSH, lo que ayuda a que la foliculogénesis no se efectúe hasta el fin de la luteólisis<sup>(23)</sup>. También se ha visto que proteínas derivadas de la subunidad alfa de la inhibina, suprimen la unión de la FSH con su receptor en las células de la granulosa<sup>(23)</sup>. La activina en el ovario incrementa la respuesta de las células de la granulosa a la FSH, preparando al folículo preantral a la respuesta de la FSH<sup>(25)</sup>. Aún cuando en ciertas especies animales, como el roedor, la inhibina ejerce una acción relevante en condiciones fisiológicas, la importancia de esta proteína inhibidora de la secreción de la FSH, es controvertida en el humano. En esta especie, las concentraciones de estradiol juegan un papel preponderante en el control de la secreción de la FSH, particularmente durante la llamada transición lútea-folicular, durante la cual ocurre el reclutamiento de una nueva corte de folículos, bajo el estímulo de esta gonadotropina.

Otro péptido gonadal supresor de la FSH que se ha aislado y caracterizado, es la folistatina. Esta es una glicoproteína, formada por una cadena única. Su potencia *in vitro* es equivalente al 5-30% de la inhibina. La folistatina actúa como una proteína que se une a la activina, impidiendo su acción<sup>(26)</sup>. Su importancia tanto en animales de experimentación, como en humanos, no se ha delucidado aún.

## II.- FUNCIONES DE LA FSH

En la hembra la principal acción de la FSH, es promover la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, para el desarrollo del folículo ovárico y la secreción de estrógenos; asimismo, incrementa la elaboración del líquido folicular, y aumenta el número de receptores a LH<sup>(27)</sup>. La LH potencia el efecto de la FSH, en la promoción del desarrollo de los folículos; es la responsable de la ovulación y de la transformación del folículo en el cuerpo

lúteo<sup>(27)</sup>. En el macho, la FSH interviene, junto con los andrógenos, en la regulación de la espermatogénesis y estimula la producción de la proteína fijadora de andrógenos<sup>(28)</sup>.

La FSH actúa específicamente en las células de la granulosa del ovario y las células de Sertoli del testículo.

## **1. Acción en ovario**

### ***A. Regulación de la maduración folicular***

En respuesta al estímulo de la FSH, al final de un ciclo menstrual, un número indeterminado de folículos ováricos primario comienzan a desarrollarse. La FSH activa el sistema enzimático de la aromatas a nivel de la mitocondria, para la obtención de estrógenos a partir de andrógenos producidos en las células de la teca interna por el estímulo de la LH, por lo que conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos. La FSH junto con el estradiol ejercen una acción mitogénica, estimulan aún más la proliferación de las células de la granulosa y promueven el incremento del número de receptores de FSH por célula<sup>(28,29)</sup>.

Posteriormente hay un aumento de la producción de fluido folicular, que se acumula en los espacios intercelulares de las células de la granulosa, lo que da origen a la cavidad llamada antro. El folículo hace gradualmente su transición al estado antral. Es necesaria la presencia de estradiol y de FSH para el crecimiento folicular, así como para la maduración del ovocito. Solamente un folículo llegará a ser preovulatorio, mientras que los demás sufrirán un proceso que se conoce como atresia<sup>(28,30)</sup>.

Mientras que el estradiol ejerce una influencia estimuladora en la acción de la FSH dentro del folículo maduro, su efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisario, retira el soporte de gonadotropinas en los otros folículos menos desarrollados. Sin embargo, el folículo dominante permanece dependiente de la FSH y debe completar su desarrollo previo a la ovulación, por lo que cuenta con un mayor contenido de receptores para FSH, manteniendo de esta manera el estímulo de la aromatización. En esta etapa, la FSH induce el

desarrollo de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo antral. A la mitad del ciclo, se produce un pico de FSH y otro de LH de mayor intensidad, ambos esenciales para completar la maduración del ovocito e inducir la ruptura del folículo y la ovulación<sub>(10,28)</sub>.

En el "pico preovulatorio", al aumentar la concentración de LH, se inicia la luteinización de las células de la granulosa<sub>(31)</sub>. Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca, se diferencian en células luteinizadas, que forman el cuerpo lúteo. Durante esta fase las concentraciones de gonadotropinas son los más bajos de todo el ciclo, debido a la retroalimentación negativa que ejercen tanto el estradiol como la progesterona. De no haber embarazo, se presenta la luteólisis unos días después y el ciclo se reanuda nuevamente.

## ***B. Ciclo menstrual***

El ciclo menstrual es la expresión repetida de la función del sistema hipotálamo-hipófisis-ovario, con cambios estructurales y funcionales en los tejidos blancos: útero, oviducto y vagina (tracto reproductivo). El primer día que marca el inicio del ciclo es cuando comienza el sangrado menstrual. El promedio de duración de cada ciclo es de 28 días.

Con base en la estructura, morfología y producción esteroidea del ovario, el ciclo menstrual puede ser dividido en 3 fases funcionales:

1. Fase folicular (temprana, media y tardía).
2. Fase ovulatoria (transición entre folicular y lútea).
3. Fase lútea (temprana, media y tardía).

Durante el ciclo normal ovulatorio de mujeres, las concentraciones circulantes de gonadotropinas, estrógenos, andrógenos, progestágenos e inhibina, presentan un patrón cíclico bien definido.

### ***a. Fase folicular***

La fase folicular tiene una duración aproximada de 13 días. Está dirigida por el desarrollo de un folículo preovulatorio, mientras que los demás sufren atresia. Durante los primeros 4 a 5 días de la fase folicular, el aumento de la concentración de FSH, junto con el de la frecuencia

en la pulsatilidad de LH, da paso al reclutamiento folicular. Esto es seguido de la selección de un solo folículo dominante (día 5 a 7), su maduración (día 8 a 12), y por último la ovulación (día 13 a 15)<sup>(32)</sup>.

La selección del folículo destinado a ovular, está asociado con la alta capacidad de biosintetizar y secretar andrógenos, estrógenos, progestágenos e inhibina<sup>(33)</sup>. La integridad de la producción de estas hormonas es dependiente de la interacción entre las células de la teca y de la granulosa; la actividad de cada una está modulada por cambios en las enzimas esteroidogénicas del citocromo P-450 y por una variedad de factores de crecimiento que operan por medio de mecanismos autocrinos y paracrinos<sup>(34)</sup>.

Las hormonas tróficas LH y FSH tienen la capacidad inherente de modificar el rango del crecimiento y maduración folicular, en asociación con el microambiente del folículo ovárico. Tanto el estradiol como la inhibina son potentes supresores de la secreción de FSH, el tiempo de declinación de la FSH durante la fase folicular tardía, puede estar asociado con una supresión secuencial de retroalimentación negativa ejercida por el estradiol y la inhibina<sup>(35)</sup>. Por el contrario, las concentraciones circulantes de LH, exhiben una tendencia al aumento progresivo<sup>(36)</sup>.

## ***b. Fase ovulatoria***

### ***- Ovulación***

La ovulación marca la culminación de una serie de eventos iniciados por el aumento brusco en la concentración plasmática de LH "pico preovulatorio de LH". Se caracteriza por el reinicio de la meiosis, la ruptura de la vesícula germinal, la luteinización de las células de la granulosa, la reestructuración de la pared folicular, con la ruptura folicular resultante y la liberación del óvulo maduro fertilizable.

Las capas externas del folículo ovárico son la teca externa e interna, la lámina propia y la membrana granulosa. La lámina propia, y en especial la teca externa, son estructuras ricas en colágena. Esta proteína estructural es el componente primario de la tensión de la pared folicular. Para que ocurra la ovulación, la colágena debe ser degradada<sup>(37)</sup>. La colagenasa es la enzima encargada de la degradación de la colágena. Su forma inmadura se llama procologenasa,

la cual requiere de activación enzimática. La plasmina es un activador efectivo de la procólagenasa, que en los líquidos corporales también se encuentra en forma inactiva (plasminógeno). Para la conversión de plasminógeno en plasmina se requiere de activadores del plasminógeno<sub>(38)</sub>.

Con el "pico preovulatorio de LH", hay una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, que culminan con la ruptura folicular y la ovulación. El folículo presenta un aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad capilar, lo que lleva a que el líquido intersticial y folicular sean ricos en proteínas plasmáticas, entre ellas el plasminógeno (0.5 mg/ml). Por otro lado, la LH estimula la síntesis proteica responsable de la diferenciación de la membrana granulosa a células luteínicas, y la secreción de esteroides y activador de plasminógeno. La teca interna también responde a la estimulación de LH, aumentando la secreción de progesterona, andrógenos y activador de plasminógeno (PA). El PA convierte el plasminógeno del líquido folicular e intersticial en plasmina, la cual activa a la colagenasa, que junto con otras proteasas de serina, completan la proteólisis de colágena. Finalmente, disminuye la tensión de la pared folicular, hasta que ocurre la ruptura<sub>(37)</sub>.

#### **- Sistema activador de plasminógeno-plasminógeno**

El sistema PA-plasminógeno, es importante en situaciones donde se requiere controlar la degradación tisular, como es el caso de la ruptura del folículo ovárico. Este sistema tiene la ventaja de que las células secretan pequeñas cantidades del AP, que es una proteasa específica, y generan una segunda proteasa (plasmina), la que actúa sobre una amplia gama de sustratos<sub>(37)</sub>. Tanto los PAs como la plasmina, son proteasas de serina<sub>(38)</sub>.

El plasminógeno es una proenzima, formada por una cadena glicoproteica. Es producido y secretado continuamente por el hígado y está presente en el plasma en concentraciones elevadas (0.5 mg/ml). El plasminógeno es convertido a plasmina por dos tipos diferentes de PAs, genética, inmunológica y catalíticamente diferentes: el PA tipo urocinasa (uPA), que es secretado por células endoteliales renales, cuyo peso molecular es de 40 a 52 KDa; y el PA tipo tisular (tPA), que se encuentra en homogenados de tejido animal y humano, es producido por células

endoteliales, tiene un peso molecular aproximado de 72 KDa y requiere de fibrina para su activación óptima<sup>(37,39)</sup>. La producción y liberación del tPA y uPA, está sujeta a la regulación por hormonas, citocinas y factores de crecimiento<sup>(40)</sup>.

Otras proteínas importantes en el control del sistema PA-plasminógeno, son los inhibidores de los PAs (PAI). Existen dos tipos, PAI-1 y PAI-2. Ambos pertenecen a la familia de proteínas inhibidoras de proteasas de serina (SERPINS) e inhiben la actividad de PA, al formar complejos con tPA y uPA. Los PAIs son secretados por células específicas y también están regulados hormonalmente, por citocinas y por factores de crecimiento<sup>(40)</sup>.

#### **- Relación entre la FSH, el APT y la ovulación.**

En los roedores la producción de PAs en los folículos preovulatorios aumenta dramáticamente a medida que la ovulación se acerca, llega a su máximo en el momento de la ruptura folicular y declina después de ésta<sup>(40,41,42,43)</sup>. La relación entre el sistema PA-plasminógeno y la ovulación, ha sido demostrada en diversos estudios, dentro de los cuales está los de Ny y cols<sup>(40)</sup>. En uno de sus estudio estimuló con PMSG ("gonadotropina de yegua preñada") a ratas hembras inmaduras; posterior a la administración de hCG 12 horas después, observó un aumento significativo de tPA<sup>(40)</sup>.

Se sabe también que inhibidores del tPA intervienen en la regulación de la ovulación, ya que la inyección intrabursal de inhibidores de PAs (ácido epsilon-aminocaproico y benzamidina)<sup>(44)</sup>, anticuerpos anti-tPA o alfa2-antiplasmina<sup>(45)</sup>, suprimen la ovulación.

Se ha demostrado *in vitro* que la FSH es capaz de estimular la producción de tPA y de suprimir la producción de antiactivadores de PAs (inhibidores) por células de la granulosa<sup>(24,41,46)</sup>. Además, la FSH induce la aparición de receptores de LH en células de la granulosa, la que estimula la producción de PAs<sup>12</sup><sup>(47)</sup>. En ratas inmaduras hipofisectomizadas, la FSH recombinante induce la ofulación y estimula la producción de tPA y su RNAm *in vivo*<sup>(48)</sup>.

Aunque este último hallazgo no descarta el papel de la LH en la ovulación, indica que la FSH es importante para la maduración folicular y permite sugerir que el "pico preovulatorio de FSH" puede representar una señal ovulatoria redundante ó adicional, que asegura una



respuesta ovulatoria óptima.

### *c. Fase lútea*

La fase lútea tiene una duración aproximada de 14 días y se caracteriza por el cambio de la secreción de estrógenos a progesterona. La luteinización de las células teca-granulosa después de la ovulación está asociado con la abundancia de enzimas esteroideogénicas P-450 en las células lúteas, de un incremento en la síntesis de progesterona y en menor magnitud de estradiol.

El "pico de progesterona y estradiol" se presenta en el séptimo día de la fase lútea y tiene relación con la preparación del endometrio para la implantación. Si esta última no ocurre, comienza una declinación lineal en la concentración plasmática de progesterona, estradiol e inhibina, durante los últimos 4-5 días de la vida funcional del cuerpo lúteo. La actividad secretora del cuerpo lúteo y su vida funcional son dependientes de una secreción adecuada de LH<sub>(49)</sub>. Se ha demostrado que una interrupción de la pulsatilidad de LH, por la administración de antagonistas de GnRH, durante varios estados de la fase lútea, induce una rápida reducción de progesterona, estradiol e inhibina, seguido de la luteólisis y el principio de la menstruación<sub>(50)</sub>.

En la fase lútea, las concentraciones plasmáticas de FSH alcanza los niveles más bajos. No se requiere de FSH para mantener el cuerpo lúteo. La combinación de inhibina con estrógenos y progesterona, suprime la secreción de FSH y previene la iniciación de foliculogénesis.

Cuando en la fase lútea empieza a decaer la concentración de estrógenos y progesterona, ocurre un incremento temporal en los pulsos de la GnRH, el cual se va incrementando progresivamente a lo largo de los primeros días de la fase folicular<sub>(14)</sub>.

### *- Transición Lútea-Folicular*

La foliculogénesis comienza en la fase lútea tardía del ciclo previo y continúa durante la transición lútea-folicular. En este punto, la declinación del cuerpo lúteo asociado con el rápido descenso en la concentración plasmática de estradiol, resulta en el incremento de la secreción

de FSH (aproximadamente 2 días antes de la menstruación). Esta etapa representa una secuencia de cambios dinámicos que envuelven la terminación de la función lútea y la reactivación del sistema GnRH-gonadotropinas<sup>(13)</sup>.

## **2. Acción en testículo**

En los testículos se lleva a cabo la síntesis de andrógenos y la producción de espermatozoides. Estructuralmente ambas funciones se encuentran bien separadas; en las células de Leydig se efectúa la biosíntesis de andrógenos, principalmente testosterona, en tanto que en los túbulos seminíferos ocurre la maduración de las células germinales hasta espermatozoides, los cuales representan al gameto maduro apto para fertilizar. La hipófisis participa en el control de ambas funciones mediante la secreción de FSH y LH, necesarias directa e indirectamente para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis<sup>(28)</sup>.

Los túbulos seminíferos constan de dos tipos celulares diferentes, las células germinales y las de Sertoli. Estas últimas dan origen a los compartimentos en los que se alojan las células germinales en desarrollo, donde se les provee de un medio esencial para su diferenciación; también regulan el movimiento de las células germinales en los túbulos seminíferos y la liberación de los espermatozoides maduros.

La acción de la FSH y la testosterona en la espermatogénesis es indirecta, a través de las células de Sertoli, las cuales al ser estimuladas producen compuestos necesarios para la maduración espermática. Tal es el caso de la proteína fijadora de andrógenos (ABP), que se une a la testosterona y provee una reserva de andrógenos, útil para el desarrollo de las células germinales<sup>(28)</sup>.

### **III. MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH**

La FSH es sintetizada y secretada en múltiples formas moleculares, las cuales se han aislado e identificado de hipófisis anterior, suero y orina de diversas especies animales,

incluyendo al humano<sub>(51-59)</sub>.

La diversidad de formas de la FSH está dada por la adición de carbohidratos en la molécula base. Lo que distingue a las isoformas es la cantidad de oligosacáridos presentes en la proteína, en especial el ácido siálico (o neuramínico)<sub>(6)</sub>. Estas isoformas, al tener diversidad de cargas, pueden ser separadas por sus puntos isoeléctricos (pI) ó carga media, por técnicas de electroforesis (EF), isoelectroenfoque (IEF) y cromatoenfoque (CF). El número y abundancia relativa de cada isohormona, dependerá de la técnica específica empleada en su separación, del origen de la muestra biológica y del estado endócrino del donador<sub>(60-65)</sub>. Aunque en algunos casos hay variaciones en el número de isoformas y en el valor del pH informado por diferentes investigadores, es evidente que las isoformas de FSH están compuestas principalmente por componentes ácidos, a diferencia de lo encontrado en las isoformas de LH, en donde predominan las formas básicas o neutras. La naturaleza ácida de las isoformas de la FSH, se debe a la presencia de carbohidratos, con residuos terminales de ácido siálico<sub>(6)</sub>.

Los modelos más estudiados en la caracterización del pleomorfismo de la FSH son los roedores, el ovino y el humano. Utilizando el IEF y el CF como técnicas de separación, se ha podido caracterizar la distribución del perfil de pH, tanto de la FSH secretada, como de la intracelular, y de las variaciones en los perfiles de distribución durante diferentes condiciones experimentales y fisiológicas.

Cada una de estas isoformas presenta características fisicoquímicas y biológicas particulares, tales como punto isoeléctrico, carga media, unión al receptor, vida media plasmática y potencia biológica *in vitro* e *in vivo*. En términos generales, las isoformas menos ácidas presentan una mayor actividad de unión al receptor *in vitro* que las exhibidas por las más ácidas, sin embargo, estas últimas (ricamente sializadas), presentan una vida media plasmática y actividad *in vivo* mayor que las menos ácidas<sub>(52,59,66,67,68)</sub>.

Un ejemplo de lo anteriormente dicho es lo que ocurre durante la maduración sexual de la rata hembra, donde es elevada la producción de isoformas con pIs de 5.0, con una alta actividad biológica *in vitro* y una vida media circulante corta en comparación a las otras formas más ácidas<sub>(68,69,70)</sub>. La situación opuesta se ve durante la maduración sexual de la rata macho,

donde la aparición de formas ácidas (pIs de 4.9 a 4.0) ocurre cerca del momento de la culminación de la espermatogénesis y de la separación balano-prepuberal<sup>(14)</sup>.

La carga media de las isoformas de FSH es diferente entre sexos, y varía según la edad. Tanto en roedores como en primates, las isoformas son más ácidas en el varón que en la hembra, y en el humano en ambos sexos, se vuelven más ácidas en edades avanzadas. En los estudios de las variaciones de la heterogeneidad de carga en el humano, con respecto al sexo y a la edad, se ha encontrado que en hombres y mujeres ancianos prevalecen las isohormonas más ácidas<sup>(62,64,71)</sup>. Coincidiendo con los estudios hechos en roedores, en las mujeres jóvenes se encuentran formas más básicas que en los hombres de la misma edad<sup>(62)</sup>. En estos últimos, las especies de FSH intrahipofisiaria a la edad de 0.2 a 9 años, son menos ácidas que las encontradas entre los 17 a los 42 años. También de modo similar a lo hallado en roedores, se ha visto que en las formas más básicas de la FSH intrahipofisiaria del humano y del mono, aumenta la actividad biológica *in vitro*<sup>(56,72,73)</sup>, así como disminuye la vida media en plasma<sup>(75)</sup>.

Los estudios de FSH urinaria (uFSH) se han realizado principalmente en mujeres postmenopáusicas, de donde se han obtenido estándares internacionales y preparaciones comerciales. De las preparaciones comerciales de uFSH, se han identificado de 5 a 12 isoformas en un rango de pH de 5.8 a <4.0, tanto por el método del CF como por el de IEF, y la mayor parte de la recuperación se obtiene de las isoformas que eluyen a un pH <4.6, mientras que las otras formas representan menos del 25% del total de FSH recuperada<sup>(65)</sup>.

Estudios realizados en suero de humano han podido identificar algunas isoformas de la FSH<sup>(55,75,76)</sup>. Se ha demostrado que las mujeres que presentan ciclos menstruales normales, liberan a la circulación casi todas las isoformas de FSH-intradenohipofisiarias; sin embargo, la proporción relativa de esas isoformas secretadas cambia en relación a la fase del ciclo menstrual en que se encuentren. Durante el medio ciclo, cuando los valores de estrógenos se encuentran elevados y hay un incremento de la sensibilidad hipofisiaria a GnRH, la distribución de isoformas se manifiesta en un incremento en la relación relativa de las isoformas menos ácidas, comparado con la fase folicular y la lútea. Específicamente, las isoformas menos ácidas con puntos isoeléctricos >4.5 (con bioactividad *in vitro* mayor y vida media plasmática menor), son

liberadas a la mitad del ciclo en proporciones relativamente mayores que durante las fases temprana y lútea media<sup>(55,76)</sup>, lo que permite sugerir que ese tipo particular de isoformas, con mayor potencia y menor vida media, deben de estar relacionadas de alguna manera con los eventos foliculares que están ocurriendo en esta etapa del ciclo, y en particular, ejercen un efecto directo sobre los mecanismos que llevan a la ruptura folicular y finalmente a la ovulación. Aunque las isoformas con más carga negativa presentan *in vitro* menor actividad biológica, su tiempo de sobrevivencia en la circulación es mayor que la de las especies menos ácidas. La presencia de formas más negativas en suero que en hipófisis se ha atribuido a diferencias en la vida media circulante de las isoformas secretadas, con una mayor desaparición de las formas con menor cantidad de ácido siálico. En animales de experimentación las isoformas menos ácidas de FSH, desaparecen de la circulación más rápidamente que las formas fuertemente ácidas<sup>(59)</sup>.

La regulación de la producción y secreción de isoformas depende de varios factores, dentro de los que destacan los esteroides gonadales y el GnRH. La inducción de la pubertad en la oveja con GnRH, produce un aumento selectivo de la secreción de isoformas menos ácidas<sup>(57)</sup>.

En el caso de las ratas hembras adultas, la distribución del pH de las diferentes isoformas varía durante el ciclo estral<sup>(9)</sup>. En estos roedores el perfil de distribución de FSH se ve alterado por manipulaciones farmacológicas específicas. Las hipófisis obtenidas de hámsters hembras ovariectomizadas, tratadas con estradiol, presentaron todas las formas de FSH identificadas por CF. La abundancia relativa de las formas más o menos ácidas, cambió dependiendo del tiempo de exposición a este esteroide, a corto plazo (20 horas) se encontró mayor cantidad de formas más ácidas, en comparación con los testigos ovariectomizados; cuando la exposición fue más prolongada, 30 horas, se observó un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas. El cambio a las formas más básicas se puede prevenir por la administración de fenobarbital, que evita la descarga de GnRH inducida por estradiol, lo que permite sugerir que la producción de las variedades de FSH, está regulada por un sistema sofisticado mediado por los factores gonadales e hipotalámicos.

Aún cuando los resultados de algunos experimentos *in vitro* permiten sugerir que la secreción de isoformas menos ácidas es regulada principalmente por GnRH, en estudios *in vivo* no se han podido disociar los posibles efectos de los esteroides gonadales (principalmente estrógenos), con

los del GnRH. De esta serie de estudios se podría concluir que ambos factores son responsables del polimorfismo de la FSH, en tanto que los estrógenos inducen modificaciones en la incorporación de carbohidratos durante la fase de síntesis y almacenamiento, el GnRH produciría cambios en la glicosilación inmediatamente antes de su secreción.

Cada componente hormonal involucrado en la regulación de la síntesis y secreción de la FSH pueden modular la estructura molecular de esta hormona y su microheterogeneidad. La acción concertada de todos estos factores regula la producción y secreción de tipos específicos de isómeros de FSH.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar el efecto de los diferentes ambientes endócrinos presentes durante el ciclo menstrual, en la heterogeneidad por carga de las moléculas de FSH secretadas, así como en la de aquellas que en los diferentes momentos fisiológicos del ciclo ovárico son sintetizadas y almacenadas previo a su secreción.

### Objetivos Específicos

1. Estudiar la heterogeneidad por carga de la FSH humana circulante en hombres y mujeres adultas, utilizando el CF como técnica de separación.
2. Analizar los cambios por carga de la FSH circulante en mujeres, durante diferentes estados de su ciclo menstrual, y las modificaciones ocurridas por la estimulación con GnRH exógena.
3. Analizar el impacto fisiológico de los cambios en la heterogeneidad de la FSH, que se presentan durante las diferentes condiciones fisiológicas estudiadas.
4. Estudiar *in vivo* e *in vitro* la potencia biológica de las diversas isoformas de la FSH aisladas de hipófisis humanas.

## **HIPOTESIS**

**La FSH hipofisiaria es secretada en múltiples formas moleculares. La distribución relativa de estas isoformas dependerá del sexo y de los diferentes ambientes hormonales presentes durante el ciclo menstrual. La estimulación con GnRH exógena magnificará los cambios observados en condiciones basales, reflejando el tipo de isoformas presentes en las pozas intracelulares de reserva y de nueva síntesis. Debido a que la principal diferencia estructural entre las diferentes isoformas es la cantidad de ácido siálico incorporados a cada una de ellas, los cambios en la distribución de las isoformas traerán consigo modificaciones en la vida media circulante de la FSH secretada.**



## MATERIALES Y METODOS

### Donadores

Se estudiaron 13 mujeres y 7 hombres sanos, cuyas edades variaron entre los 21 y 35 años de edad. Para las mujeres se requirió que no estuvieran bajo algún tratamiento hormonal y que hubieran presentado regularidad en al menos los 3 ciclos menstruales precedentes.

Cada voluntaria se estudió en 3 ocasiones diferentes, correspondientes a cada fase del ciclo menstrual:

- a) días 2-5, fase folicular (FF).
- b) días 11-14, fase del mediociclo (MC).
- c) días 20-23, fase lútea media (FL).

Para los varones se requirió que no estuvieran bajo algún tratamiento hormonal o de drogas que pudieran intervenir con la función reproductiva. En ellos el estudio se realizó en un solo día.

Para poder establecer los días de muestreo en cada mujer, se realizó un estudio previo en donde se siguieron los 3 ciclos anteriores, para establecer un promedio de la duración del periodo del ciclo de cada donadora.

### Protocolo de estudio

Cada voluntario fue ingresado en la Unidad Metabólica del INNSZ, una hora antes del inicio del estudio, con la finalidad de que se habituaran al lugar físico, tiempo durante el cual se instaló un catéter corto en una vena antecubital. El estudio se inició a las 08:00 horas con la colección de la primera muestra de 2 ml de sangre. Después de los 30 minutos iniciales, las obtenciones de las muestras se realizaron cada 10 minutos, durante 6 horas. Posteriormente se inyectaron 10  $\mu\text{g}$  de GnRH iv (Hoesht, Alemania), disueltos en 1 ml de solución salina fisiológica (SSF), en un bolo rápido y se continuó con el muestreo de sangre cada 10 minutos durante 2 horas más. Esta dosis fue calculada como suficiente para inducir la secreción de la poza de reserva de FSH. Al término de esta fase, se administró una segunda dosis de GnRH (90  $\mu\text{g}$ ), en un bolo rápido, continuándose con la obtención de muestras cada 10 minutos, durante 2 horas más. Esta dosis de GnRH se consideró suficiente para inducir la secreción de hormona

de nueva síntesis.

Durante las 11 horas que duró el estudio, los sujetos permanecieron en posición de decúbito dorsal, ingirieron una dieta blanda y no se les permitió dormir.

### **Procesamiento de las muestras de suero**

Las muestras de sangre obtenidas, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1000 g por 15 minutos, se separó el suero y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  en viales de plástico hasta el momento en que se cuantificó la hFSH por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

En el caso de las mujeres se cuantificó el contenido de estradiol y progesterona en una poza de 3 muestras basales, en tanto que en los varones se cuantificó los valores de testosterona. Una vez analizado el perfil de respuesta de la hFSH después del estímulo de GnRH, se procedió a constituir series de muestras que correspondieran a las condiciones basal y estimuladas por GnRH a las dosis de 10 y 90  $\mu\text{g}$ , para cada sujeto en forma separada, de tal manera que para cada donadora mujer, hubieran 9 grupos de muestras:

- A. Folicular: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$ , GnRH 90  $\mu\text{g}$
- B. Mediociclo: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$ , GnRH 90  $\mu\text{g}$
- C. Lútea: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$ , GnRH 90  $\mu\text{g}$

En el caso de los varones se instituyeron 3 grupos de muestras:

Basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$  y GnRH 90  $\mu\text{g}$ .

Cada muestra fue dializada separadamente a través de una membrana con permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA) contra agua destilada desionizada, durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente contra una solución de carbonato de amonio 0.01 M, bajo las mismas condiciones, por 24 horas más. Cada serie de muestras fue congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día del CF.

### **Cromatoenfoque**

Cada una de las series de sueros liofilizados fue resuspendida en 5 a 8 ml de Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA), amortiguador eluente, diluido 1:8 en agua desionizada, pH 4.0. Posteriormente se llevaron a cabo los cromatoenfoces empleando

como intercambiador la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NY, EUA), en columnas de 30 x 1 cm, equilibradas con 15 volúmenes de amortiguador de partida imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4. La muestra fue depositada en la columna y una vez completada su penetración se agregó el amortiguador de corrimiento (Polybuffer-74). Cuando las fracciones alcanzaban un pH < 4.0, el amortiguador de corrimiento era sustituido por una solución de NaCl 1 M, para recuperar el material no eluido dentro del rango de pH 7.4-4.0. Se colectaron en total entre 100-110 fracciones de 2 ml cada una. Cada fracción fue congelada y almacenada a -20°C hasta el momento de la determinación de su contenido de hFSH por el método del RIA.

### **Extractos hipofisarios**

Las hipófisis humanas se colectaron durante las autopsias de cadáveres examinados antes de cumplir 72 horas de fallecimiento y que habían sido conservados a 8°C a partir de las 3-4 horas posteriores a la muerte. Las hipófisis se almacenaron a -70°C, hasta el momento de preparar los extractos de glicoproteínas totales por el método de Jones y cols<sup>(77)</sup>. Finalmente éstos se almacenaron a -70°C.

El equivalente a 3 hipófisis fue equilibrado con amortiguador de corrimiento (Polybuffer-74) a través de cromatografía en Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NY, EUA) y las fracciones correspondientes a la hFSH fueron sometidas posteriormente a separación por CF, tal y como se describió anteriormente.

### **Vida media circulante de las isoformas de hFSH hipofisaria**

Para el estudio de la desaparición de las isoformas de hFSH hipofisarias en circulación, se utilizaron ratas macho adultas, de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 400 g. Cada rata fue anestesiada con pentobarbital (2.5 mg/100 g de peso) y se canuló la vena femoral. Por vía iv se les inyectó lentamente cada una de las isoformas aisladas de hFSH (ver figura 5), a una concentración de 63.5 a 104 µg de hFSH inmunoreactiva, diluida en 400 µl de solución salina. Después de 5 minutos de la inyección, se obtuvieron 400 µl de sangre y posteriormente cada 20 minutos durante 4 horas. Cada volumen de la sangre extraída fue sustituida por un volumen igual de solución salina. Después de la separación del suero, cada muestra se guardó a -20°C hasta

la determinación de su contenido de hFSH por RIA. La cinética plasmática de cada isoforma fue estudiada en 5 animales.

## Cuantificaciones hormonales

### - Bioensayo *in vitro*

La actividad biológica *in vitro* de las isoformas de hFSH hipofisiarias, se determinó por medio del bioensayo de aromatización en células de la granulosa de rata (GAB), descrito por Jia y Hsue<sup>(79)</sup>. Se utilizaron ratas hembras Wistar, de 21 a 22 días de edad, a las que se les implantó una cápsula de silástico de 10 mm que contenía aproximadamente 10 mg de dietil-estilbesterol (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA). Tres días después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los ovarios fueron disecados y decapsulados y los folículos fueron puncionados para obtener las células de la granulosa, mismas que fueron diluidas en medio de cultivo Mc Coy 5a sin suero (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) a una concentración de 80,000 células por 50  $\mu$ l de medio. A cada pozo de cultivo, se le agregó 400  $\mu$ l de medio de cultivo para bioensayo GAB (medio Mc Coy suplementado), 50  $\mu$ l de células y 50  $\mu$ l de la muestra de hFSH desconocida. Como estándar se utilizó la preparación de FSH-I-3, así como FSH urinaria (uFSH) procedente de la preparación comercial de Metrodín (Serono de México S.A, México, D.F.). Cada isoforma de la hFSH hipofisiaria fue cuantificada en incubaciones por triplicado, a 6 diluciones diferentes.

Los cultivos se llevaron a cabo a 37°C, en un incubador húmedo en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 72 horas, los medios de cultivo fueron extraídos de cada pozo y centrifugados a 1000 g durante 10 minutos; el sobrenadante fue almacenado a -20°C, hasta el momento de la cuantificación del contenido de estrógenos.

### - RIA de Estrona

Cada sobrenadante procedente del cultivo fue analizado en su contenido de estrona por el método de RIA, empleando un anticuerpo donado por el Dr. George Flikinger (Universidad de Pennsylvania, EUA). En virtud de que el antisuero utilizado mostró una reactividad cruzada

del 23% con 17-beta-estradiol, los resultados se expresaron en términos de ng de estrógenos totales por pozo de cultivo. La actividad biológica aparente de cada uno de los concentrados de las isoformas de hFSH hipofisiaria, se expresó como la relación entre la actividad biológica y la inmunológica (relación B/I), es decir, la actividad observada en el bioensayo *in vitro* relativa a la detectada por el RIA. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores de 10 y 20%, respectivamente.

#### **- RIA de 17-beta-estradiol**

Las concentraciones de estradiol en suero se determinaron por el método de RIA, empleando reactivos donados por el programa de reactivos de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, Suiza).

#### **- RIA de Progesterona y Testosterona**

La concentración de progesterona en las muestras de suero de las mujeres, y la de testosterona de los varones, fueron cuantificadas por el método de RIA, empleando los reactivos donados por la Organización Mundial de la Salud.

#### **- RIA de hFSH**

El RIA para hFSH, se llevó a cabo empleando reactivos donados por The National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Bethesda, MD, EUA), utilizando como estándar a la preparación LER-907. El anticuerpo empleado fue el anti-hFSH-6 a una dilución 1:50,000. Como marcador se utilizó hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcada con NaI<sup>125</sup> (Amersham International Limited, Amersham, Reino Unido) por el método de cloramina-T<sub>60</sub>. Los resultados son expresados en UI/L para las concentraciones en suero y en ng de LER-907/ml para las fracciones recuperadas de las columnas de cromatofluore.

#### **Parámetros de secreción de FSH**

El análisis de los parámetros de secreción de la FSH se llevó a cabo empleando los valores de las concentraciones en suero de FSH, obtenidos después de la estimulación con

GnRH. Los parámetros de secreción, masa secretada, amplitud del pulso y área bajo la curva de secreción, fueron analizados mediante el método descrito por Veldhuis y Johnson<sup>(81)</sup>. Así mismo, utilizando el mismo método, se calculó la vida media plasmática de la hormona secretada en respuesta al GnRH administrado en cada fase del ciclo menstrual.

### **Bioensayo *in vivo***

#### **- Inducción de la expresión de activadores de plasminógeno tisular en ratas inmaduras.**

Para este estudio se utilizaron ratas hembras tipo C-II-ZV (proporcionadas por el Dr. Domínguez, FES Zaragoza, UNAM), inmaduras, de 24 días de edad, sometidas a un ciclo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad, y alimentadas *ad libitum*. Los animales fueron estimulados con 2 UI de PMSG (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA), administrada por vía subcutánea, para inducir la maduración folicular. Después de transcurridas 48 horas, se les administraron una de las siguientes preparaciones:

a) solución salina inyectable.

b) hCG 10 UI.

c) Preparación comercial de hFSH urinaria (Metrodin, uFSH), en diferentes dosis: 3 UI, 6 UI, 9UI ó 12 UI.

d) Diferentes mezclas de las formas moleculares de hFSH hipofisiaria (iFSH), en proporciones de las isoformas con pH >4.5 y <4.5, equivalentes a 1:1, 1:2, 1:4 ó 1:8, así como la isoforma I. La dosis de FSH total administrada fue de 6UI, la cual en estudios preliminares mostró ser la mínima dosis capaz de inducir actividad de tPA. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical 8 horas después de la administración de las preparaciones problema. Como grupos testigo se incluyeron:

a) ratas a las que únicamente se les inyectó solución salina,

b) ratas estimuladas con PMSG, pero sacrificadas a las 48 horas del inicio del estudio,

c) ratas estimuladas con PMSG, sacrificadas a las 56 horas del inicio del estudio.

Cada grupo experimental estuvo constituido por 5 animales y los experimentos se realizaron en 2 ocasiones.

Después de la decapitación los ovarios fueron extirpados, disecados, pesados y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la electroforesis.

#### **- Zimogramas: Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.**

##### **Ensayo para activadores de plasminógeno.**

Cada ovario fue homogenizado por separado en  $150\ \mu\text{l}$  de PBS-0.01% Tween. El homogenizado fue centrifugado a 1000 g durante 15 min, y la concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada por el método de Bradford<sub>(82)</sub>. Los extractos de cada uno de los ovarios fueron sometidos a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 9%, depositando en cada carril cantidades equivalentes de proteínas totales.

Para medir la actividad de las proteasas dependiente de plasminógeno (tPA y uPA), se empleó el método de Granelli-Piperno y Reich<sub>(83)</sub>, modificado por Heussen y Dowdle<sub>(84)</sub>. Cada experimento constó de dos geles de SDS-poliacrilamida al 9%, preparado según Laemmli<sub>(85)</sub>, con la siguiente variante: el primer gel o testigo, contenía 0.1% de gelatina y 0.1% de plasminógeno humano purificado, para detectar la actividad de proteasas dependientes del plasminógeno. El segundo gel, también contenía gelatina, pero no el plasminógeno, para detectar proteasas no dependientes de plasminógeno.

Las electroforesis fueron llevadas a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , a una corriente constante de 11 mA y un voltaje de 150 V. Al término de la electroforesis cada gel fue incubado durante una hora en una solución de Tris-Tritón al 2.5%, para remover el SDS y posteriormente en una solución 50 mM de Tris a un pH 8.0, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los geles se tiñeron durante cuatro horas con azul de Coomassie brillante al 1.25% en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Posteriormente se destiñeron con una solución de ácido acético al 7.5% y metanol al 5%. Finalmente los geles fueron secados durante 3.5 horas, con calor al vacío en papel celofán, previamente humedecido en la solución de destinción. La estimación semicuantitativa de la actividad proteolítica se realizó midiendo el área de las zonas líticas (alto x ancho). La actividad fue expresada en  $\text{mm}^2$ .

## **Análisis estadístico**

### ***A. Relación de isoformas de hFSH circulante***

Las referencias en distribución por pH de las isoformas de la FSH circulante, se analizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas de "t" pareada con corrección de Bonferroni.

### ***B. Cinética plasmática de isoformas de hFSH***

La cinética plasmática de las isoformas de la hFSH hipofisiaria, se analizó mediante el programa PKCALC, para cada una de ellas se calculó el tiempo de residencia media, vida media y su tasa de depuración. Las diferencias en estos parámetros fueron analizadas mediante ANOVA y "t" de Student.

### ***C. Bioensayo in vitro***

Las diferencias entre grupos fueron determinadas por análisis de varianza de una vía, seguido por pruebas de "t".

### ***D. Parámetros de secreción***

Las diferencias entre grupos en los parámetros de secreción (masa secretada, amplitud del pulso y área bajo la curva), así como en vida media plasmática, fue calculado empleando ANOVA y prueba de "t" pareada.

### ***E. Bioensayo in vivo***

Las diferencias en respuesta a los diferentes tratamientos hormonales se calcularon considerando el peso de los ovarios (en mg totales) y la expresión de la actividad de tPA en términos del área de la zona lítica en los geles de SDS-poliacrilamida al 9% ( $\text{mm}^2$ ). Para el análisis estadístico, se utilizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) y la prueba de U-Mann Whitney.

Para todas las pruebas estadísticas definidas, se consideró como límite para establecer la presencia de diferencias significativas, a valores de  $p < 0.05$ .



## RESULTADOS

### I. Voluntarios

De las 13 mujeres, 5 fueron excluidas del estudio por presentar alguna irregularidad en el ciclo en que fueron muestreadas, ya sea por alargamiento ó acortamiento en su duración. Al final se analizaron las muestras de 8 mujeres estudiadas durante las 3 fases de un ciclo menstrual. En el caso de los hombres, dos fueron excluidos del estudio; el primero por presentar una baja respuesta al estímulo con GnRH, y el segundo por ser un probable donador infecto-contagioso.

En la Tabla 1 se muestran el día del ciclo en que fueron estudiadas las voluntarias con respecto al día de la ovulación así como las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona en las muestras basales obtenidas en los diferentes días del ciclo menstrual. A partir del primer día de sangrado del ciclo siguiente al estudiado, se contaron en retrospectiva 14 días para calcular el día probable de la ovulación, considerándose éste como el día 0. En todos los casos las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona se encontraron valores dentro de los rangos informados en la literatura (Estradiol: fase folicular 110.1 a 367 pmol/l, fase preovulatoria 367 a 1468 pmol/l, fase lútea 183 a 734 pmol/l; Progesterona: fase folicular 0.16 a 3.18 nmol/l, fase lútea 6.36 a 57.24 nmol/l)<sup>(86)</sup>.

Las concentraciones basales de testosterona en suero correspondientes a los 5 varones que participaron en el estudio se encontraron así mismo dentro de los límites de referencia normales [ $27.3 \pm 5.2$  nmol/L; rango, 13 a 33 nmol/l].

### II. Respuesta de FSH al estímulo con GnRH.

En la Figura 1 se muestran los patrones de respuesta de la FSH en suero a los estímulos con 10 y 90  $\mu$ g de GnRH en las diferentes fases del ciclo menstrual estudiado. A juzgar por los parámetros de secreción de los pulsos inducidos de FSH (Tabla 2), las respuestas en términos de masa secretada, amplitud del pulso y área bajo la curva fueron significativamente mayores durante el medio ciclo que durante las fases folicular y lútea. En todas las fases del ciclo, la

**Tabla 1.** Concentraciones basales de estradiol, progesterona y FSH(media±EE) en las fases folicular, medio ciclo y lútea del ciclo menstrual.

<b>Concentraciones basales en suero</b>				
<b>Fase del Ciclo</b>	<b>Día del Ciclo*</b>	<b>Estradiol</b> (pmol/l)	<b>Progesterona</b> (nmol/l)	<b>FSH</b> (IU/l)
Folicular	-12 a -7	153.8±20.5	1.6±0.6	13.7±1.4
Medio Ciclo	-2 a +1	538.7±45.9 <sup>†</sup>	1.5±0.1	19.7±4.3
Lútea	+7 a +11	536.9±37.0 <sup>†</sup>	37.2±8.9 <sup>‡</sup>	5.6±0.9 <sup>‡</sup>

\*Normalizado de acuerdo al día probable de la ovulación

<sup>†</sup>p<0.01 vs folicular

<sup>‡</sup>p<0.01 vs medio ciclo y folicular

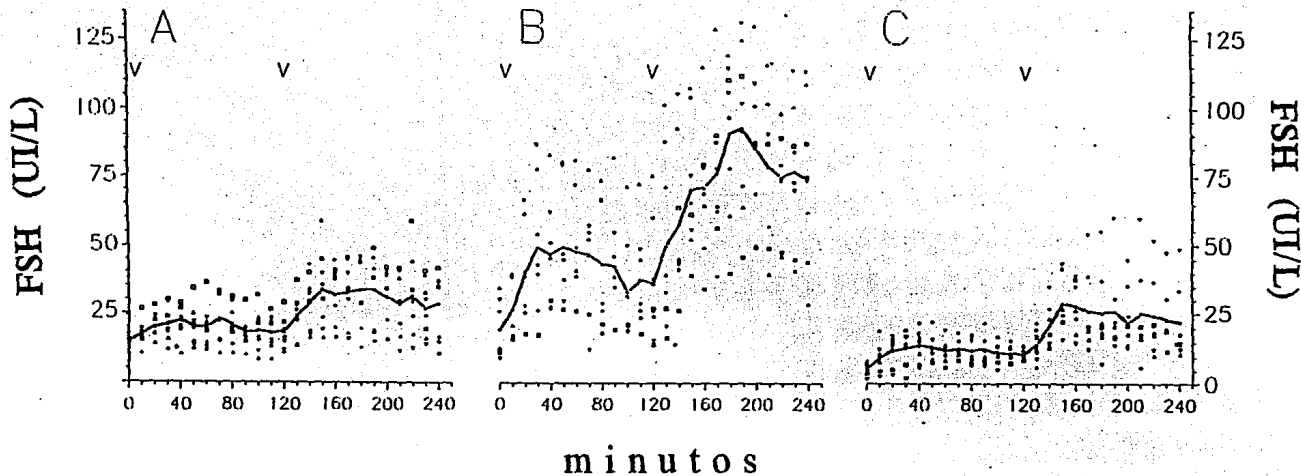


Figura 1.

Concentraciones de FSH en suero después del estímulo con GnRH exógena en las diferentes fases del ciclo menstrual. En cada gráfica, la V indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg. A, Fase folicular; B, Medio ciclo; C, Fase lútea. Los diferentes símbolos representan las respuestas de cada voluntaria y la línea continua la media de las respuestas.

Tabla 2. Análisis de los pulsos de FSH secretados en respuesta a GnRH exógena

Fase del Ciclo	Parámetros de Secreción					
	Masa del pulso (UI/L)		Amplitud de la Secreción (UI/L/min)		Area (UI/L/min)	
	GnRH		GnRH		GnRH	
	10*	90	10	90	10	90
Folicular	11.4 (1.2)**	19.4 <sup>†</sup> (2.4)	1.0 (0.1)	1.7 <sup>†</sup> (0.2)	2464 (252)	3777 <sup>†</sup> (479)
Medio ciclo	35.8 <sup>&amp;</sup> (4.2)	50.2 <sup>&amp;†</sup> (6.3)	3.2 <sup>&amp;</sup> (0.4)	4.5 <sup>&amp;†</sup> (0.6)	5145 <sup>&amp;</sup> (905)	8141 <sup>&amp;†</sup> (1392)
Lútea	11.3 (2.0)	18.1 <sup>†</sup> (3.5)	1.0 (0.2)	1.6 <sup>†</sup> (0.3)	1435 (158)	2059 <sup>†</sup> (490)

\*Microgramos de GnRH.

\*\*Error estándar.

<sup>&</sup>p < 0.05 vs folicular y lútea.

<sup>†</sup>p < 0.05 vs 10 µg en la misma fase del ciclo.

respuesta de FSH a la administración de 90  $\mu\text{g}$  de GnRH fue significativamente mayor que a la de 10  $\mu\text{g}$ .

Los valores de los parámetros de secreción (masa, amplitud y área del pulso) de FSH en respuesta a la administración de GnRH en los varones fueron los siguientes:

<u>Parámetros</u>	<u>GnRH 10 <math>\mu\text{g}</math></u>	<u>GnRH 90 <math>\mu\text{g}</math></u>
Masa	11.18 $\pm$ 2.38 UI/l	11.32 $\pm$ 0.03 UI/l
Amplitud	0.986 $\pm$ 2.09 UI/l/min	0.98 $\pm$ 0.19 UI/l/min
Area	177.07 $\pm$ 4.3 UI/l/min	2537 $\pm$ 573 UI/l/min*

\*  $p < 0.05$ ).

Los valores de estos parámetros fueron significativamente menores que los presentados por las mujeres en las fases folicular y medio ciclo, y similares a los de la fase lútea.

De manera semejante a lo observado en las voluntarias, todos los varones presentaron una respuesta bifásica a la administración consecutiva de las dos dosis de GnRH exógena (Figura 2). Los valores de la vida media plasmática de la FSH secretada en respuesta a la administración de GnRH en las mujeres voluntarias se muestra en la Tabla 3.

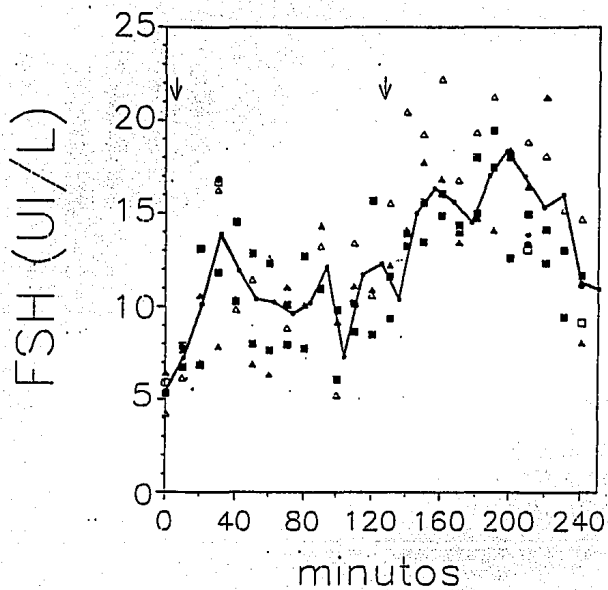
### III. Perfil de distribución por pH de las isohormonas de la FSH circulante.

#### A. Mujeres

De cada voluntaria, se obtuvieron 9 grupos diferentes de muestras correspondientes a los distintos días y condiciones del estudio:

- Fase folicular: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$  y GnRH 90  $\mu\text{g}$ ,
- Fase mediociclo: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$  y GnRH 90  $\mu\text{g}$ , y
- Fase lútea: basal, GnRH 10  $\mu\text{g}$  y GnRH 90  $\mu\text{g}$ .

Cada una de las muestras obtenidas durante las diferentes condiciones, fue sometida a separación por CF con el objeto de analizar la distribución por carga de las diferentes isoformas de la FSH



**Figura 2.** Concentraciones en suero de la FSH después de la administración de GnRH exógena a 5 varones normales. La primera flecha indica la administración de 10  $\mu\text{g}$  de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de 90  $\mu\text{g}$ . Los diferentes símbolos representan las respuestas de cada voluntario y la línea continua la media de las respuestas.

**Tabla 3.** Vida media plasmática de los pulsos de FSH secretados en respuesta al estímulo con GnRH exógena.

<u>Fase del Ciclo</u>	<u>Vida Media</u>	
	(minutos)	
	GnRH	
	<u>10 <math>\mu</math>g</u>	<u>90 <math>\mu</math>g</u>
Folicular	221.6 $\pm$ 37.5	271.0 $\pm$ 47.3
Medio Ciclo	107.8 $\pm$ 11.4 <sup>†</sup>	275.6 $\pm$ 75.6
Lútea	243.8 $\pm$ 40.9	198.2 $\pm$ 40.3

<sup>†</sup>p < 0.05 vs folicular y lútea con la misma dosis de GnRH

secretadas durante el ciclo menstrual. La Figura 3 muestra un perfil representativo de la distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por CF. En todas las fases y condiciones del estudio, se detectó la presencia de múltiples formas moleculares de la FSH las cuales fueron identificadas en un rango de pH de 7.4 a 4.0, así como después de la adición de 1 M NaCl a la columna de CF (pico de sal). Sin embargo, la abundancia relativa de las diferentes isohormonas se modificó significativamente dependiendo de la fase del ciclo y de la dosis de GnRH administrada. Durante el medio ciclo, la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas (pH > 4.5) fue mayor que la observada en las fases folicular y lútea media, tanto en condiciones basales como después de la administración de GnRH (Figuras 3 y 4). Con el objeto de analizar cuantitativamente y de comparar los cambios en la distribución y abundancia relativa de las diferentes isoformas secretadas en cada fase del ciclo, cada perfil de distribución por CF se dividió en 2 zonas de pH tomando como punto de corte el valor de 4.5. Las cantidades de FSH recuperadas en valores de pH menores y mayores a este valor, fueron entonces utilizadas como base para calcular la relación de isoformas con pH <4.5/>4.5 y establecer la presencia de diferencias entre las diversas fases. El valor de pH de 4.5 como punto de corte, fue establecido con base en las diferencias en actividad biológica *in vitro* y vida media plasmática presentadas por las isoformas intrahipofisarias (ver adelante).

La abundancia relativa de las isoformas menos ácidas (pH de elución > 4.5), se incrementó de manera selectiva durante el medio ciclo (Figura 5), con respecto a las fases folicular y lútea. Este incremento en la secreción de isoformas menos ácidas se observó en todas las diferentes condiciones estudiadas (basal, GnRH 10 µg y GnRH 90 µg). La expresión máxima de este cambio en el medio ciclo se observó en una voluntaria estudiada en la mañana del día de la ovulación, la cual ocurrió aproximadamente 3 a 4 horas después de haber concluido la obtención de las muestras correspondientes al día estudiado (Figura 4). La administración de 90 µg de GnRH en la fase folicular, de 10 y 90 µg en el medio ciclo y de 90 µg en la fase lútea, se distinguieron por inducir de manera selectiva la secreción de isoformas con valores de pH de 6.24-5.24 (Figs. 3 y 4). Este incremento, particularmente después de la administración de la dosis de 90 µg, sin embargo no alteró de manera significativa la relación de isoformas con pH menor y mayor de 4.5, aunque en la fase folicular se observó una tendencia hacia la disminución



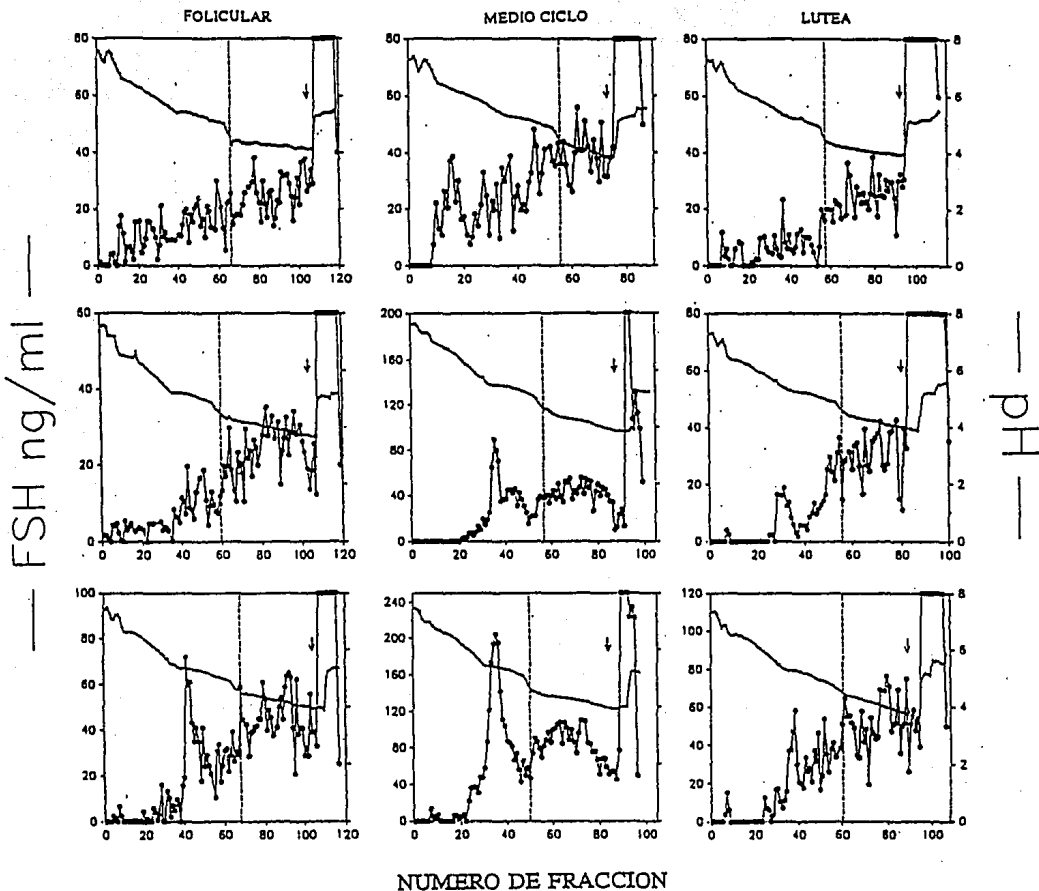


Figura 3.

Patrón de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por cromatoenfoco. Las gráficas superiores muestran el perfil en condiciones basales en tanto que las intermedias y las inferiores los perfiles encontrados después de la administración de 10 y 90  $\mu\text{g}$  de GnRH respectivamente. La fase folicular corresponde al día -8, el medio ciclo al día -1 y la fase lútea al día +8 del ciclo menstrual de una voluntaria. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 4.50. La flecha indica la adición de 1 M de NaCl a las columnas de cromatoenfoco.

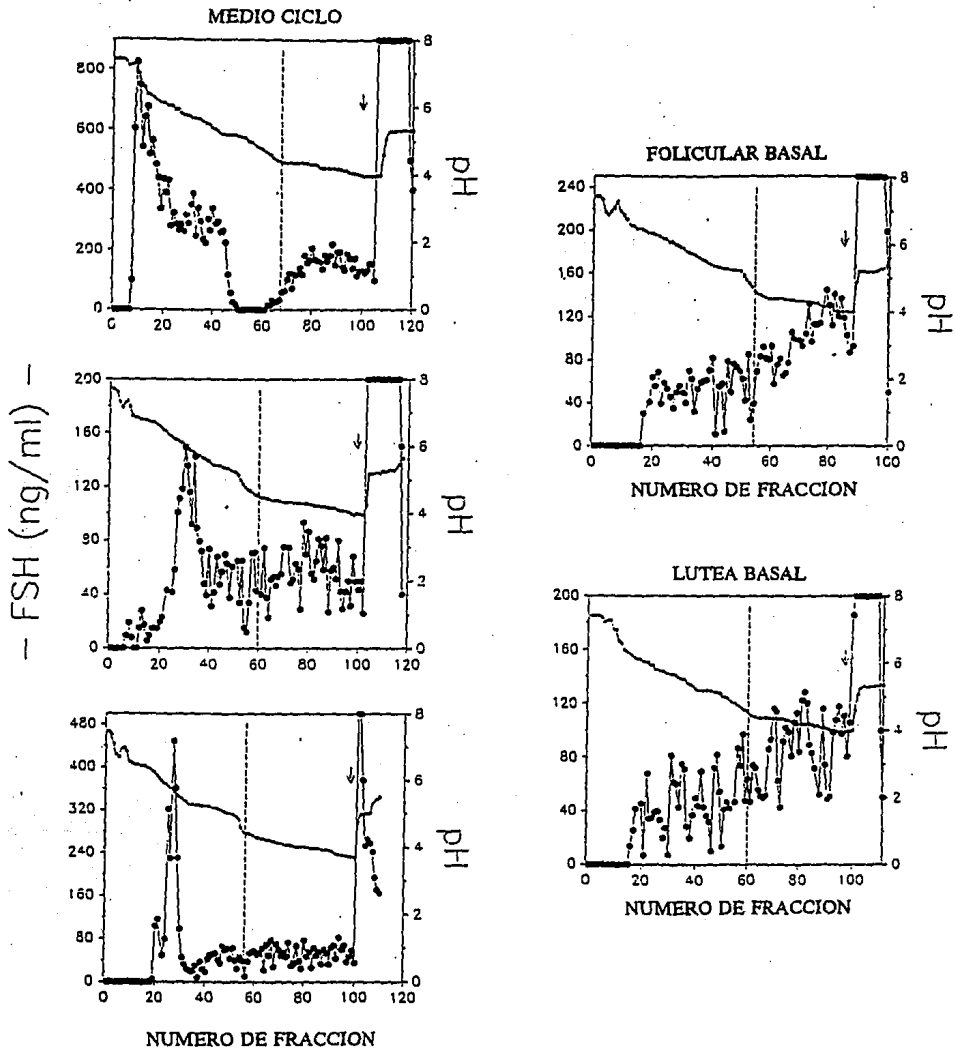
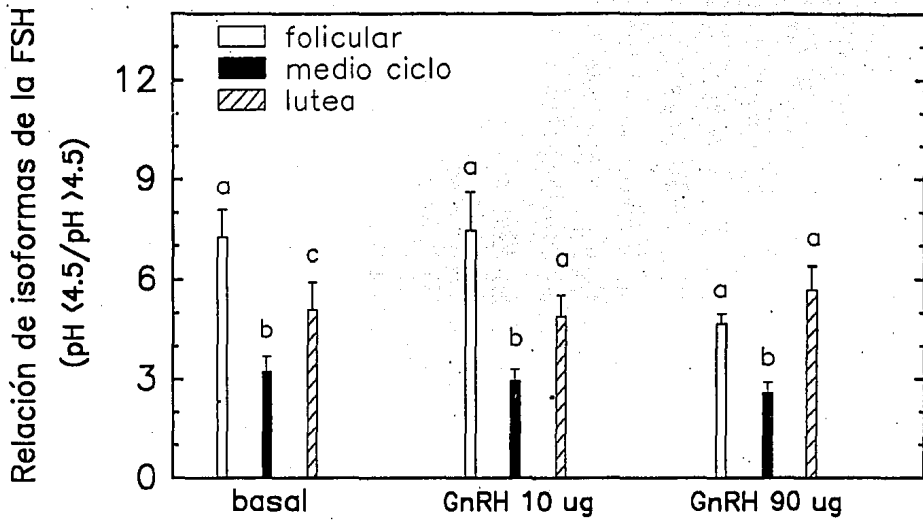


Figura 4.

Patrón de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por cromatofoco. *Izquierda:* Medio ciclo (día 0) en condiciones basales (gráfica superior) y después de la administración de 10 µg (gráfica intermedia) y 90 µg (gráfica inferior) de GnRH. *Derecha:* Fase folicular (día -7; gráfica superior) y fase lútea (día +9; gráfica inferior) en condiciones basales. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 4.50. La flecha indica la adición de 1 M de NaCl a las columnas de cromatofoco. Todos los perfiles fueron obtenidos de la misma voluntaria.



**Figura 5.** Cambios en la relación entre las isoformas de la FSH circulante con pH de elución <4.5 y >4.5 durante el ciclo menstrual. Para cada triplete, las barras identificadas con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

de esta relación respecto al valor correspondiente a la dosis de 10  $\mu\text{g}$  (Figura 5). La distribución de las isoformas secretadas en la fase folicular fué más ácida que la secretada durante la fase lútea (Figura 5).

## **B. Hombres**

La Figura 6 muestra un perfil representativo de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por CF. Las isoformas secretadas en condiciones basales fueron predominantemente ácidas (pH <4.5) y la relación de las isoformas con pH <4.5/>4.5 no se alteró significativamente después de la administración de GnRH (relación de isoformas <4.5/>4.5 en condiciones basales=  $6.2 \pm 0.9$ ; después de 10  $\mu\text{g}$  de GnRH=  $5.0 \pm 0.6$ ; 90  $\mu\text{g}$  de GnRH=  $4.7 \pm 0.2$ ). Con respecto a las mujeres,  $p < 0.05$  vs. medio ciclo bajo todas las condiciones; n.s. vs. fases folicular y lútea).

## **IV. Isoformas de la FSH intrahipofisiaria.**

### **A. Distribución por pH**

Los extractos hipofisarios separados por CF, presentaron múltiples formas moleculares de hFSH inmunoactiva dentro del rango de pH de 7.6 a 3.8, así como en la fracción recuperada después de la adición de 1.0 M de NaCl (pico de sal) (Figura 7A).

Las fracciones que contenían la mayor concentración de hFSH en cada pico mayor o picos menores de inmunoactividad fueron agrupados por áreas de pH y clasificados de la siguiente forma:

La mayoría (58.4 %) de la inmunoactividad de hFSH se recuperó dentro del pH <4.5 $\geq$ 3.8, así como en el pico de sal (16.8%). En cada grupo de isoformas (con excepción del I y del V)

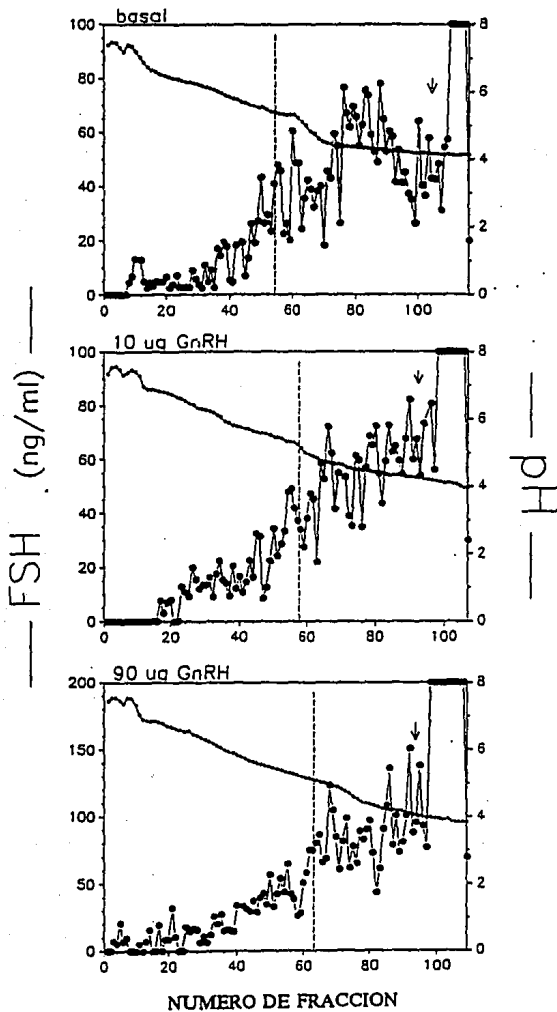
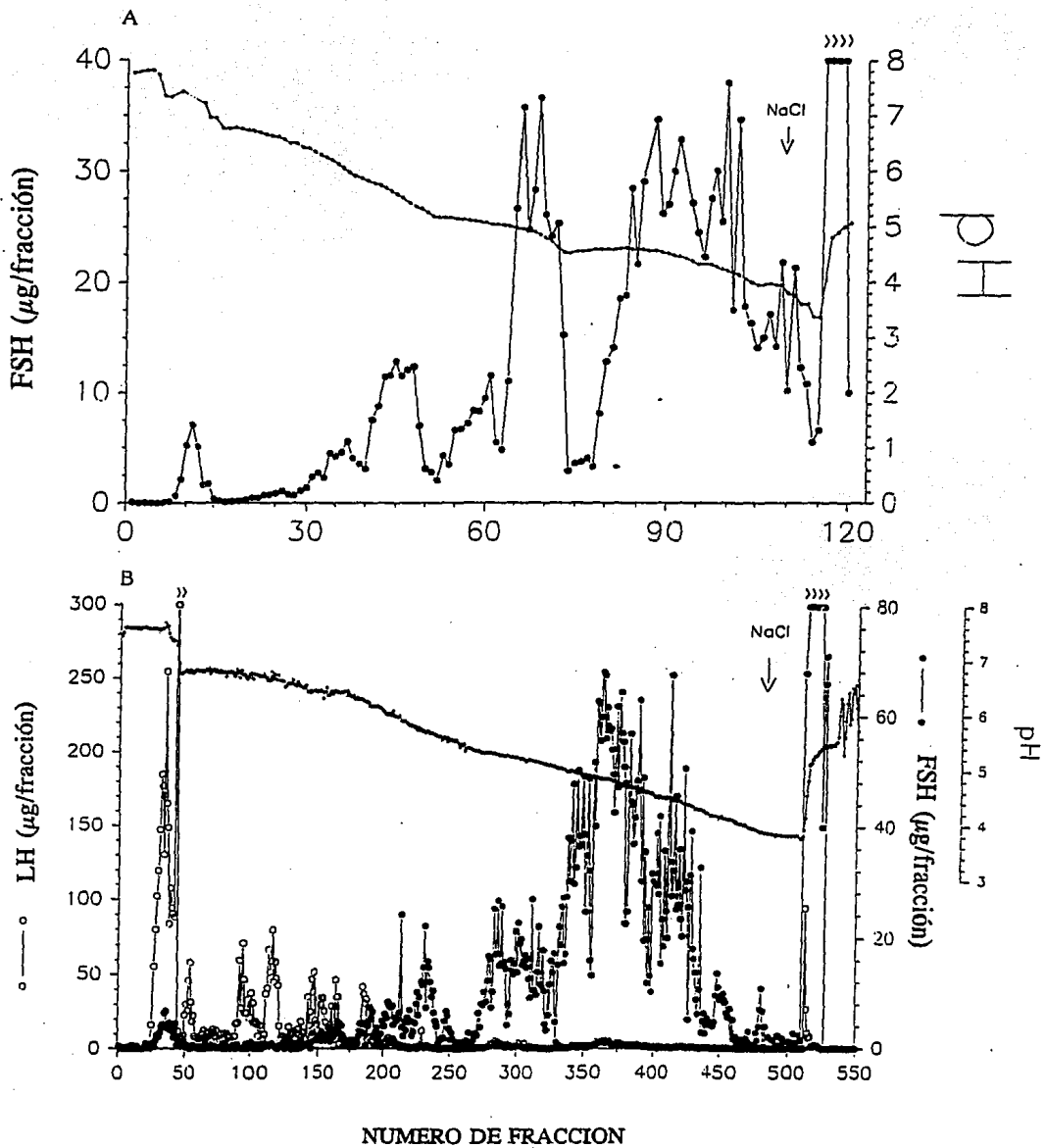


Figura 6.

Patrón de distribución por pH de la FSH circulante de un varón normal, después de su separación por cromatografía. Las gráficas superiores muestran el perfil en condiciones basales en tanto que las intermedias y las inferiores los perfiles encontrados después de la administración de 10 y 90  $\mu$ g de GnRH respectivamente.



**Figura 7.** Patrón de distribución por pH de la FSH intrahipofisiaria después de su separación por cromatofoco en columnas de 30 x 1 cm (A) y de 90 x 1.5 (B). En la gráfica B se muestra también la distribución de LH.

se analizó su potencia biológica *in vitro* e *in vivo*, así como su cinética plasmática. En el sistema de RIA empleado en el presente estudio se observó que cada uno de los concentrados desplazó a la  $^{125}\text{I}$ -FSH del anticuerpo de una forma paralela uno con otro, así como con la curva estándar (LER-907) y con la preparación comercial de FSH urinaria (Figura 8).

Con el objeto de analizar con detalle el contenido de LH de cada uno de los concentrados, se realizaron separaciones por CF empleando columnas de una mayor dimensión (90 x 1.5 cm) y cada una de las fracciones se analizó en su contenido de FSH y LH inmunoactivas. Como puede observarse en la Figura 7B, la cantidad de LH presente en las diferentes áreas de elución de los grupos de isoformas de FSH, varió dependiendo del pH de cada región. El mayor contenido se detectó en la zona con pH cercano al neutro, el que correspondió a las moléculas cuyo pI fue mayor a los límites superiores de la ventana de pH del sistema. La relación FSH:LH de cada zona fue:

Isoforma	pH	Relación FSH:LH
I	7.6-7.1	0.47
II	5.9-5.1	14.1
III	5.0-4.5	70.12
IV	4.4-4.1	250.26
V	3.9-3.8	4.63
VI	<3.8 (pico de sal)	21.89

### B. Cinética plasmática de las isoformas hipofisarias de hFSH

La Figura 9 muestra las curvas de desaparición del plasma de las isoformas de FSH inyectadas a ratas macho adultas. La concentración de FSH correspondiente a la primera muestra obtenida después de 5 minutos de la inyección fue considerada como el 100% en  $X=0$ .

El tiempo de desaparición en plasma de las isoformas menos ácidas (pH < 4.5) fue menor que el de las más ácidas (porcentaje de recuperación a los 240 minutos de la inyección en el grupo

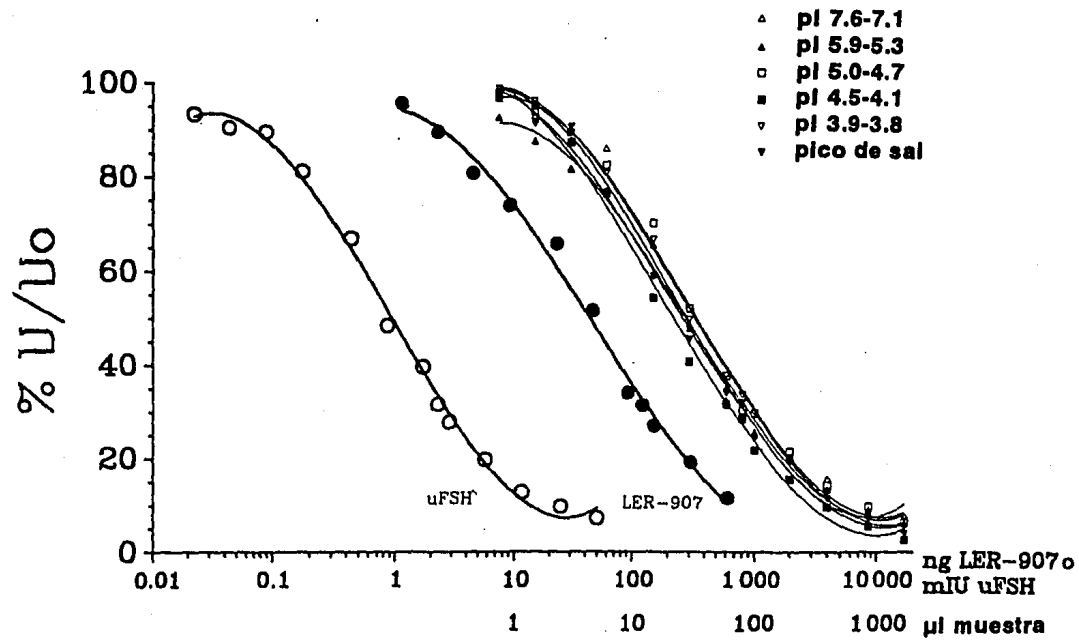
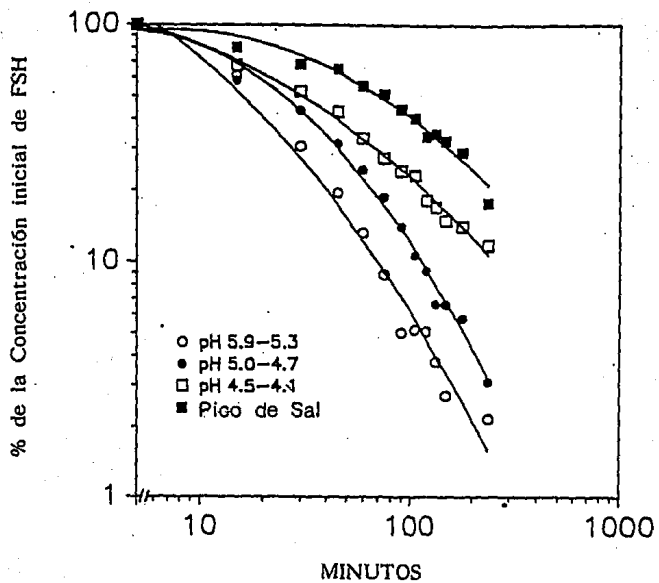


Figura 8. Curvas de potencia inmunológica y de paralelismo de las diferentes preparaciones de FSH empleadas en el presente estudio y cuantificadas mediante RIA.





**Figura 9.**

Curvas de desaparición plasmática de las isoformas de la FSH intrahipofisaria. Cada curva representa la media de 5 a 8 observaciones. Las dispersiones de cada curva fueron omitidas para mayor claridad de la gráfica.

II=  $2.7 \pm 0.7$ ; grupo III=  $3.1 \pm 0.3$ ; grupo IV=  $11.7 \pm 2.5$  y grupo VI=  $17.6 \pm 3.5$ ). De manera similar, la vida media ( $T_{0.05}$ ) y el tiempo medio de residencia en el plasma de las isoformas II y III fue significativamente menor a las presentadas por sus análogos más ácidos (Tabla 4).

#### **C: Actividad biológica *in vitro* de los concentrados de isoformas hipofisarias de FSH**

En el estudio *in vitro* con células de la granulosa de rata, la FSH hipofisaria presente en cada concentrado fue capaz de inducir la producción de cantidades significativas de estrógenos. Cada grupo de isoformas presentó una curva dosis-respuesta paralela con aquellas correspondientes al estándar (LER-907) y a la preparación comercial de FSH urinaria (Figura 10). Según lo informado previamente<sup>(43)</sup>, la potencia biológica expresada como la relación de la actividad biológica/inmunológica fue mayor en las isoformas de los grupos II y III (2.78 y 1.21) que en las presentes en los grupos IV y VI (0.56 y 1.0).

#### **D. Actividad biológica *in vivo* de los concentrados de isoformas hipofisarias de FSH.**

##### **a. Inducción de la producción de activador del plasminógeno tisular.**

La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida se realizó a una concentración de acrilamida del 9% por ser la óptima para la separación e identificación de la enzimas proteolíticas a estudiar (Figura 11). Al comparar los estándares de tPA y uPA con los de bajo peso molecular, obtuvimos un peso aproximado de 58 KDa y 38 KDa respectivamente, lo cual no concuerda con lo informado previamente en la literatura (72 y 50 KDa). Esta aparente discrepancia podría deberse a las condiciones electroforéticas empleadas en el presente estudio, en particular la concentración de acrilamida, tal y como ha sido informado por Heussen y cols<sup>(84)</sup>.

Las dosis óptimas de PMSG y de la preparación urinaria de FSH (que serviría a su vez para determinar la dosis de isoformas por administrar), se establecieron con base en los resultados de experimentos preliminares en los cuales los animales recibieron diferentes dosis de cada una

de las hormonas. En estos estudios se establecieron como dosis óptimas 2 UI de PMSG (definida como la cantidad de hormona por administrar que permitiera detectar diferencias en actividad de tPA entre los diferentes grupos experimentales) (Figura 12) y 6 UI de FSH urinaria (cantidad necesaria para inducir una actividad de tPA significativamente mayor que la obtenida con la administración de PMSG unicamente) (Figura 13).

Una vez establecida la técnica y las dosis óptimas, se procedió a administrar las isoformas de FSH hipofisiaria en una dosis total equivalente a 6 UI de FSH urinaria y mezcladas en diferentes proporciones según su pH de elución, utilizando 4.5 como valor de corte. De esta manera se constituyeron 2 pozas de isoformas: en la primera se incluyeron las de los grupos II y III, recuperadas en un pH de elución  $>4.5$ , y en la segunda las isoformas recuperadas en valores  $<4.5$  (grupos IV y VI). Ambas pozas fueron entonces mezcladas en proporciones 1:1, 1:2 y 1:4 y 1:8 y administradas separadamente a la dosis mencionada. Las proporciones de trabajo fueron determinadas con base en los patrones de distribución por pH de la FSH circulante durante el ciclo menstrual y considerando que en condiciones fisiológicas prácticamente todas las isoformas intrahipofisarias fueron detectadas como isómeros circulantes. La determinación de la actividad de las isoformas I y V no fue estudiada debido a que la primera coeluyó con cantidades extremadamente elevadas de LH (relación en contenido de FSH y LH inmunoreactivas en las fracciones correspondientes = 0.47) en tanto que en la segunda la recuperación de FSH inmunoreactiva fue extremadamente baja.

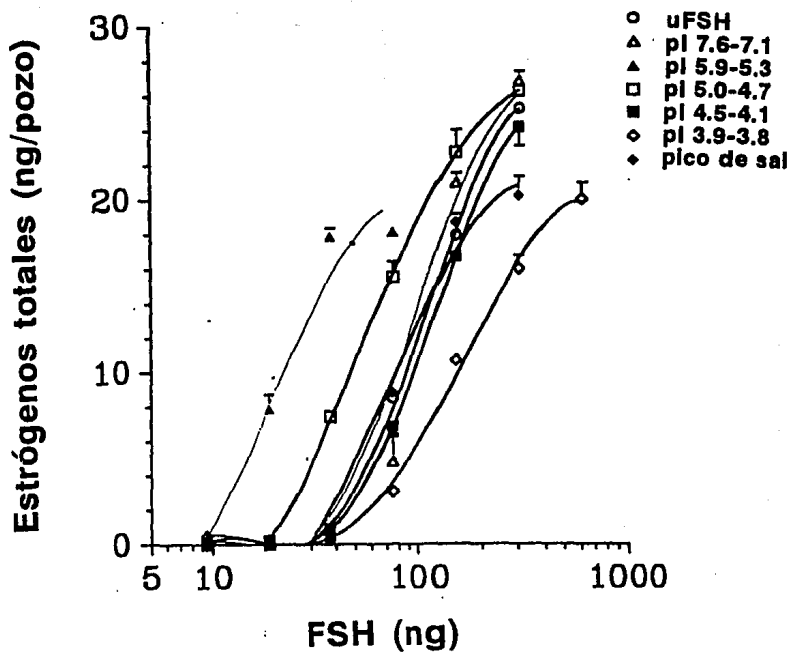
Los resultados de 2 experimentos se muestran en la Figura 14. Tanto los animales tratados con FSH urinaria como los inyectados con una dosis única de las mezclas de isoformas presentaron un aumento significativo ( $p < 0.5$ ) en la producción de tPA, en comparación al testigo salino y a las ratas tratadas únicamente con PMSG. No se encontraron sin embargo diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales tratados con las proporciones 1:1, 1:2 y 1:4 de las isoformas de FSH con valores de pH  $>4.5$  y  $<4.5$  (Figura 15). La isoformas mezcladas en una proporción de 1:8, mostraron una menor potencia para inducir actividad de tPA en comparación con el resto de las mezclas.

**Tabla 4.** Cinética plasmática de las isoformas hipofisarias de hFSH

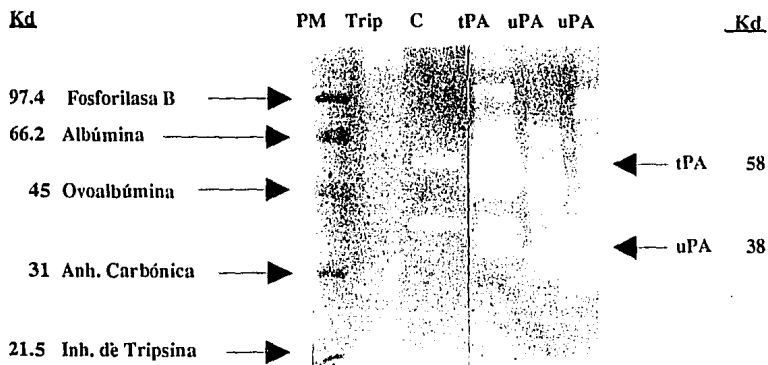
Isoforma (hFSH)	pI (pH)	T <sub>0.05</sub> (min)	TMR (min)
I	7.6-7.1	147.2 <sup>a</sup> ± 18.3	221.6 <sup>a</sup> ± 24.5
II	5.9-5.3	35.4 <sup>b</sup> ± 5.2	44.8 <sup>b</sup> ± 3.4
III	5.0-4.5	43.9 <sup>b</sup> ± 3.4	43.8 <sup>b</sup> ± 3.4
IV	4.4-4.1	76.2 <sup>c</sup> ± 8.6	76.2 <sup>c,d</sup> ± 8.6
V	3.9-3.8	69.1 <sup>c</sup> ± 4.0	69.1 <sup>c</sup> ± 4.0
VI	3.8	101.2 <sup>d</sup> ± 8.7	101.2 <sup>d</sup> ± 8.7

TMR tiempo medio de residencia en el plasma

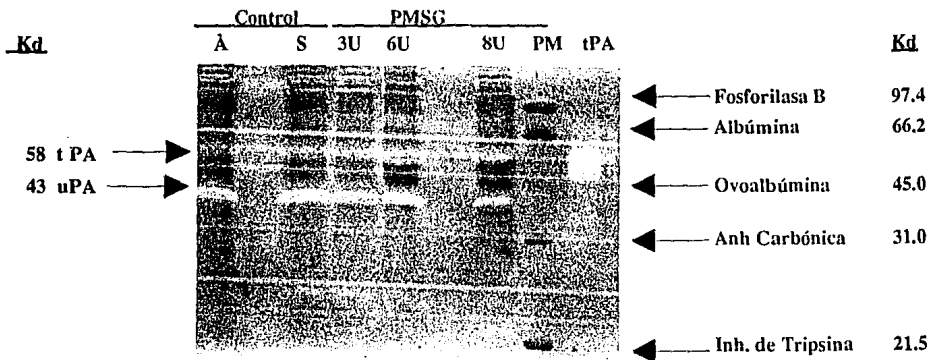
Las columnas identificadas con diferentes letras son estadísticamente diferentes.



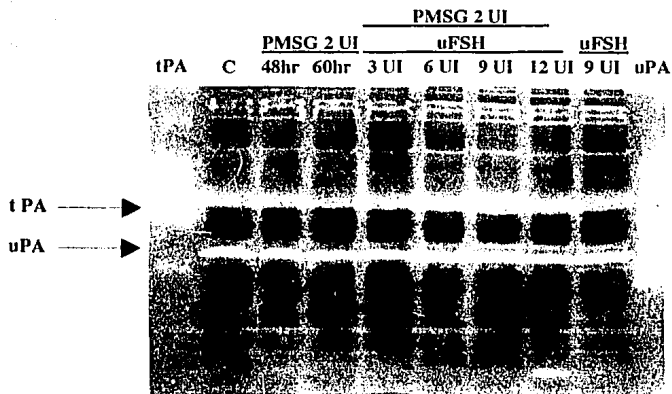
**Figura 10.** Capacidad de cada isoforma de la FSH intrahipofisiaria y de la FSH urinaria para estimular la producción de estrógenos en células de la granulosa de rata en cultivo. Todas las preparaciones fueron analizadas en el mismo bioensayo en incubaciones por triplicado.



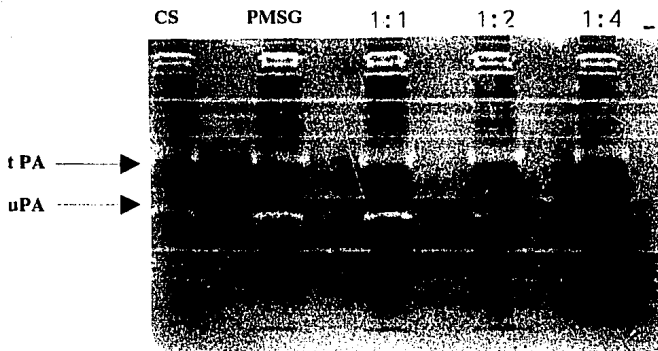
**Figura 11.** Gel de SDS-poliacrilamida al 9% con gelatina y plasminógeno. PM marcador de peso molecular; Trip tripsina; C ovario control; tPA activador de plasminógeno tipo tisular; uPA activador de plasminógeno tipo uroquinasa.



**Figura 12.** Gel de SDS-poliacrilamida al 9% con gelatina y plasminógeno. Los diferentes carriles contienen los homogenizados de ovarios de ratas inmaduras, sacrificadas 56 horas después del estímulo con PMSG a diferentes dosis. Controles: A absoluto, S salino. PM marcadores de peso molecular; tPA activador de plasminógeno tisular; uPA activador de plasminógeno tipo uroquinasa.



**Figura 13.** Gel de SDS-poliacrilamida al 9% con gelatina y plasminógeno. Zimograma representativo de los tPAs ováricos de ratas inmaduras estimuladas con 2UI de PMSG (sacrificadas en diferentes tiempos) y con FSH urinaria (uFSH) a distintas dosis. C control salino; tPA activador de plasminógeno tisular; uPA activador de plasminógeno tipo uroquinasa.



**Figura 14.** Gel de SDS-poliacrilamida al 9% con gelatina y plasminógeno. Zimograma representativo de los tPAs ováricos de ratas inmaduras a las que se les administró 2UI de PMSG, y FSH hipofisiaria a una dosis equivalente de 6UI de uFSH, en proporciones de las isoformas con  $pH > 4.5$  y  $< 4.5$ , equivalentes a 1:1, 1:2 y 1:4. C control salino; tPA activador de plasminógeno tipo tisular; uPA activador de plasminógeno tipo uroquinasa.

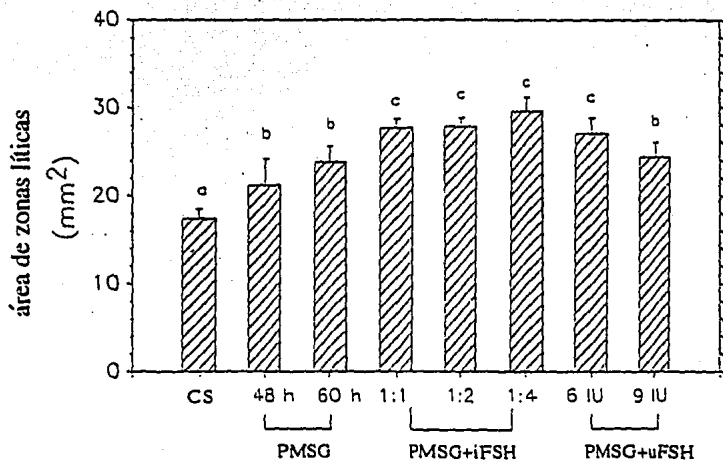


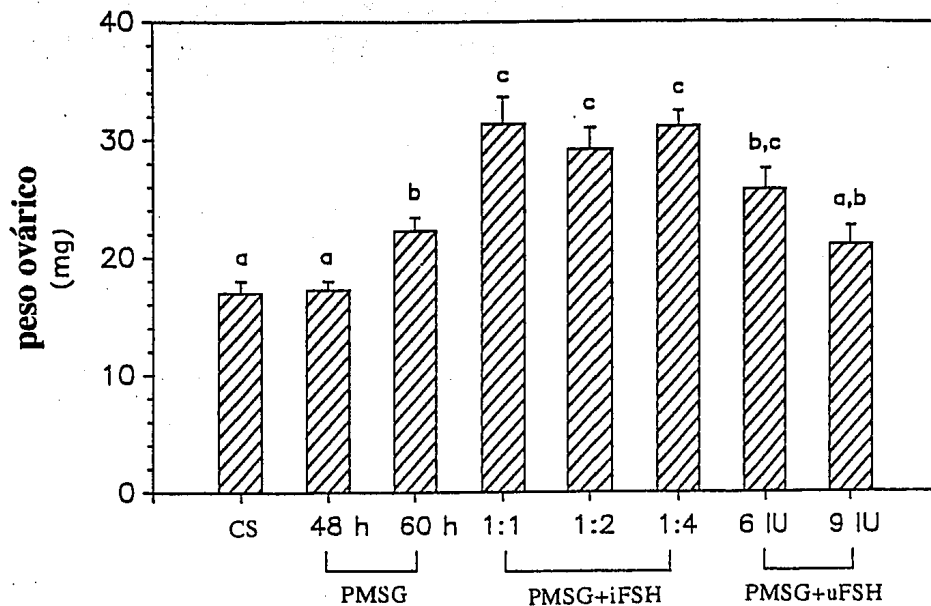
Figura 15. Areas en  $\text{mm}^2$  de las zonas lúteas correspondientes a la actividad enzimática del activador de plasminógeno tisular encontradas mediante geles de SDS-policrilamida de los ovarios de ratas inmaduras estimuladas con 2UI de PMSG, y con FSH hipofisiaria en dosis equivalente a 6UI de uFSH, en proporciones de isoformas  $\text{pH} > 4.5$  y  $< 4.5$ , o con uFSH a diferentes dosis. C control salino. Las barras identificadas con diferentes letras, son estadísticamente diferentes.



## **b. Cambios en el peso ovárico.**

La Figura 16 muestra los pesos de los ovarios de las ratas estimuladas con las diferentes mezclas de las isoformas de la FSH hipofisiaria. Como se puede observar, las ratas tratadas con las isoformas mostraron mayores pesos ováricos que los animales del grupo testigo y los tratados con FSH urinaria. La administración de FSH urinaria a dosis de 6 UI indujo respuestas intermedias entre las del grupo testigo tratado con PMSG, sacrificado a las 56 h y las de los grupos estimulados con las isoformas, en tanto que la respuesta a la dosis de 9 UI no fue diferente de la mostrada por el grupo testigo salino.

En la observación microscópica de los ovarios, no se encontraron signos de ovulación como resultado de los tratamientos administrados. Asimismo, ninguno de los grupos tratados mostró apertura vaginal.



**Figura 16.** Pesos de los ovarios de las ratas estimuladas con 2 UI de PMSG y con las diferentes mezclas de las isoformas de la FSH hipofisiaria a una dosis equivalente de 6UI de uFSH, o estimuladas con uFSH a diferentes dosis. Las barras identificadas con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

## DISCUSION

El presente estudio muestra que la célula productora de FSH es capaz de modular la vida media circulatoria y la intensidad del estímulo gonadotrópico introduciendo cambios en la estructura molecular de la hormona. En efecto, la FSH no sólo es producida sino también secretada por la hipófisis en múltiples formas moleculares. Esta secreción de varias isoformas no es meramente accidental ya que su abundancia relativa varió dependiendo del sexo y del estado endocrinológico de los donadores. Las fases folicular y lútea del ciclo menstrual se caracterizaron por una menor abundancia de isoformas circulantes menos ácidas en tanto que durante el medio ciclo fue evidente la aparición de un aumento en la proporción relativa de estas isoformas. Estos estudios confirman y amplían estudios previos similares en los cuales se analizaron los cambios en la heterogeneidad por carga de la FSH circulante en condiciones basales<sup>(55,76)</sup>. El patrón de heterogeneidad por carga de la FSH del varón fue muy semejante a la presentada por mujeres en las fases folicular y lútea las cuales se caracterizaron (al igual que en los varones) por una baja sensibilidad hipofisiaria al GnRH exógeno. Esta dicotomía sexual en el tipo de moléculas secretadas por la hipófisis femenina del medio ciclo y por la glándula del varón, podría ser explicada por la presencia de diferentes ambientes endocrinos así como por la existencia de distintos patrones de variabilidad en la secreción episódica de la FSH (tónico vs cíclico). De hecho, ha sido demostrado que las moléculas de FSH de hipófisis de varones exhiben una carga media más negativa que las de mujeres en edad reproductiva<sup>(63)</sup>. En animales de experimentación, particularmente en roedores, ha sido posible demostrar la existencia de cambios en la heterogeneidad por carga de la FSH intrahipofisiaria durante el ciclo estral<sup>(9,86)</sup>. Por ejemplo, durante la mañana tardía y la tarde del día del proestro y durante la mañana del estro, la abundancia de las isoformas intrahipofisiarias menos ácidas se incrementa significativamente<sup>(9)</sup>; las isoformas en la rata hembra en estro persistente y de la rata macho adulta son aún más ácidas que las presentadas por la hembra cíclica en los días del diestro<sup>(8,9,67,86)</sup>. Estos resultados colectivamente permiten sugerir que un ambiente rico en esteroides ováricos y en GnRH, favorece la formación y secreción de isoformas de la FSH menos ácidas, en tanto que un medio endócrino caracterizado por la presencia predominante de andrógenos tiende a inducir la producción de isoformas más ácidas, con mayor cantidad de ácido siálico<sup>(7,8)</sup>, de vida media

plasmática prolongada y actividad biológica limitada a nivel de la célula blanco (presente estudio).

Un aspecto controvertido relacionado con la regulación de la síntesis de la FSH es la de los factores específicos involucrados en su variabilidad molecular. Ya que en la mayoría de los estudios (incluyendo el presente), encaminados a caracterizar estos factores, se han empleado modelos con un eje hipófisis-gónada intactos, es difícil definir el papel específico de los esteroides sexuales, péptidos gonadales y del GnRH en la regulación de la heterogeneidad por carga de la FSH. Estudios *in vitro* llevados a cabo en nuestro laboratorio llevan a sugerir que el GnRH es el principal inductor de la producción de isoformas menos ácidas y que los esteroides ováricos (estrógenos y progesterona) y la activina-A, no juegan papel alguno en los cambios estructurales observados en estas condiciones<sub>(87)</sub>. Por otro lado, la infusión de GnRH a ovejas hembra prepúberes se acompaña de un incremento simultáneo en la secreción de isoformas de la FSH menos ácidas<sub>(57)</sub>. La administración de fenobarbital a ratas hembra adultas castradas y tratadas con estradiol, no sólo inhibe el "pico de secreción de la FSH" que habitualmente se observa después de 30 horas del inicio del tratamiento con el esteroide sexual, sino también los cambios en la distribución relativa de sus isoformas hacia isómeros menos ácidos que son observados en ratas no bloqueadas<sub>(88)</sub>. Más aún, la administración de GnRH a ratas bloqueadas con fenobarbital induce una liberación aguda de FSH y concomitantemente un aumento en la producción de isoformas menos ácidas<sub>(88)</sub>. Aún cuando estos resultados llevarían a sugerir que el GnRH es el principal regulador de la producción de isoformas menos ácidas, en un estudio reciente se demostró que la infusión de GnRH a ovejas castradas prepúberes bajo privación nutricional (condición caracterizada por la presencia de hipogonadotropismo grave) no modificó la heterogeneidad por carga de la FSH secretada durante los días de la infusión<sub>(89)</sub>. Los resultados de otra serie de estudios han llevado a sugerir que posiblemente los estrógenos son los responsables de los cambios en la heterogeneidad por carga observados durante el ciclo menstrual. Por ejemplo, la administración de estrógenos a pacientes con disgenesia gonadal induce la secreción de isoformas de la FSH menos ácidas y concomitantemente un incremento en la relación B/I de la hormona circulante<sub>(55)</sub>. Asimismo, Wide y cols. han demostrado que la administración de estrógenos a mujeres postmenopáusicas induce la secreción de isoformas de

FSH cargadas menos negativamente que las de mujeres no tratadas<sup>(90)</sup>. En el presente estudio fue posible observar un aumento en la secreción de isómeros con pI's >4.5 exclusivamente durante el medio ciclo, el cual se caracterizó por presentar una sensibilidad al GnRH aumentada y una alta concentración de estrógenos circulantes; por el contrario durante la fase lútea, en la cual la sensibilidad hipofisaria al GnRH se encontró notablemente disminuida en presencia de altas concentraciones de estradiol y progesterona en suero, no fue posible detectar este incremento en la abundancia de isómeros menos ácidos. Con estos resultados se sugiere que ambos factores, GnRH y estradiol, son los responsables de los cambios en la estructura molecular de la FSH secretada durante el medio ciclo, aún cuando la presencia de altas concentraciones de inhibina<sup>(21)</sup> o de progesterona durante la fase lútea podrían haber contrarrestado o inhibido efectos únicos atribuibles al estradiol.

Varias son las consecuencias fisiológicas que podrían resultar del aumento en la secreción de isoformas menos ácidas de la FSH durante la fase preovulatoria así como del predominio aún mayor de las isoformas fuertemente ácidas durante las fases folicular y lútea. Las isoformas intrahipofisarias menos ácidas poseen una actividad biológica *in vitro* (o sea a nivel de la célula blanco) mayor que las fuertemente ácidas y posiblemente ésta también sea una característica de las isoformas secretadas. Por otro lado, estas isoformas desaparecen más rápidamente de la circulación que sus análogos más ácidos debido a su menor contenido en ácido siálico<sup>(87)</sup>. La combinación de ambas características daría teóricamente como resultado una señal gonadotrópica potente pero breve por parte de las isoformas menos ácidas y este tipo de estimulación podría ser de importancia para el fenómeno de la ovulación durante el medio ciclo. De hecho, durante el medio ciclo se detectó una reducción significativa de la vida media plasmática de la FSH secretada en respuesta al estímulo con 10 µg de GnRH, la dosis mínima requerida para depletar a la hipófisis de LH y posiblemente también de FSH<sub>1(91)</sub>. Por el contrario, las isoformas fuertemente ácidas, aunque menos potentes biológicamente que las básicas, presentan un tiempo de circulación plasmática más prolongado<sup>(68)</sup> y ambas características podrían ser las idóneas para la etapa de crecimiento folicular y la transición lúteo-folicular. Esta posibilidad concordaría con el hallazgo de que la vida media circulante de la FSH secretada en respuesta a la administración de dosis bajas de GnRH en ambas fases fue semejante a la informada en la literatura, la cual es

de aproximadamente 240 minutos<sub>(91)</sub>, pero considerablemente mayor con respecto a la de la hormona secretada durante el medio ciclo en las mismas condiciones experimentales.

Con el objeto de obtener mayor información acerca del posible significado fisiológico de los cambios en la heterogeneidad por carga de la FSH secretada durante las diferentes fases del ciclo menstrual, se estudió la actividad biológica de las diferentes isoformas hipofisarias en condiciones *in vivo*, donde se analizaron los cambios en la actividad del tPA ovárico, enzima proteolítica íntimamente relacionada con el fenómeno ovulatorio. Las isoformas administradas fueron obtenidas mediante CF de extractos hipofisarios ricos en glicoproteínas y su capacidad para estimular *in vitro* a las células de la granulosa fue corroborada previamente a su administración a los animales de experimentación.

La administración de diferentes preparaciones de isoformas hipofisarias de la FSH a ratas hembra inmaduras pretratadas con PMSG indujo incrementos significativos en la actividad del tPA ovárico independientemente de su abundancia en especies más o menos ácidas. Un hallazgo interesante fue el que la administración de preparaciones con un contenido progresivamente menor de isoformas con  $\text{pH} > 4.5$  no se acompañó de disminuciones significativas en el peso ovárico ni en la actividad del tPA sino hasta que su abundancia con respecto a las isoformas más ácidas fue de 11 % del total administrado (preparación con proporción 1:8 de isoformas con  $\text{pH}$  mayor y menor a 4.5). El mantenimiento de esta actividad del tPA en presencia de cantidades progresivamente menores de isoformas menos ácidas, podría ser explicado con base en la mayor potencia biológica que poseen estas isoformas a nivel de la célula blanco, tal y como se sugiere a partir de los estudios *in vitro*. El hecho de que por sus características estructurales (menor contenido de ácido siálico<sub>(6)</sub>) estas isoformas permanecen en la circulación durante periodos relativamente breves, no necesariamente implica que su capacidad para estimular a la célula blanco en condiciones fisiológicas sea proporcionalmente menor que las de vida media más prolongada. De hecho ha sido demostrado que en condiciones *in vivo* formas desializadas de la CG pueden actuar como agonistas completos induciendo una respuesta testicular normal durante las 6 horas siguientes a su administración a pesar de ser depuradas de la circulación en 15 minutos<sub>(92)</sub>. Las variantes menos ácidas podrían permanecer unidas al receptor membranal

durante un periodo de tiempo mayor unidas o alternativamente ser procesadas por la célula más lentamente que sus análogos fuertemente ácidos. Otra explicación para el fenómeno observado en el presente estudio podría ser la presencia de un mayor grado de contaminación con LH en los concentrados de las isoformas menos ácidas, ya que es bien conocido que esta gonadotropina es un fuerte inductor de la actividad del tPA<sub>(47)</sub>. Aún cuando estas observaciones deben ser confirmadas mediante estudios adicionales en los que se administren preparaciones de isoformas de la FSH altamente purificadas, con los hallazgos de este trabajo se sugiere que las isoformas menos ácidas poseen una alta capacidad para inducir la activación del tPA ovárico en condiciones *in vivo* y que la secreción selectiva de estas isoformas podría estar involucrada en los mecanismos que conducen a la ruptura folicular y la ovulación.

## CONCLUSIONES

1. En el humano, la FSH es secretada en diferentes formas moleculares cuya abundancia relativa depende del estado endócrino del donador al momento de la obtención de la muestra.
2. La coexistencia de un ambiente endócrino rico en estrógenos y de una alta sensibilidad hipofisiaria al GnRH, tal y como ocurre durante el periodo periovulatorio, se asocia a un incremento en la secreción de isoformas menos ácidas de la FSH. Este incremento de las formas menos ácidas, puede ser el resultado del aumento en las concentraciones circulantes de estradiol, de la exposición progresivamente mayor al GnRH, o de la acción concertada de ambos factores.
3. El aumento en las concentraciones circulantes de isoformas menos ácidas durante el medio ciclo, podría tener impactos fisiológicos importantes al reducir la vida media circulante de las moléculas secretadas y proveer a la célula blanco de una señal gonadotrópica breve pero de alta potencia biológica.
4. En condiciones *in vivo* las isoformas intrahipofisarias aisladas mediante CF, son capaces de inducir efectos biológicos significativos.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Pierce JG, Parsons TF. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu Rev Biochem**, 50:465-495.
- 2) Shome B, Parlow AF. (1974). hFSH: first proposal for amino acid sequence of the hormone-specific  $\beta$  subunit. **J Clin Endocrinol Metab.**, 39:203-207.
- 3) Esch FS, Mason AJ, Cooksey K, Mercado M, Shimasaki S. (1986). Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the  $\beta$  chain of bovine follicle-stimulating hormone. **J Biol Chem**, 256:5121-5127.
- 4) Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, McWilliams D, Boime I. (1981). A single gonadotropin  $\alpha$ -subunit gene in normal tissue and tumor derived cell lines. **Endocrinology**, 94:655-659.
- 5) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. (1983). Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. **Endocr Rev**, 4:179-211.
- 6) Baenziger JU, Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and tyrotropin. **Biochim et Biophys Acta**, 947:287-306.
- 7) Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. (1984). Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. **Biol Reprod**, 30:382-387.
- 8) Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián Matsumura P, Chappel SC. (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. **Human Rep**, 3:491-501.
- 9) Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Domínguez R. (1988). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. **Biol Reprod**, 38:70-78.
- 10) Hsueh AJW, Bicsak TA, Jia XC, Dahl KD, Fausér BCJM, Galway AB, Czekala N, Pavlou SN, Papkoff H, Keene J, Boime I. (1989). Granulosa cell as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. **Rec Prog Horm Res**, 45:209-277.
- 11) Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF. (1992). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. **J Clin Endocrinol Metab**, 74:600-607.
- 12) Jeffcoate S, Greenwood R, Holland D. (1974). Blood and urine clearance of lutenizing hormone releasing hormone in man measured by radioimmunoassay. **J Endocrinol**, 60:305-309.

- 13) Clayton RN. (1982). Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: Evidence for biphasic regulation. **Endocrinology**, 111:152-155.
- 14) Filicori M, Marseguerra M, Mimmi P, Bolelli G, Franceschetti F, Possati G, Flamigni C. The pattern of LH and FSH pulsatile release: Physiological and clinical significance. In Flamigni C, Givens JR (eds). *The Gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females*, New York, Academic Press, 1982, pp:365-375.
- 15) Clarke IJ, Cummins JT. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized wew. **Endocrinology**, 111:1737-1740.
- 16) Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. **Endocrinology**, 125:917-921.
- 17) Rossmannith WG, Yen SSC. (1987). Sleep-associated decrease in LH pulse frequency during the early follicular phase of the menstrual cycle: Evidence for an opioidergic mechanism. **J Clin Endocrinol Metab**, 65:715-721.
- 18) Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. **Endocrinology**, 109:371-376.
- 19) Mortola JF, Sathanandan M, Pavlou S, Dahl DK, Vale W, Rivier J, Yen SSC. (1989). Suppression of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist: Pharmacodynamic studies. **Fertil Steril**, 51:957-960.
- 20) Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF. (1986). Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, 62:1136-1142.
- 21) Le Nestour E, Marraoui J, Lahlow N, Roger M, De Ziegler D, Bouchard P. (1993). Role of estradiol in the luteal-follicular transition. **J Clin Endocrinol Metab**, 77:439-442.
- 22) Rossmannith WG, Laughlin GA, Mortola JF, Johnson ML, Veldhuis JD, Yen SSC. (1990). Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by the midluteal phase corpus luteum: Temporal link to luteinizing hormone pulses. **J Clin Endocrinol Metab**, 70:990-995.
- 23) Knight PG, Muttukrishna S, Groome N, Webley GE. (1992). Evidence that most of the radioimmunoassayable inhibin secreted by the corpus luteum of the common marmoset is of a non-dimeric, biologically inactive form. **Biol Reprod**, 47:554-560.
- 24) Rabinovici J, Spencer SJ, Doidi N, Goldsmith PC, Schwall R, Jaffe RB. (1992). Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization and regulation of the intact dimer

- in human ovarian cells. *J Clin Invest*, 89:1528-1536.
- 25) Findlay JK. (1993). An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*, 48:15-23.
  - 26) Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzma G. (1993). Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*, 132:431-443.
  - 27) Yen SSC, Jaffe R. (1991). Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management. *W B Saunders Co.* 3a ed USA, pp: 75-108, 115-133, 140-150, 273-308.
  - 28) Policastro P, Ovitt CE, Hoshina M, Fukuoka H, Brothby MR, Boime I. (1983). *J Biol Chem*, 258:11492-11499.
  - 29) Speroff L, Glass RH, Kase NG. (1984). Clinical gynecologic endocrinology and infertility. *Wilkins and Wilkins, Co.* 3a ed USA. pp:1-107.
  - 30) Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5:76-126.
  - 31) Armstrong DT, Papkoff H. (1976). Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle stimulating hormone. *Endocrinology*, 99:1144-1146.
  - 32) Goodman AL, Hodgen GD. (1983). The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*, 39:1-8.
  - 33) Mc Lachlan RI, Cohen NL, Dahl KD, Bremmer WJ, Soules MR. (1990). Serum inhibin levels during the periovulatory interval in normal women: Relationships with sex steroid and gonadotrophin levels. *Clin Endocrinol*, 32:39-45.
  - 34) Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh TH. (1983). Intraovarian mechanism in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. *J Reprod Fertil*, 69:325-329.
  - 35) Fraser HM, Lunn SF. (1993). Does inhibin have an endocrine function during the menstrual cycle? *Trends Endocrinol Metab*, 4(6):187-194.
  - 36) Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC. (1983). Hormonal dynamics at midcycle: A reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*, 57:792-796.
  - 37) Lipner H. Mechanism of mammalian ovulation, Knobil E, Neill JD. The physiology of Reproduction. *Raven Press*, New York, USA, 1988, pp:447-477.
  - 38) Stryer L. Biochemistry. 3a ed. *Ed Freeman*, USA, 1988, pp:256-261.
  - 39) Queenan AB, Kao LC, Arboleda CE, Ulloa-Aguirre A. (1987). Regulation of urokinase type plasminogen activator production by cultured human cytotrophoblasts. *J Biol Chem*, 262:10903-10917.
  - 40) Ny T, Liu YX, Ohlsson M, Peng XR, Jia XC, Hsueh AJW. (1991). Hormone regulation

- of tissue type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type I gene expression in the ovary. **Simposio Sero**. pp:77-84.
- 41) Canipari R, Strickland S. (1985). Plasminogen activator in the rat ovary. **The Journal of Biological Chemistry**, 260(8):5121-5125.
  - 42) Beers WH, Strickland S, Reich E. (1975). Ovarian plasminogen activator: relationship to ovulation and hormonal regulation. **Cell**, 6:387-394.
  - 43) Liu YX, Cajander SB, Ny T, Kristensen P, Hsueh AJW. (1987). Gonadotropin regulation of tissue type and urokinase type plasminogen activators in rat granulosa and theca interstitial cells during the periovulatory period. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 54:221-229.
  - 44) Reich R, Miskin R, Tsafirri A. (1985). Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. **Endocrinology**, 116(2):516-521.
  - 45) Tsafirri A, Bicsak TA, Cajander SB, Ny T, Hsueh AJW. (1989). Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue-type plasminogen activator and alpha 2-antiplasmin. **Endocrinology**, 124(1):415-421.
  - 46) Strickland S, Beers WH. (1976). Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. **The Journal of Biological Chemistry**, 251:5694-5702.
  - 47) Wang C, Leung A. (1983). Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. **Endocrinology**, 112(4):1201-1207.
  - 48) Galway AB, Lapolt PS, Tsafirri A, Dargan CM, Boime I, Hsueh AJW. (1990). Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, 127(6):3023-3028.
  - 49) Mc Lachlen RI, Cohen NL, Vale WW, Burger JE, Bremner WJ, Soules MR. (1989). The importance of LH in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum. **J Clin Endocrinol Metab**, 68:1078-1081.
  - 50) Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigle ME, Reid RL, Yen SSC. (1987). Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. **J Clin Endocrinol Metab**, 64:1109-1115.
  - 52) Chappel SC, Bethea CL, Spies HG. (1984). Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of Cynomolgus monkeys. **Endocrinology**, 115:452-461.
  - 53) Foulds LM, Robertson DM. (1983). Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) from male and female rats. **Mol Cell Endocrinol**, 31:117-130.
  - 54) Hard K, Mekking A, Damm JBL, Kamerling JP, De Boer W, Wijnans RA, Vliegenthart JFG. (1990). Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. **Eur J Biochem**, 193:262-271.

- 55) Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, 67:465-473.
- 56) Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, Brown MB, Ridings JW, Beitins IZ. (1991). Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cell. **Mol Cell Endocrinol**, 79:119-128.
- 57) Padmanabhan V, Mieher CD, Borondy M, Ianson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ. (1992). Circulating bioactive FSH and less acidic FSH isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. **Endocrinology**, 131:213-220.
- 58) Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. (1982). Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. **J Endocrinol**, 95:257-266.
- 59) Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. (1992). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, 7(1):23-30.
- 60) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. (1983). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. **Endocrine Rev**, 4(2):179-211.
- 61) Wide L. (1982). Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. **J Clin Endocrinol Metab**, 55:682-688.
- 62) Wide L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. **Acta Endocrinol**, 109:181-189.
- 63) Wide L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. **Acta Endocrinol**, 109:190-197.
- 64) Wide L. (1989). Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. **J Endocrinol**, 123:519-529.
- 65) Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. (1992). Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. **Human Reproduction**, 7(10):1371-1378.
- 66) Chappel SC, Coutifaris C, Jacobs SC. (1982). Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. **Endocrinology**, 110:847-854.
- 67) Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz Sánchez V, Larrea F. (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat:isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. **J Endocrinol**, 110:539-549.

- 68) Blum W, Gupta D. (1985). Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. **J Endocrinol**, 105:29-37.
- 69) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. (1983). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. **Biol Reprod**, 28:196-205.
- 70) Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, Chappel S. (1983). Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity assesment of biological activities of each follicle-stimulating hormone form. **Fertil Steril**, 40:242-247.
- 71) Wide L, Hobson BM. (1983). Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. **J Clin Endocrinol metab**, 56:371-375.
- 72) Khan SA, Katzija G, Froysa B, Diczfalusy E. (1984). Characterization of various molecular species of follicle stimulating hormone in Baboon pituitary preparations. **J Med Primatol**, 13:295-304.
- 73) Wide L, Hobson B. (1986). Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. **Acta Endocrinol (Copenh)**, 113:17-22.
- 74) Wide L, Hobson B. (1986). Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. **Acta Endocrinol**, 113:17-22.
- 75) Wide L, Albertsson-Wikland K. (1990). Change in the electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. **J Clin Endocrinol Metab**, 70:271-276.
- 76) Wide L, Bakos O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular of luteal phase. **J Clin Endocrinol Metab**, 76:885-893.
- 77) Jones LR, Benker G, Salacinski PR, Lloyd TJ, Lowry PJ. (1979). Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. **J Endocrinol**, 82:77-86.
- 78) Jia, XC, Hsueh AJ W. (1986). Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. **Endocrinology**, 119:1570-1577.
- 79) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. (1963). The preparation of 131-I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem J**, 89:114-123.
- 80) Veldhuis JD, Johnson ML. (1988). A novel general biophysical model for simulating episodic endocrine gland signaling. **Endocrinol Metab**, 18:E749-E759.
- 81) Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**,

- 82) Granelli-Piperno A, Reich E. (1978). A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J Exp Med*, 148:223-234.
- 83) Heussen C, Dowdle EB. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*, 102:196-202.
- 84) Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680.
- 85) Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL. (1990). WHO Programme for the provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of hormones in Reproductive Physiology. *Method Manual*. 14 ed, pp:58-63.
- 86) Ulloa-Aguirre A, Damián Matsumura P, Espinoza P, Domínguez R, Morales L, Flores A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol*, 126:323-332.
- 87) Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damián-Matsumura P. (1992). Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cell in culture. *Journal of Endocrinology*, 134:97-106.
- 88) Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. (1983). Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol*, 99:31-39.
- 89) Hassing JM, Kletter GM, I'anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL, Padmanabhan V. (1993). Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle stimulating hormone (FSH) isoform distribution pattern of pituitary of circulating FSH in nutritionally growth restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology*, 132(4):1527-1536.
- 90) Wide L, Bengtsson C, Naessén T. Estradiol induces secretion of more basic isoforms of both FSH and LH in postmenopausal women. En: *75th Annual Meeting of the Endocrine Society*. Las Vegas, Nevada. 1993, pp:316.
- 91) Reyes-Fuentes A, Veldhuis JD. (1993). Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. *Neuroendocrinology II*, 22(1):93-124.
- 92) Urban RJ, Padmanabhan V, Beitins I. (1991). Metabolic clearance of human follicle stimulating hormone assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay, and in vitro Sertoli cell bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 73:818-821.