

51  
Res



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

MICROHETEROGENEIDAD DE LA HORMONA  
FOLICULO ESTIMULANTE INTRAPITUITARIA, A  
LO LARGO DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
EDGAR RICARDO ESPINOZA TRUJILLO



MEXICO, D. F.



1988

FALLA DE ORIGEN

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Edgar Ricardo Espinoza Trujillo

con número de cuenta 8052976-3 con el Título: \_\_\_\_\_

" MICROHETEROGENEIDAD DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE INTRA-  
PITUITARIA, A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA "

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de B I O L O G O

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
DR.	ALFREDO ANTONIO	ULLOA AGUIRRE	<i>[Firma]</i>
Director de Tesis	Q.F.B. JOSE LUIS	SILENCIO BARRITA	<i>[Firma]</i>
DRA. en C.	MARIA GENOVEVA	GONZALEZ MORAN	<i>[Firma]</i>
BIOL.	ENRIQUE	MORENO SAENZ	<i>[Firma]</i>
Suplente	DRA. en C. MARTHA	CALAHORRA FUERTES	<i>[Firma]</i>
Suplente			

## DEDICATORIA

*A mis padres*

*A mis abuelos*

*A mis hermanos*

*A Adriana*

*A mis tíos y primos*

*A mis amigos*

*y a ti hija mía,*

*que eres lo que más amo en  
esta vida y lo más preciado  
que Dios me ha dado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*El presente trabajo se realizó 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 dirección del Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre, a quien agradezco sincera y respetuosamente su contribución en mi formación profesional.*

*Mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su tiempo, su asesoría, su estímulo y su apoyo; en especial a mis compañeros y amigos Jesús Mejía, Rosa María Oñari, Arcelia Escorza, Pablo Damían Matsumura, Aidel Cravoto, Angélica Flores, Leticia Morales, Lourdes Boeck, Martha Menjivar y Elena Zambrano, así como al Dr. Fernando Larrea G. y al Dr. Roberto Domínguez Casald.*

*- Agradezco también al honorable jurado por su tiempo, crítica y consejo.*

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	3
<b>I.- Eje Hipotálamo-Hipofisis-Gónada</b> .....	4
<b>II.- Ciclo Estral</b> .....	10
<b>III.- Hormona Folículo Estimulante</b> .....	14
1. Estructura.....	14
2. Biosíntesis y Secreción.....	16
3. Mecanismo de Acción Hormonal.....	20
4. Función de la FSH.....	21
a) Acción en el ovario.....	22
b) Acción en el testículo.....	23
<b>ANTECEDENTES</b> .....	25
Microheterogeneidad de la FSH.....	25
<b>HIPOTESIS</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIAL Y METODOS</b> .....	31
<b>ANALISIS ESTADISTICOS</b> .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	39
<b>DISCUSION</b> .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	51

## RESUMEN

Se obtuvieron hipófisis anteriores (AP) de ratas hembra adultas en diferentes días y tiempos del ciclo estral. Las isohormonas de la hormona estimulante del folículo (FSH) fueron separadas por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (IEF-GEPA rango de pH de 3.5 a 9.5). Los geles fueron fraccionados y analizados en su contenido de FSH por radioinmunoanálisis (RIA) y radioreceptor (RRA). Todos los extractos hipofisarios presentaron varias isoformas de FSH inmunoactivas dentro de un rango de pH de 6.2 - 4.0; la isoforma principal, presentó constantemente un punto isoelectrico (pI) de 4.9 - 4.5.

Para cuantificar diferencias en el patrón de heterogeneidad por carga de la FSH hipofisaria entre las glándulas pituitarias colectadas durante los diferentes días del ciclo, cada perfil de IEF-GEPA fué dividido en siete áreas o regiones: área 1= punto isoelectrico pI de 7.0 a 6.3; área 2= pI de 6.2 a 5.5; área 3= pI de 5.4 a 5.0; área 4= pI de 4.9 a 4.5; área 5= pI de 4.4 a 4.0; área 6= pI de 3.9 a 3.5 y área 7= pI < 3.5, y la cantidad de FSH presente dentro de cada una de la áreas fué cuantificada. En todas las hipófisis colectadas a las 09:00 hrs de los cuatro días del ciclo [diestro 1 (D1), diestro 2 (D2), proestro (P), y estro (E)], a las 13:00 hrs del D1, D2 y E, a las 22:00 hrs del proestro (P) y a las 02:00 de la mañana del estro (E), la mayor proporción de FSH inmunológicamente activa (del 37 al 55% del total de FSH sobre el gel) enfocó dentro del área 4, mientras que las áreas 2 y 3 presentaron menores cantidades de FSH inmunoactiva (del 11 al 26% y del 14 al 24% respectivamente).

Sin embargo, en las hipófisis colectadas a las 11:00, 13:00 y 18:00 hrs del día del proestro (P), se detectó un incremento significativo en el contenido de FSH dentro del área 2 [del 30% del total sobre gel,  $p < 0.05$  contra los grupos restantes en la misma área (P, D1, D2 y E a las 09:00 hrs, P a las 22:00; E a las 02:00 de la mañana; D1, D2 y E a las 13:00 hrs]. El pico de FSH encontrado en este punto isoeléctrico (pI) menos ácido fué diferente de aquel encontrado dentro del área 4 no solamente en su punto isoeléctrico (pI) sino también en su capacidad de unión al receptor, (relación RRA:RIA del área 2=  $7.0 \pm 2.7$ ; y del área 4=  $4.3 \pm 1.0$ ,  $p < 0.05$ ) así como su comportamiento en Concanavalina-A (Con-A), (relación FSH-libre: FSH-unida área 2=  $0.14 \pm 0.01$ ; relación FSH-libre:FSH-unida área 4=  $0.40 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:**

- 1) Este estudio indica que las hipófisis anteriores poseen la capacidad para sintetizar formas específicas de FSH que poseen potencia biológica y vida media en plasma únicas.
- 2) Posiblemente estas formas son eventualmente secretadas hacia la circulación en momentos determinados del ciclo estral, para ejercer acciones específicas durante la maduración y/o la ovulación.
- 3) A diferencia de informes anteriores, en el presente estudio la recolección de las muestras se llevó a cabo con una mayor frecuencia.

## **INTRODUCCION**

En los mamíferos, la reproducción incluye una serie de mecanismos sumamente complejos que implican la secreción de múltiples mensajeros químicos, conocidos con el nombre de hormonas.

Tal como las definió Ernest Starling a principios del siglo, las hormonas son secretadas por glándulas especializadas que carecen de conductos (glándulas endócrinas) y se transportan a través del torrente sanguíneo para ejercer sus efectos específicos en células de tejidos lejanos. Un ejemplo lo encontramos en la hormona estimulante del folículo (FSH), la cual se secreta de la porción anterior de la hipófisis y estimula a las células de los folículos en el ovario. Una hormona se define mejor considerando su acción, más que su lugar de origen: Es una sustancia que induce el crecimiento, la diferenciación y/o alteración de la actividad metabólica de las células.

La capacidad de reproducción de un individuo depende completamente de las hormonas; hipofisarias y gonadales en su ausencia no se lleva a cabo la producción y/o maduración de los gametos así como el desarrollo y maduración de otros órganos esenciales para el embarazo como el endometrio.

Después de que se producen en sus respectivas glándulas endócrinas, las hormonas proteínicas a menudo se almacenan por un tiempo dentro de la glándula hasta que se requiera su secreción. Una de las características de la mayoría de las hormonas reproductoras es que están concentradas en los tejidos específicos u órganos blanco. La captación de una hormona del torrente sanguíneo y su retención dentro de las células de los órganos blanco, depende de la existencia de un sitio receptor

específico para cada una de ellas <sup>(4)</sup>.

## **I. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada**

La regulación de la actividad hormonal relacionada con la reproducción de los mamíferos, se realiza a través de un complejo sistema de interrelaciones y autorregulaciones entre las hormonas sexuales y otros productos de secreción tubular y folicular con el sistema nervioso central (SNC), específicamente con la unidad hipotálamo-hipofisiaria <sup>(18, 1) (Fig. No. 1)</sup>.

La hipófisis es una glándula de secreción endócrina que se encuentra situada por debajo de la base del encéfalo y tiene como función la producción y liberación de una serie de hormonas que regulan diversas actividades corporales, estas van desde el crecimiento hasta la reproducción, función en donde desempeñan un papel fundamental <sup>(30, 35, 58)</sup>.

De acuerdo con su origen embrionario, se pueden distinguir en la hipófisis una porción anterior o adenohipófisis y una porción posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis está formada de al menos 6 tipos celulares diferentes <sup>(35, 37)</sup>. De estas las FSH y LH son sintetizadas en un mismo tipo celular y son conocidas con el nombre genérico de gonadotropinas, ya que a través de los vasos sanguíneos llegan hasta las gónadas (ovarios y testículos), sus órganos blanco, es decir los sitios hacia donde dirigen su mensaje con el fin de desencadenar una respuesta biológica específica.

La secreción de las hormonas de la adenohipófisis no es independiente ya que el hipotálamo ejerce una actividad reguladora sobre la secreción de las mismas <sup>(88)</sup>.

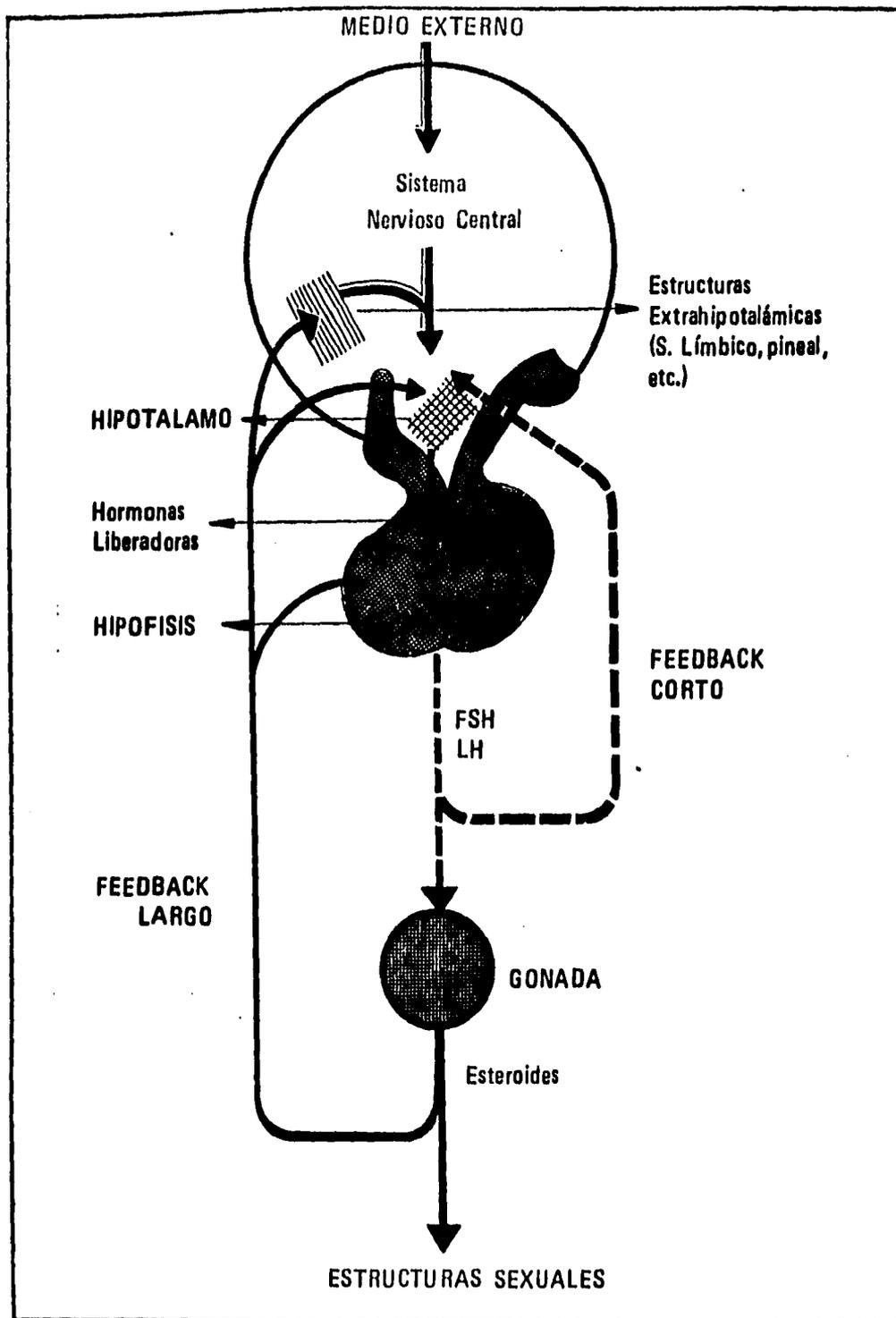


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

No obstante que este hecho fue conocido desde hace ya varias épocas, su mecanismo exacto solamente ha podido ser dilucidado recientemente. El primer enigma que ofrecía el fenómeno de la regulación hipotalámica de la actividad adenohipofisiaria era la falta de terminaciones nerviosas que, originadas en neuronas hipotalámicas, terminaran en la adenohipófisis, tal como es el caso del sistema hipotálamo-neurohipofisiario. El enigma se resolvió con la descripción hecha por Popa y Fielding del sistema vascular porta hipotálamo-hipofisiario; estos investigadores describieron detalladamente el sistema vascular que conectaba el hipotálamo con la adenohipófisis <sup>(65)</sup>. Años después Wislocki y King <sup>(67)</sup> y Green y Harris <sup>(34)</sup> demostraron que el sentido de la corriente sanguínea en dicho sistema, era desde el hipotálamo hacia la adenohipófisis. Con todo esto Green y Harris formularon la siguiente hipótesis sobre el mecanismo de dicha regulación: el hipotálamo produciría sustancias que una vez secretadas entrarían en la circulación del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario, llegarían a la adenohipófisis, y estimularían la secreción de las distintas trofinas hipofisiarias<sup>(33)</sup>. La sustancia presumiblemente responsable de dicha acción fue llamada "factor liberador de ACTH". En 1960 Mc Cann y Taleisnik <sup>(53)</sup> y en 1961 Harris <sup>(38)</sup>, demostraron que el hipotálamo contenía un factor que estimulaba la secreción de LH. Poco tiempo después se demostró también que el hipotálamo contenía un factor que estimulaba la secreción de FSH por la hipófisis <sup>(55)</sup>. En 1969 Boler y cols <sup>(11)</sup> y Burgus y cols. <sup>(14)</sup> demostraron independientemente, que dicha sustancia era un tripéptido compuesto de ácido (piro)glutámico-histidina y prolinamida, en esta secuencia. A fines de 1970, esta sustancia se denominó hormona liberadora de LH y FSH: LH/FSH-RH o GnRH.

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) extraída del hipotálamo de cerdos y de ovejas es un decapeptido idéntico para ambas especies y contiene la

siguiente secuencia de aminoácidos: Acido(piro)glutámico-histidina-triptofano-serina-tirosina-glicina-leucina-arginina-prolina-glicinamida. La porción de dicho decapeptido primordialmente involucrada en su actividad biológica liberadora de gonadotrofinas parece ser la secuencia de ácido(piro)glutámico-histidina-triptofano. Esto queda comprobado por el hecho de que la remoción de cualquiera de estos tres aminoácidos y su reemplazo por otros, tiene como consecuencia la pérdida casi total de la actividad biológica del decapeptido; sin embargo, el tripéptido aislado conteniendo los tres aminoácidos mencionados no posee actividad biológica. Ello significaría que la secuencia de los 7 aminoácidos restantes es necesaria para que el decapeptido pueda actuar sobre los mediadores de su acción a nivel hipofisario, a pesar de que el reemplazo parcial de alguno de estos 7 aminoácidos restantes no lleve a la pérdida total de la actividad biológica.

La GnRH actúa directamente sobre la adenohipófisis. Los hallazgos de diversos autores <sup>(51)</sup>, indicarían que la GnRH produciría primariamente una despolarización a nivel de la membrana de las células hipofisarias productoras de gonadotropinas, alterando su permeabilidad a algunos iones y permitiendo la entrada de calcio a la célula, lo cual activaría el proceso de liberación de los gránulos de secreción que contienen las gonadotrofinas. Si bien el efecto principal de GnRH parece ser sobre la secreción de gonadotrofinas, este decapeptido es capaz también de estimular la síntesis de FSH y LH <sup>(68)</sup>.

El hipotálamo recibe influencias provenientes de otros sectores ya sea del sistema nervioso central o del sistema endócrino, que modifican su influencia reguladora sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias. Existe una diferencia fundamental entre el funcionamiento del hipotálamo en el macho y en la hembra. Mientras en el macho, la secreción de gonadotrofinas y por ende la del estimulante específico

de su secreción GnRH, fluctúa dentro de un rango limitado, en la hembra, la secreción de GnRH y de gonadotrofinas sufre una descarga muy amplia en forma cíclica, una vez en cada ciclo estral <sup>(22)</sup>.

Varios grupos de investigadores han demostrado que las concentraciones de gonadotrofinas no son constantes sino que por el contrario fluctúan dentro de un rango limitado <sup>(57,26)</sup>. Este hallazgo se comprobó en ambos sexos, tanto en otras especies animales como en la especie humana. Parecería entonces que el estímulo hipotalámico sobre la secreción adenohipofisaria no es continua, sino que se ejerce en forma pulsátil o episódica.

Por otro lado, es un hecho ya comprobado que el hipotálamo contiene receptores para los esteroides gonadales <sup>(45)</sup>. En ciertas condiciones, además de su efecto de retroalimentación negativo, los estrógenos pueden ejercer un efecto de retroalimentación positivo, es decir que pueden estimular la secreción de GnRH <sup>(51)</sup>. Eso es lo que sucedería en la etapa preovulatoria en la mujer normal y en las distintas especies animales en las cuales se ha detectado la existencia de un pico de estrógenos en suero, previo al pico de FSH y LH. Dicho aumento brusco de estrógenos en sangre circulante desencadenaría a su vez una brusca liberación de GnRH, que sería la responsable de los picos de LH y FSH, cuya presencia está bien documentada en la etapa preovulatoria <sup>(13)</sup>.

Las investigaciones recientes de Kamberi y Porter <sup>(43)</sup> sugieren que el posible mediador químico que estimularía la liberación de GnRH por el hipotálamo sería la dopamina. En efecto, la administración de esta sustancia por distintas vías estimula la liberación de GnRH, cuyo aumento es detectable a nivel de la sangre del sistema vascular hipotálamo-hipofisario en la rata <sup>(44)</sup>. La inyección de dopamina directamente en los vasos hipofisarios, por el contrario, no produjo

modificaciones en los niveles de gonadotrofinas circulantes <sup>(43)</sup>. Ello significaría que la dopamina no actuaría directamente sobre la hipófisis en lo que a secreción de gonadotrofinas se refiere.

Por otro lado, también se ha observado, que la respuesta hipofisiaria a GnRH varía según las distintas condiciones fisiológicas del organismo. Debeljuk y cols <sup>(24)</sup>, demostraron que la respuesta máxima se observó entre los 25 y 45 días de edad en la rata macho, siendo dicha respuesta significativamente menor en el animal adulto. En la rata hembra en cambio, la respuesta máxima se observó entre los 15 y 25 días de edad, decayendo luego significativamente <sup>(25)</sup>. De estos experimentos se evidencia entonces que el animal adulto tiene una sensibilidad hipofisiaria a la GnRH disminuida con respecto al animal durante el período puberal.

La sensibilidad hipofisiaria a GnRH varía también según el estadio del ciclo sexual del animal. Tanto en ratas como en hamsters, la respuesta máxima a GnRH se observó durante el proestro, es decir en el período previo a la ovulación, en el que la hipófisis está preparada para liberar gonadotrofinas en gran cantidad <sup>(2)</sup>.

Finalmente se puede decir entonces que, el control global de la secreción gonadotrópica depende de la interrelación coordinada entre la GnRH hipotalámica, las gonadotrofinas adenohipofisarias y los esteroides sexuales que se producen en las gónadas, mediante una serie de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.

El medio ambiente y sus condiciones de iluminación, temperatura, etc. son conocidas como posibles condicionantes de la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario. El "stress" psíquico o físico y las agresiones externas son capaces de modificar la actividad hipotálamo-hipofisiaria.

## **II. Ciclo Estral**

Una vez que se llega a la pubertad hay mucha variación entre las diferentes especies en cuanto al tiempo en que las hembras aceptan a los machos para copular, a este estado se le conoce como celo, o estro <sup>(3)</sup>.

El tiempo de duración y las manifestaciones externas del estro difieren en las diversas especies animales, pero un hecho común es la disponibilidad de la hembra para aceptar al macho <sup>(49)</sup>. En algunas especies hay alteraciones en los genitales externos, además de las del temperamento, detectándose más frecuentemente a la hembra en celo por su reacción hacia los machos y la atracción de estos hacia ella.

El período de tiempo comprendido entre un calor o estro y el siguiente, se conoce con el nombre de ciclo estral <sup>(49)</sup>. Algunos mamíferos tienen más de un estro anual. Estos animales son poliestrales. En algunos casos (vaca, cerdo, rata, ratón) los ciclos se suceden ininterrumpidamente mientras no haya preñez, en otras los estros tienen relación con las estaciones y presentan dos, tres o cuatro ciclos al año, a estas especies se les conoce como poliestrales estacionales (yegua, oveja). Los que sólo tienen un ciclo anual son monoestrales <sup>(49)</sup>.

El período de celo es corto, en la mayoría de los mamíferos hay períodos más largos en los que la hembra no copula <sup>(3)</sup>. En los mamíferos domésticos el estro suele coincidir con la ovulación, esta sincronía es importante para asegurar que tanto el óvulo como el espermatozoide estarán presentes en el tiempo y lugar para la fertilización. Esta sincronización es esencial para mantener una tasa alta de fertilización, ya que la vida funcional del óvulo y del espermatozoide en el tracto reproductor femenino está limitado por un período de tiempo muy corto después

de la ovulación <sup>(49)</sup>. La rata de laboratorio ha sido el modelo ideal de los endocrinólogos durante varias décadas y todas las ideas acerca del ciclo estral realmente se han derivado de su estudio. Al igual que la mujer y la oveja, la rata ovula espontáneamente, sin embargo difiere de ellas en que presenta ciclos estrales extremadamente cortos de sólo cuatro o cinco días de duración; ésto se debe a que los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero si hay copulación durante el celo, este acto estimula el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional y entonces la rata tiene una preñez o una pseudopreñez, dependiendo de si la copulación fue fértil o no <sup>(4)</sup>.

En la rata, al igual que en los demás mamíferos no primates, los cambios periódicos en el "ciclo estral" (peso y distensión uterina, citología vaginal y comportamiento sexual) son utilizados como indicadores biológicos de las fluctuaciones en la secreción de las hormonas ováricas como reflejo de las variaciones en la secreción de las gonadotropinas <sup>(28)</sup>. En la rata la duración del ciclo estral es de 4 ó 5 días. Los primeros dos o tres días del ciclo corresponden a los períodos conocidos como diestro 1, diestro 2 respectivamente, mientras que los dos últimos como proestro y estro <sup>(28)</sup>.

La forma más común que se acostumbra para determinar el estudio del ciclo estral de la rata, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero es el tipo celular predominante el que indicará la etapa del ciclo estral en que se encuentre. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal de rata son: a) células epiteliales basales o nucleadas, b) leucocitos polimorfonucleares y c) células epiteliales superficiales o escamas. Sin embargo, esto no se puede utilizar con todos los mamíferos. En rumiantes, en la cerda y en la

yegua, el epitelio vaginal no refleja actividad ovárica <sup>(49)</sup>.

En la rata intacta con ciclos regulares de 4 días de duración, se observan las siguientes características: Durante el diestro 1 (D1) los niveles circulantes de estrógenos se mantienen bajos al igual que los niveles plasmáticos de FSH y LH, no obstante, los niveles de progesterona se encuentran elevados. El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de leucocitos y células nucleadas. En el ovario se observan folículos en crecimiento con antro pequeño <sup>(28) (Fig. No. 2)</sup>. En el día del diestro 2 (D2), la secreción de estrógenos es mayor sobre todo por la tarde, mientras que las concentraciones plasmáticas de FSH y LH son semejantes a las del diestro 1. Los niveles séricos de progesterona disminuyen progresivamente hasta alcanzar un nivel relativamente bajo. En el frotis vaginal se observa predominancia de leucocitos en relación a las células nucleadas. Los folículos ováricos continúan su proceso de desarrollo y aumenta el número de folículos con antro grande <sup>(28,7,62)</sup>. Es durante la mañana del proestro (P) que la concentración plasmática de estrógenos aumenta bruscamente, permanece elevada por algunas horas y declina rápidamente a partir de las 14:00 hrs. Dicho incremento en los niveles circulantes de estrógenos provoca, por un lado, el abultamiento máximo del útero y en consecuencia un aumento en su peso, y por otro lado la liberación de LRH al sistema portal hipofisiario <sup>(28)</sup>. Como resultado del efecto de la LRH, la concentración plasmática de LH se incrementa significativamente entre las 14:00 y las 15:00 hrs, alcanza su máximo valor entre las 17:00 y las 18:00 hrs y disminuye drásticamente a partir de las 23:00 hrs. La progesterona también incrementa dramáticamente su concentración entre las 14:00 y las 18:00 hrs como consecuencia del aumento de LH, y no es sino hasta la madrugada del día del estro (01:00 hrs) que disminuye su concentración hasta alcanzar niveles bajos. En cuanto a la FSH, su concentración plasmática se incrementa significativamente entre las 14:00 y las

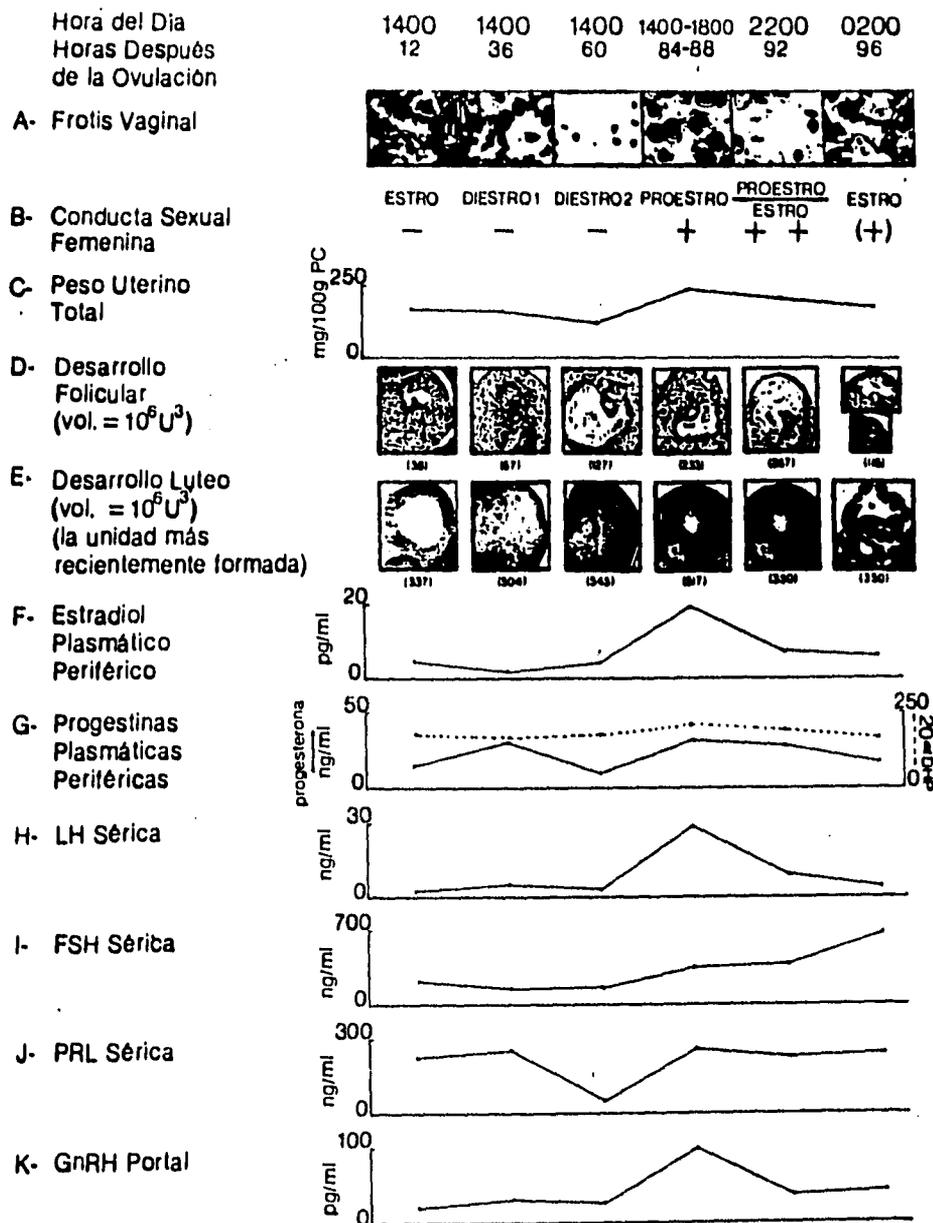


Figura 2. Secuencia de eventos en el ciclo estral de la rata (4 días de duración). El término Diestro 1 es sinónimo de lo que muchos autores llaman metestro.

16:00 hrs y alcanza su máximo valor entre las 19:00 y las 21:00 hrs, manteniéndolo así por el resto de la noche. Esta liberación brusca de FSH se produce varias horas antes de la ovulación <sup>(28)</sup>. En la citología vaginal se observa la presencia de células epiteliales nucleadas y en ocasiones de células anucleadas denominadas escamas. En el ovario la mayor parte de los folículos en crecimiento con capacidad de ovular han alcanzado su tamaño máximo y se les denomina folículos preovulatorios <sup>(28,62)</sup>.

Finalmente, la ovulación ocurre en la madrugada (01:00 hrs) del día del estro (E). Los niveles circulantes de estrógenos, LH y progesterona son bajos. Sin embargo los de FSH, que aún se mantienen elevados, presentan una segunda descarga brusca (04:00 hrs a 05:00 hrs); a partir de este momento se observa el descenso gradual en la concentración de la hormona. La FSH es regulada no sólo por esteroides sexuales, sino también por la inhibina <sup>(52)</sup>. Las variaciones en este último factor pueden determinar en parte las diferencias entre los patrones de secreción de la FSH y de LH. En el frotis vaginal se observan células anucleadas (escamas) <sup>(28)</sup>

(Fig. No. 2)

### **III.- Hormona Folículo Estimulante (FSH).**

#### **1.- Estructura:**

La FSH es una glicoproteína heterodimérica compuesta de dos subunidades designadas como  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por una asociación no covalente de alta afinidad que estabiliza la estructura de la molécula. La estructura de la cadena  $\alpha$  es común en las tres hormonas glucoprotéicas producidas por la hipófisis anterior, LH, FSH y TSH <sup>(18)</sup>, así como las gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por la placenta, mientras que la subunidad  $\beta$  es específica para cada una de estas

hormonas y les confiere especificidad biológica e inmunológica <sup>(63,27,12)</sup>. La subunidad  $\alpha$  contiene la mayoría de los sitios de reconocimiento del receptor de la célula blanco. La subunidad  $\beta$  adquiere su conformación activa únicamente cuando está en combinación con la subunidad  $\alpha$  <sup>(18)</sup>.

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la FSH en diversas especies, incluyendo la humana, teniendo 92 aminoácidos la subunidad  $\alpha$  y 118 la subunidad  $\beta$  <sup>(18)</sup>. Cada polipéptido mantiene su estructura tridimensional mediante puentes disulfuro cruzados, 5 en la subunidad  $\alpha$  y 6 en la subunidad  $\beta$ , sin existir puentes disulfuro entre las subunidades <sup>(18)</sup>. De cualquier manera la unión entre ambas subunidades por uniones no covalentes es tan estable, que aún cuando FSH está formada propiamente por dos subunidades diferentes, se le considera como una molécula bien definida debido a su especificidad biológica, inmunológica y de unión al receptor en sus células blanco.

En las dos cadenas polipeptídicas existen residuos de oligosacáridos ligados a residuos de asparaginas, con diferentes grados de sulfatación y sialidación <sup>(5)</sup>, lo que constituye una de las bases químicas más importantes 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>(18)</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 posiciones 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>(5)</sup>.

El ácido siálico terminal protege a la molécula de la acción degradante de las enzimas hepáticas. Por ésta razón, su presencia es de suma importancia en la regulación de la vida media de la hormona en la circulación <sup>(5)</sup>. 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 <sup>(79,81,10)</sup>.

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 <sup>(40)</sup>. Aunque investigaciones recientes, revelaron que la remoción de los residuos de carbohidratos en la posición 78 de la subunidad  $\alpha$  aumentó significativamente la afinidad de unión al receptor de la hFSH (72% del valor normal). También se encontró que la remoción de los residuos de carbohidratos localizados en la posición 52 de la subunidad  $\alpha$  da como resultado una disminución significativa en la potencia biológica de la hFSH (26% del valor normal). Por otro lado, la remoción de ambos residuos de carbohidratos de la subunidad  $\alpha$  de la hFSH, dió como resultado una disminución significativa de la potencia biológica de la hormona (41% del valor normal); en tanto que la remoción de ambas cadenas de carbohidratos de la subunidad  $\beta$  produjo un aumento significativo en la potencia biológica de la hFSH (26% del valor normal)<sup>(6)</sup>.

## **2) Biosíntesis y 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 <sup>(40)</sup>.

Las subunidades que constituyen la FSH ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se sintetizan independientemente

una de la otra; mediante el control genómico de las interacciones entre ARN mensajeros (ARNm) específicos y ARN de transferencia (ARNt) en los ribosomas. Las cadenas proteínicas recién sintetizadas representan formas inmaduras ya que no están glicosiladas y cuentan además con un pequeño fragmento peptídico líder o de señal. El procesamiento de la forma inmadura de las subunidades a su estado maduro involucra el rompimiento del péptido de señal y glicosilación. Ambos eventos requieren la presencia de enzimas microsomales unidas a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi, y ocurren conforme se va formando la cadena peptídica en los polisomas (cambios co-traduccionales) o conforme la hormona se transporta dentro de la célula (cambios post-traduccionales).

Mientras que la cadena proteínica reside aún en los polisomas unidos a la membrana del RER, enzimas microsomales rompen la secuencia líder; esto permite que dicha cadena cruce la membrana hacia las cisternas del RER y también, que sufra un doblamiento apropiado que le permita adquirir su estructura terciaria. Así mismo, se forman los puentes disulfuro de la cadena, aunque no son necesarios para el plegamiento específico de la molécula. Simultáneamente, las enzimas que se encuentran en las membranas microsomales transfieren de un dolicol complejos oligosacáridos: (Glucosa)<sup>3</sup>-(Manosa)<sup>9</sup>-(N-acetil-glucosamina)<sup>2</sup> a residuos específicos de Asn dentro de la cadena polipeptídica. A partir de este momento comienza un procesamiento extenso de estos oligosacáridos, que continúa cuando la glicoproteína se transporta al aparato de Golgi.

La asociación no covalente de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  para formar heterodímeros también tiene lugar en el retículo endoplásmico, después del procesamiento de los oligosacáridos recién unidos. En el aparato de Golgi se remueven residuos de

manosa a través de la acción de la manosidasa, enzima presente en la membrana de este organelo celular. Antes de la secreción se unen los azúcares que son ácido siálico, N-acetil-glucosamina y manosa. Esta glicosilación requiere de las glicosil-transferasas, enzimas que transfieren los carbohidratos de un intermediario nucleótido-azúcar a la proteína.

Las variaciones en el contenido de estos azúcares son responsabilidad de la microheterogeneidad de FSH, y parecen estar regulados a través del control genómico de la expresión de estas enzimas. Posteriormente, una vez terminado el procesamiento de los oligosacáridos, las glicoproteínas se empaquetan en gránulos de secreción que protegen a las subunidades de la proteólisis y se transportan hacia la periferia celular mediante la intervención de los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Una vez que ha llegado hasta la membrana plasmática se fijan en ella <sup>(18)</sup>.

La secreción de la FSH ocurre por estímulo de la GnRH hipotalámica. Una vez que la GnRH se ha unido a los receptores hipofisarios, induce cambios en la permeabilidad celular, acompañado de la movilización de calcio extracelular <sup>(42)</sup>. 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 gonadotrofinas <sup>(42)</sup>. 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 gonadotrofinas <sup>(42)</sup>. Cada célula gonadotrófica hipofisaria contiene aproximadamente 10,000 receptores a GnRH. Con ocupar el 10% de estos receptores es suficiente para producir la liberación máxima de gonadotrofinas <sup>(21)</sup>. La GnRH hipotalámica tiene una vida media corta de entre 2 y 8 minutos <sup>(36)</sup>.

Se libera a manera de pulsos, mismos que se reflejan en la secreción pulsátil de FSH y LH. La pulsatilidad de la GnRH varía dependiendo del momento y del estado endócrino. 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 <sup>(23)</sup>. Para esto se requiere de un apropiado gasto de GnRH, que genere moléculas de gonadotropinas biológicamente activas <sup>(66)</sup>.

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. El estradiol parece ser más efectivo en modular la amplitud, mientras que la progesterona actúa como un reductor de la frecuencia de la pulsatilidad <sup>(56)</sup>.

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 <sup>(50)</sup>. El principal sitio de acción del estradiol, es la hipófisis, aunque también tiene un efecto importante a nivel hipotalámico <sup>(72)</sup>.

La inhibina está considerada como la más importante proteína ovárica que interviene en el control de la secreción de la FSH. 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 hipofisaria de FSH como en la función del ovario <sup>(66)</sup>. Otro péptido gonadal supresor de la FSH que se ha aislado y caracterizado es la folistatina, la cual actúa como una proteína que se une a la activina, impidiendo su acción <sup>(47)</sup>. Su importancia tanto en animales de experimentación, como en humanos, no se ha dilucidado aún.

### **3) Mecanismo de Acción Hormonal:**

Las hormonas de naturaleza proteínica, producto de la síntesis y secreción de la hipófisis, ejercen sus efectos a nivel de los "órganos blanco", a través del inicio de una serie de eventos bioquímicos que ocurren en la membrana e interior de la célula y que resultan en la expresión de su actividad biológica.

Las gonadotropinas hipofisarias ejercen sus efectos en los "órganos blanco" a través de su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. Este mecanismo constituye el primero de una serie de eventos que son necesarios para la expresión biológica de una hormona a nivel celular.

Estos receptores cubren, en número de cientos o miles, gran parte de la superficie externa de la membrana plasmática en las "células blanco". Como se sabe, los receptores son complejos lipoproteínicos que interactúan con las hormonas correspondientes, esta unión es sumamente específica y de alta afinidad con el objeto de captar las hormonas adecuadas presentes en concentraciones sumamente bajas. Al formarse el complejo hormona-receptor, el receptor presenta un cambio conformacional que se traduce en la activación de un sistema efector asociado a la membrana, éste a su vez desencadena la respuesta celular específica a la estimulación hormonal.

Los efectos más importantes para la acción de las gonadotropinas son por una parte, una secuencia enzimática aún no definida del todo, responsable del flujo del calcio a través de la membrana celular y, por otra la enzima adenilato-ciclasa, que conduce a la formación de AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP) <sup>(48)</sup>. Se sabe que la adenilato-ciclasa está compuesta de dos unidades proteínicas, una reguladora y otra catalítica. El receptor y la unidad reguladora se encuentran unidos estructuralmente, pero se mantienen inactivos hasta el momento en que la hormona se une al receptor. Cuando esto se lleva a cabo, el complejo hormona-receptor-

unidad reguladora capta GTP y se acopla posteriormente con la unidad catalítica, formando así una enzima intacta completa. La actividad enzimática se puede regular por la hidrólisis de GTP a GDP, lo que ocasiona que la enzima regrese a su estado inactivo.

El AMPc actúa como un segundo mensajero, ya que induce la activación de las cinasas, enzimas cuya función es la fosforilación de proteínas utilizando ATP como sustrato. Las cinasas se encuentran de manera inactiva en forma de tetrámeros con dos subunidades reguladoras y dos catalíticas; la unión de AMPc a las subunidades reguladoras hace que se separen las subunidades catalíticas, con el fin de fosforilar diferentes proteínas y enzimas. Las concentraciones intracelulares altas de AMPc persisten por poco tiempo, ya que la fosfodiesterasa transforma el AMPc en su forma inactiva 5-AMP.

#### **4) Función de la FSH:**

La FSH ejerce un control predominante sobre la función de las gónadas, con el fin de regular y mantener la gametogénesis, esteroidogénesis y ovulación, procesos esenciales para la reproducción. Es la responsable primaria de regular los procesos concernientes al desarrollo de las células germinales en las gónadas.

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; así mismo, incrementa la elaboración del líquido folicular, y aumenta el número de receptores a LH<sup>(88)</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>(88)</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>(64)</sup>. La FSH actúa específicamente en las células de la granulosa del ovario y las células de Sertoli del testículo.

**a). Acción en el ovario:**

Al iniciarse un ciclo menstrual, un cierto número de folículos ováricos primordiales comienzan a desarrollarse gracias al estímulo de la FSH; esto implica la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una capa llamada teca alrededor de estos folículos, la cual a su vez se divide en interna y externa. La FSH activa el sistema enzimático de la aromatasa a nivel de la mitocondria, para la síntesis 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>(64,76)</sup>. Posteriormente hay aumento de la producción de fluido folicular, que se acumula en los espacios intracelulares 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 degenerativo que se conoce como atresia <sup>(64,39)</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-hipófisis, retira el soporte de gonadotrofinas 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 la 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 <sup>(40,69)</sup>. 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 gonadotrofinas son las más bajas de todo el ciclo, debido a la retroalimentación negativa que ejercen tanto el estradiol como la progesterona. De no darse el embarazo, se presenta la luteólisis unos días después y el ciclo se reanuda nuevamente <sup>(76,88)</sup>.

**b). Acción en el testículo:**

Los testículos tienen bajo su cargo 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. La adenohipófisis participa en el control de ambas funciones mediante la secreción de FSH y LH, necesarias para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis <sup>(88)</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; así mismo 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 con el fin de proveer una reserva de andrógenos, útil para el desarrollo de las células germinales <sup>(64)</sup>. Por otra parte, FSH ejerce un efecto directo sobre las células de Sertoli estimulando la conversión de andrógenos por inducción de la actividad de la aromatasa <sup>(30)</sup>.

## ANTECEDENTES

### **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 de animales, incluyendo al ser humano <sup>(19,16,20,17,32,61,70,79,83)</sup>

Las investigaciones más recientes han revelado 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 <sup>(5)</sup>.

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) <sup>(5)</sup>. Estas isoformas, al tener diversidad de cargas, pueden ser separadas por sus puntos isoelectrónicos (pI) o 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 animal al momento de recolección de la muestra <sup>(8,9,61,69,19,17,84,18)</sup>.

Los modelos más estudiados en la caracterización del pleomorfismo de la FSH son los roedores, el ovino y el ser 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 y bioactividad *in vitro* que las exhibidas por las más ácidas; sin embargo, estas últimas (altamente sializadas) presentan una vida media plasmática y actividad *in vivo* mayor que las menos ácidas <sup>(20,83,17,80,9)</sup>.

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 <sup>(9,19,54)</sup>. La situación opuesta se observa 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-prepucial <sup>(29)</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 macho que en la hembra, y en el humano en ambos sexos, se vuelven más ácidas en edades avanzadas. También de modo similar a lo encontrado en roedores, se ha visto que en las formas más básicas de la FSH intrahipofisaria del humano y del mono aumenta la actividad biológica *in vitro* <sup>(59,46,85)</sup>, y disminuye su vida media en plasma.

Aunque las isoformas con carga más negativa presentan menor actividad biológica *in vitro*, su tiempo de sobrevida 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>(83)</sup>.

La regulación de la producción y secreción depende de varios factores, dentro de los que destacan los esteroides gonadales y la GnRH. La inducción de la pubertad en la oveja con GnRH, produce un aumento selectivo de la secreción de isoformas menos ácidas <sup>(60)</sup>. En el caso de las ratas hembras adultas, la distribución del pH de las diferentes isoformas varía durante el ciclo estral <sup>(82)</sup>. En el hamster el perfil de distribución de FSH se ve alterado por manipulaciones farmacológicas específicas: las hipófisis obtenidas de hamsters hembra ovariectomizadas, tratadas con estradiol, presentan todas las formas de FSH aislables por CF, sin embargo, la abundancia relativa de las formas más o menos ácidas, cambia dependiendo del tiempo de exposición a este esteroide; a corto plazo (20 horas), existe mayor cantidad de formas más ácidas, en comparación con los testigos ovariectomizados; cuando la exposición es más prolongada (30 horas), se observa un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas. El cambio de 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 (estradiol) e hipotalámicos <sup>(82)</sup>.

Aún cuando los resultados de algunos experimentos *in vitro* permiten sugerir que la secreción de isoformas menos ácidas se regula principalmente por GnRH, <sup>(60)</sup> estudios *in vivo* no se han podido disociar los posibles efectos de los esteroides gonadales (principalmente estrógenos) de los de GnRH. De esta serie de

investigaciones 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, la GnRH produciría cambios en la glicosilación inmediatamente antes de su secreción. De hecho cada componente hormonal involucrado en la regulación de la síntesis y secreción de la FSH puede modular la estructura 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.

El significado fisiológico de la heterogeneidad de FSH aún no está del todo definido. Los estudios anteriores indican que la hipófisis tiene la capacidad de regular no solamente la cantidad sino también la calidad de la señal gonadotrófica que produce y libera en un momento dado, para llevar a cabo acciones específicas sobre la maduración y función de las gónadas. Por tal motivo la existencia de la heterogeneidad de FSH representaría un mecanismo muy fino que controla la función gonadal.

## **HIPOTESIS**

Considerando que el ciclo estral en la rata representa una secuencia ordenada y cíclica de cambios hormonales durante los cuales la hipófisis anterior está expuesta temporalmente a cantidades variables de hormonas gonadales e hipotalámicas y que estos cambios en el ambiente endócrino modifican la estructura química de la molécula de FSH, es posible suponer que la heterogeneidad por carga de esta gonadotropina (y por lo tanto sus características bioquímicas) sufrirá variaciones dependientes del día y hora del ciclo estral.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL:**

Estudiar los cambios en la heterogeneidad por carga de la hormona estimulante del folículo (FSH) intrahipofisiaria, durante el ciclo estral de la rata.

### **PARTICULARES:**

- 1.- Con base en su heterogeneidad por carga, separar las diferentes formas moleculares de la FSH intrahipofisiaria (isoformas) utilizando la técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (IEF-GEPA).
- 2.- Estudiar la capacidad de unión al receptor de las diferentes isohormonas de FSH separadas mediante IEF-GEPA.
- 3.- Estudiar la afinidad a Concanavalina-A de cada una de las isohormonas de FSH obtenidas mediante la separación por IEF-GEPA; antes y después de su modificación por desialización enzimática.

## MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratas hembra intactas adultas de la cepa C-II-ZV (E.N.E.P.-Zaragoza, UNAM), sometidas a un horario de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (luces encendidas de las 5 a.m. a las 7 p.m.), con libre acceso al agua y alimento. Los pesos aproximados de las ratas fueron de 230 a 280 g. En todos los animales se llevaron a cabo frotis vaginales diariamente entre las 9:00 y las 11:00 hrs y ninguno de ellos fue utilizado hasta haber demostrado tres ciclos consecutivos regulares de cuatro días. Los animales fueron sacrificados por decapitación en grupos de 4 ó 5 por cada día u hora del ciclo. Los días y horas en que fueron sacrificados los animales fueron los siguientes: A) diestro 1 y diestro 2 a las 09:00 y 13:00 hrs., B) proestro, a las 09:00, 11:00, 13:00, 18:00 y 22:00 hrs., C) estro a las 02:00, 09:00 y 13:00 hrs. Una vez decapitado el animal, se obtuvo inmediatamente la hipófisis anterior así como la sangre torácica por presión. Cada una de las hipófisis se homogenizó en 125 µl de una solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, 0.5 M; pH 7.0) que incluía el agente antiproteolítico fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF-Sigma Chemical Co. EUA), a una concentración de 30 mg/100 ml de PBS. La homogenización se realizó con 10 golpes de pistilo de teflón en un tubo de vidrio. Los homogenados fueron inmediatamente centrifugados a 3000 rpm. durante 30 minutos, a una temperatura de 4°C; el sobrenadante (extracto de hipófisis) se almacenó a -20°C hasta el día de su procesamiento por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida. La sangre de cada animal se dejó coagular a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm. durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante (suero) fué almacenado a -20°C hasta el día de la cuantificación de FSH por radioinmunoanálisis.

### **Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (IEF-GEPA):**

Cada extracto de hipófisis se sometió a isoelectroenfoque. Esta técnica de separación se basa en el principio de que cada proteína tiene una carga neta que varía de acuerdo al pH del medio en que se encuentre. Dicha carga neta representa la suma de cargas positivas y negativas en la superficie de la molécula. Cuando ocurren cambios de un pH muy bajo a uno muy alto, la carga neta se modifica de manera continua de positiva a negativa; a cierto valor de pH bien definido, la carga neta es igual a cero. Este punto es denominado punto isoeléctrico (pI) de la proteína. Cada uno de los extractos de hipófisis se isoelectroenfocó en geles de poliacrilamida al 2% (LKB Instruments, Inc. Bethesda MD, EUA; rango de pH de 3.5 a 9.5). La muestra fue depositada en el cátodo, las condiciones eléctricas para cada enfoque isoeléctrico fueron las siguientes: voltaje 1500 v., corriente 50 mA. y potencia 12 W. El tiempo de cada experimento fue de 90 minutos a una temperatura de 4°C, al término de los cuales se determinó el gradiente de pH. Cada carril del gel fue seccionado en 41 fracciones de 2 mm. y las proteínas presentes en cada una de éstas fueron eluidas mediante incubación en 400 µl de PBS-GEL (PBS 0.05 M + 0.1 % de gelatina) durante 18 h a 4°C. Concluido este tiempo los eluatos fueron congelados a -20°C hasta el día en que fueron sometidos a (RIA) o (RRA) de FSH. La recuperación de FSH fue de aproximadamente el 75%.

### **Cromatografía por afinidad en Concanavalina-A (Con-A):**

Con el objeto de separar las especies de FSH de acuerdo a su estructura de carbohidratos (alto contenido en manosa o estructuras híbridas), se empleó la técnica de cromatografía por afinidad a Concanavalina-A (Con-A) unida a

microesferas de sefarosa (Pharmacia Fine Chemicals, Piscatway, NJ EUA; 0.7 x 1.5 cm). La Con-A es una proteína vegetal que posee la posibilidad de unir en forma específica residuos de carbohidratos. Con esta técnica se obtienen dos especies moleculares de FSH, una de las cuales no se une a la lectina (FSH libre), en tanto que la segunda se adhiere a la Con-A (FSH unida), y es eluida mediante la adición de glucopiranososa a la columna (50 mM). Todas las cromatografías se llevaron a cabo a 4°C en columnas de 1.5 x 1 cm. Las proteínas enfocadas en puntos isoeléctricos dentro de los rangos de pH de 6.2 a 5.5 (área 2) y 4.9 a 4.5 (área 4) obtenidos del isoelectroenfoque de extractos hipofisarios de ratas decapitadas a las 13:00 hrs. del día del proestro, fueron sometidas a cromatografía en Con-A. Se colectaron 60 fracciones de 0.5 ml. cada una; las primeras 20 fracciones se eluyeron con PBS 0.05 M, pH 7.0 conteniendo cloruro de calcio y magnesio a una concentración de 1 mM, en tanto que las 40 fracciones restantes fueron recuperadas mediante la adición de glucopiranososa 100 mM en el buffer anteriormente descrito. Posteriormente en cada fracción se determinó su contenido de FSH por RIA. La FSH que fue obtenida en las fracciones 1 a 20 fué considerada como la fracción de FSH libre o no unida a la Con-A, mientras que aquella presente en las fracciones 21 a 60 se le consideró como la FSH unida. La recuperación de FSH por este método fué del 65 al 85%

#### **Incubación con neuraminidasa y separación subsecuente por cromatografía en Concanavalina-A y por isoelectroenfoque.**

Estudios preliminares empleando el isoelectroenfoque (IEF-GEPA) como método de separación, han demostrado que preparaciones de FSH de rata altamente purificadas (NIADDK-FSH-I-5; NIADDK-FSH-I-6; Bethesda, MD) presentan pIs ácidos (4.2 y 4.8); al ser sometidas a tratamiento con neuraminidasa (enzima que

libera de residuos de ácido siálico a la molécula) se producen consecuentemente varios isómeros con pls más básicos. Con base en estos hechos se llevó a cabo el siguiente experimento: preparaciones de 2.5 µg de FSH de rata altamente purificada (NIADDK-FSH-1-6; Bethesda, MD) en un volumen de 50 µl de PBS-acetato de sodio (4.0 M, pH 5.5) fueron incubadas durante una hora a 37°C en presencia de 2 mU de neuraminidasa (*Vibrio Cholerae*, Calbiochem, La Jolla, CA). Una vez finalizado el período de incubación, la reacción de cada una de las preparaciones (control y experimental) se detuvo con la adición de 10µl de azida de sodio al 1%. Inmediatamente después, se tomaron alícuotas de cada una de las incubaciones y se separaron por cromatografía en Concanavalina-A e IEF-GEPA.

#### **Radiomarcaje de la Hormona Folículo Estimulante.**

Esta técnica consiste en sustituir uno o más átomos de hidrógeno por átomos del isótopo radiactivo <sup>125</sup>I en los residuos de tirosina que contiene la hormona <sup>(77)</sup>. El método utilizado en el presente estudio fué el de la Cloramina-T descrito por Hunter y Greenwood <sup>(41)</sup>. En este procedimiento se mezclan los siguientes reactivos:

- 1) 2.5 µg de FSH de rata (NIAMDD-rFSH-1-6)
- 2) 25 µl de PBS 0.01 M, pH 7
- 3) 10 µl de <sup>125</sup>I-Na (equivale a 1 mCi)
- 4) 10 µl de Cloramina-T (5 mg de Cloramina-T en 20 ml de PBS 0.01 M, pH 7.4), después de agitar durante 60 seg.
- 5) 50 µl de metabisulfito de sodio (10 mg de metabisulfito de sodio en 10 ml de PBS 0.01 M, 7.4) al añadir este reactivo se pone fin a la reacción iniciada por la Cloramina-T.

Una vez llevada a cabo la reacción, se separa la hormona marcada del  $^{125}\text{I}$  libre por medio de una cromatografía por exclusión, empleando Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals A.D.) de la siguiente manera: La mezcla hormona marcada y yodo libre se coloca sobre la columna de cromatografía y se eluye con PBS 0.01 M, pH 7.4. Se colectan 36 fracciones de 1 ml en tubos de vidrio de 12 x 75 que contienen 200 $\mu\text{l}$  de PBS 0.01 M, pH 7.4 y 5% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Co, E.U.A.). A cada una de ellas se les determina contenido de radiactividad en un contador para radiaciones gamma durante 15 segundos; la hormona marcada con mayor radiactividad se colecta en las fracciones 8, 9 y 10, las cuales son mezcladas y recromatografiadas en Con-A de acuerdo al método descrito anteriormente con el objeto de separar aquellas moléculas de FSH dañadas por el radiomarcaje. En esta segunda cromatografía se colectan 30 fracciones de 1 ml, las primeras 10 se eluyen con PBS 0.05 M, pH 7.0 conteniendo cloruro de calcio y magnesio en concentraciones de 1.0 mM. Las 20 fracciones restantes se eluyen también con la solución antes mencionada más glucopiranososa 100 mM. La hormona dañada no es capaz de unirse a la Con-A por lo que eluye en el volumen correspondiente a las 10 primeras fracciones. La hormona no dañada se une a la Con-A, por lo que tiene que recuperarse mediante la adición de glucopiranososa, colectándose en las fracciones 11 a la 20. De estas fracciones, las que contienen mayor cantidad de radiactividad son mezcladas y almacenadas en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas en el RIA de FSH.

#### **Radioinmunoanálisis de la FSH.**

En la técnica de RIA se utilizan anticuerpos, material isotópico radiactivo y compuestos radioinertes para cuantificar diversos compuestos. Su aplicación actualmente es muy extensa ya que puede utilizarse para cuantificación de

hormonas, vitaminas, drogas y fármacos que nunca antes habían podido ser medidos con exactitud ya que sus concentraciones en fluidos biológicos son del orden del nanogramos o picogramos. La técnica del RIA se podría definir como una reacción inmunológica competitiva, en la cual dos antígenos (hormona marcada y hormona radioinerte) compiten por un anticuerpo específico. El RIA para FSH de rata empleado en el presente trabajo se realizó empleando reactivos donados por el Insituto Nacional de la Salud, de los E.U.A. , (National Institute of Arthritis, Metabolic and Digestive Diseases; NIAMDD). Se elaboró una curva standard empleando la preparación de referencia de FSH de rata (NIAMDD-rFSH-RP-1), con las siguientes dosis: 4, 10, 20, 30, 40, 80, 120, 200, 400 y 800 ng por tubo en el volumen final de 300  $\mu$ l preparada en PBS 0.05 M, pH 7.0 conteniendo 0.1 % de gelatina. En el análisis se incluyeron alícuotas de 25, 50, 100 y 120  $\mu$ l de una poza de sueros de ratas hembras castradas como muestras de control de calidad. Por último se adicionaron alícuotas por duplicado de cada muestra problema. A cada uno de los tubos del análisis se les agregó 100  $\mu$ l de la solución [<sup>125</sup>I]-FSH preparada a partir de una de las alícuotas obtenidas en el radiomarcaje (previamente descrita), con un contenido de radiactividad de 21,000  $\pm$  1000 cpm. El anticuerpo (suero de conejo anti-rFSH, NIAMDD-Anti-rat-FSH-S-11) se agregó a todos los tubos a una dilución final de 1:3000 preparado en PBS 0.05 M, pH 7.0 con etilen-diamino-tetra-acético (EDTA-0.05 M) y suero normal de conejo (diluido 1:3000 en un volumen de 200  $\mu$ l), excepto en aquellos tubos en los que se cuantificaron las uniones no específicas (aquella unión diferente a la unión específica FSH-anti-FSH) las cuales sólo llevaron 200  $\mu$ l de PBS+EDTA y suero normal de conejo. Al inicio y final del análisis se cuantificaron tanto la unión total, en tubos que contenían PBS + 0.1% de gelatina (300  $\mu$ l), hormona marcada y anticuerpo, así como la unión no específica. Después de agregar el anticuerpo, el análisis se incubó durante 18 h a temperatura ambiente. Al término de esta incubación se

adicionó el segundo anticuerpo (Anti IgG de conejo) obtenido de un carnero previamente inmunizado, diluído 1:20 en PBS 0.05 M, en un volumen de 200  $\mu$ l; los tubos se incubaron nuevamente 18 h a temperatura ambiente y finalmente se centrifugaron a 1000 x g durante 30 minutos a 4°C. El contenido de radiactividad presente en el precipitado de cada uno de los tubos fue cuantificado en un contador Packard Auto-Gamma 500. Para evitar variaciones interanálisis, las muestras provenientes de un mismo carril del IEF-GEPA así como las de una misma columna de Con-A se incluyeron en la misma corrida. La variación intra-análisis fué del 7% y la sensibilidad de 6 ng/tubo.

### **Radioreceptor de la FSH**

La cuantificación de FSH por radioreceptor (RRA) se llevó a cabo de acuerdo el método descrito por Ulloa-Aguirre y Cols. <sup>(78)</sup>, utilizando un homogenado crudo de túbulos seminíferos procedentes de ratas macho (28 días de edad). Para la elaboración de la curva estandar se utilizó la preparación de referencia rFSH-RP-1, de los Institutos Nacionales de la Salud, E.U.A. (NIAMDD), en tanto que la hormona marcada fué el estándar rFSH-1-6 radiomarcado de acuerdo al método ya descrito, con la modificación en el tiempo de reacción que en este caso fue sólo de 20 segundos a 4°C; el volumen final de incubación fué de 300  $\mu$ l (175  $\mu$ l de solución amortiguadora del receptor, Tris 0.025 M, cloruro de magnesio 10 mM y ASB 0.1%) + 100  $\mu$ l de hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm) + 25  $\mu$ l del homogenado de túbulos seminíferos. El tiempo de incubación fué de 18 hrs a 4°C, en agitación constante. La sensibilidad fué de 8 ng/tubo y la variación intra e interanálisis < al 10% y 15% respectivamente.

### **Análisis Estadísticos**

Para analizar las diferencias entre grupos se utilizaron el análisis de varianza de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Walker-Duncan (para  $n > 3$ ) y la prueba no pareada de "t" para  $n=2$ . Valores de  $p < 0.05$  se consideraron como indicadores significativos de diferenciación.

## RESULTADOS

### **Patrones de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida de la FSH intrahipofisiaria.**

Al ser sometidos a separación por isoelectroenfoque, todos los extractos hipofisarios mostraron varios picos bien definidos de FSH inmunoadictiva dentro del rango de pH de 6.2 a 4.2. Sin embargo, la magnitud de estos picos varió dependiendo del día y la hora de recolección de la muestra. Como se muestra en la figura 3 a-d los extractos de hipófisis obtenidos de ratas sacrificadas a las 09:00 hrs de los cuatro días del ciclo (diestro 1, diestro 2, proestro y estro) mostraron un pico mayor de FSH bien definido en un punto isoelectrónico de 4.9 - 4.5; también se identificaron picos menores con puntos isoelectrónicos entre 6.2 - 5.0. Sin embargo, en aquellas hipófisis obtenidas a las 11:00, 13:00 y 18:00 hrs del día del proestro, se observó un patrón de isoelectroenfoque diferente al observado a las 09:00 hrs caracterizado por la presencia de dos picos mayores claramente distinguibles con puntos isoelectrónicos de 6.2 - 5.5 y 4.9 - 4.0 (Figura 4). La FSH intrahipofisiaria de animales sacrificados a las 22:00 hrs del proestro, a las 02:00 hrs del estro, a las 13:00 hrs del diestro 1 diestro 2 y estro, presentaron un perfil de isoelectroenfoque similar a aquel que exhibieron las hipófisis colectadas a las 09:00. Para identificar diferencias entre los patrones de isoelectroenfoque de la FSH intrapituitaria obtenidas en los diferentes grupos de animales estudiados, cada patrón de isoelectroenfoque fué dividido en siete áreas o regiones: área 1, pI 7.0 - 6.30; área 2, pI 6.20 - 5.50; área 3, pI 5.49- 5.0; área 4, pI 4.99 - 4.50; área 5, pI 4.49 - 4.0; área 6, pI 3.99 - 3.50; área 7, pI 3.50 y la concentración de FSH presente en cada una de estas áreas fué calculada. La actividad de la FSH identificada en la región con pI 7.0 no fué considerada debido a su proximidad con el punto de aplicación de la muestra. Los dos picos

principales de FSH detectados por IEF-GEPA quedaron incluidos en su mayoría dentro de las áreas 2 y 4 (fig. 3 y 4). Como se muestra en la tabla 1, del 37 al 55% de la FSH intrapituitaria inmunoactiva enfocó dentro del área 4 (pl 4.9 - 4.5), sin importar la hora de obtención de la muestra. En todos los grupos fue en esta área en donde se identificó la mayor cantidad del total de FSH recuperada después del IEF. En los extractos de hipófisis de animales decapitados a las 11:00, 13:00 y 18:00 hrs del día del proestro, el contenido de FSH del área 2 ( $31.4 \pm 0.8$  % del total de FSH recuperado) fué significativamente ( $p < 0.01$ ) mayor que aquellas observadas en todos los grupos de animales decapitados a las 09:00 hrs, esto a las 13:00 hrs, proestro a las 22:00 hrs y esto a las 02:00 a.m.; en estos últimos grupos la FSH contenida dentro del área 2 no fué significativamente diferente una de la otra.

**Actividad de unión al receptor de la FSH intrahipofisiaria después de la separación por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida.**

Para estudiar la actividad de unión al receptor (expresada por la relación RIA/RRA) de los dos principales picos de FSH identificados después del IEF de extractos intrahipofisarios obtenidos a las 13:00 hrs del día del proestro (fig. 4c), la FSH recuperada en las áreas 2 y 4 fué cuantificada por RRA y RIA, utilizando el mismo estándar radioinerte de FSH (FSH-RP-1) para la construcción de las curvas. Expresado como el cociente de actividad RRA/RIA, la actividad de unión al receptor de la FSH intrapituitaria fué mayor en el área 2 ( $7.0 \pm 2.7$ ) que en el área 4 ( $4.3 \pm 1.0$ ) ( $p < 0.05$ ).

### **Cromatografía en Concanavalina-A (Con-A) de la FSH intrapituitaria dentro de las áreas 2 y 4.**

Para determinar la capacidad de unión a la lectina Con-A de cada isoforma de FSH, extractos de hipófisis colectados a las 13:00 hrs del proestro fueron separados por IEF y la FSH presente tanto en el área 2 como en el área 4 fueron posteriormente separados por cromatografía en Con-A. Aunque la FSH intrapituitaria recuperada de ambas áreas presentaron las dos especies moleculares (FSH libre y unida a Con-A), el contenido relativo de cada especie de FSH y la relación libre:unida difirieron dependiendo del área específica. El contenido relativo de FSH unida a la Con-A fué mayor ( $p < 0.05$ ) en los eluatos del área 2 (relación de FSH libre:unida =  $0.14 \pm 0.01$ ) que en aquellos provenientes del área 4 ( $0.4 \pm 0.03$ ).

### **Digestión de la rFSH - I - 6 por neuraminidasa**

Con el fin de estudiar si las variaciones en el contenido de ácido siálico juegan un papel importante en la afinidad a Con-A de cada isoforma de FSH separada por IEF, una preparación de rFSH-I-6 altamente purificada [la cual en estudios preliminares presentó un solo pico ácido ( $pI=4.8$ ) después del IEF] se sometió a desialización enzimática. La eliminación de residuos de ácido siálico de esta molécula produjo varios picos de FSH con  $pI$ s más básicos (fig. 5c). Los resultados de este experimento revelaron que la proporción de la FSH unida a la Con-A fué diferente para las preparaciones control y tratada con neuraminidasa, ya que la proporción de FSH unida a Con-A se incrementó después de la desialización. La relación libre-unida de la FSH en los controles fué de  $0.55 \pm 0.04$  mientras que en las fracciones tratadas con neuraminidasa la relación fué de  $0.32 \pm 0.01$  ( $p < 0.05$ ),

(figs. 5b y d). Todas estas formas de FSH producidas por la neuraminidasa desplazaron a la FSH marcada con  $^{125}\text{I}$  tanto del anticuerpo como del homogenado de tubos seminíferos (RRA) en forma paralela con el estándar radioinerte.

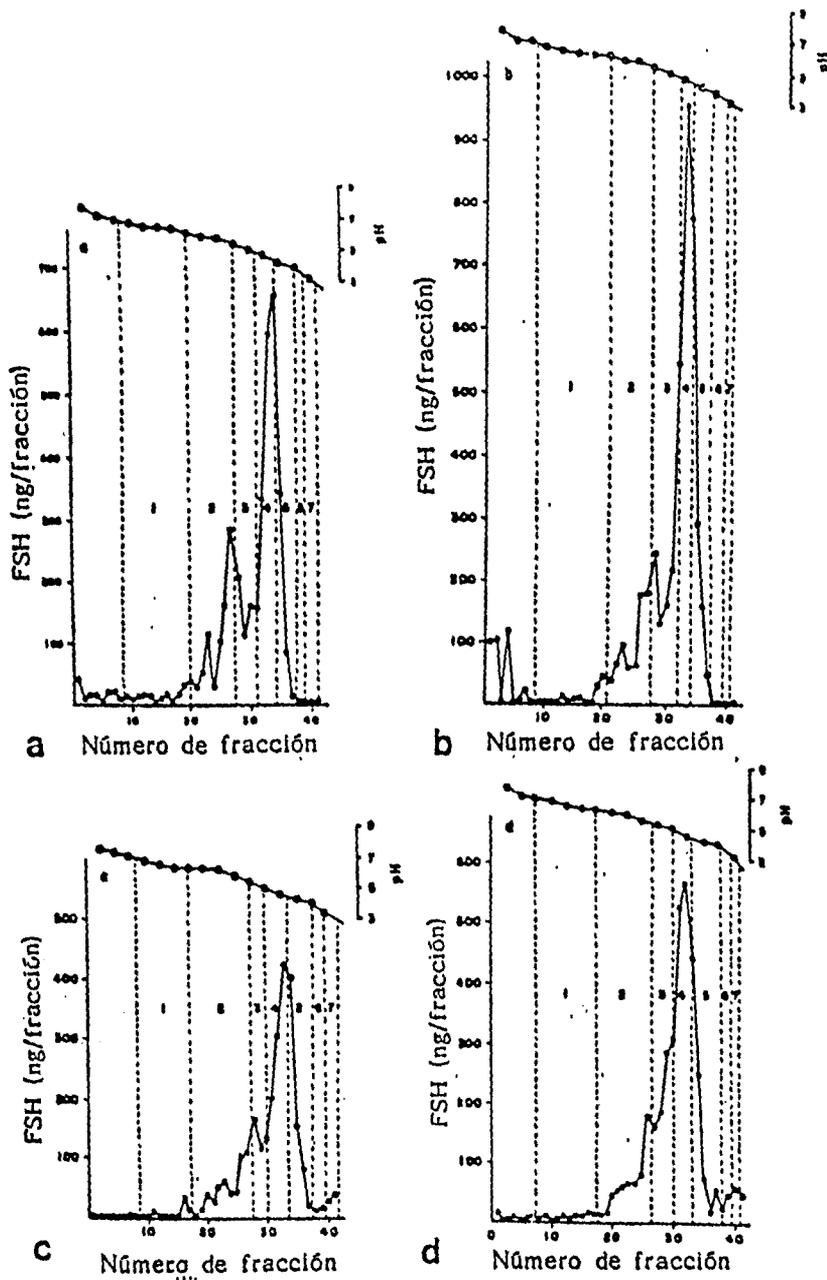


Figura 3. Patrones representativos de distribución por IEF-GEPA de la hormona estimulante del folículo (FSH) intrahipofisaria de ratas hembra sacrificadas a las 09:00 h. del diestro 1 (a), diestro 2 (b), proestro (c) y estro (d). Las líneas verticales discontinuas delimitan las siete regiones en las cuales cada patrón de distribución por IEF-GEPA fue arbitrariamente dividido para las comparaciones cuantitativas.

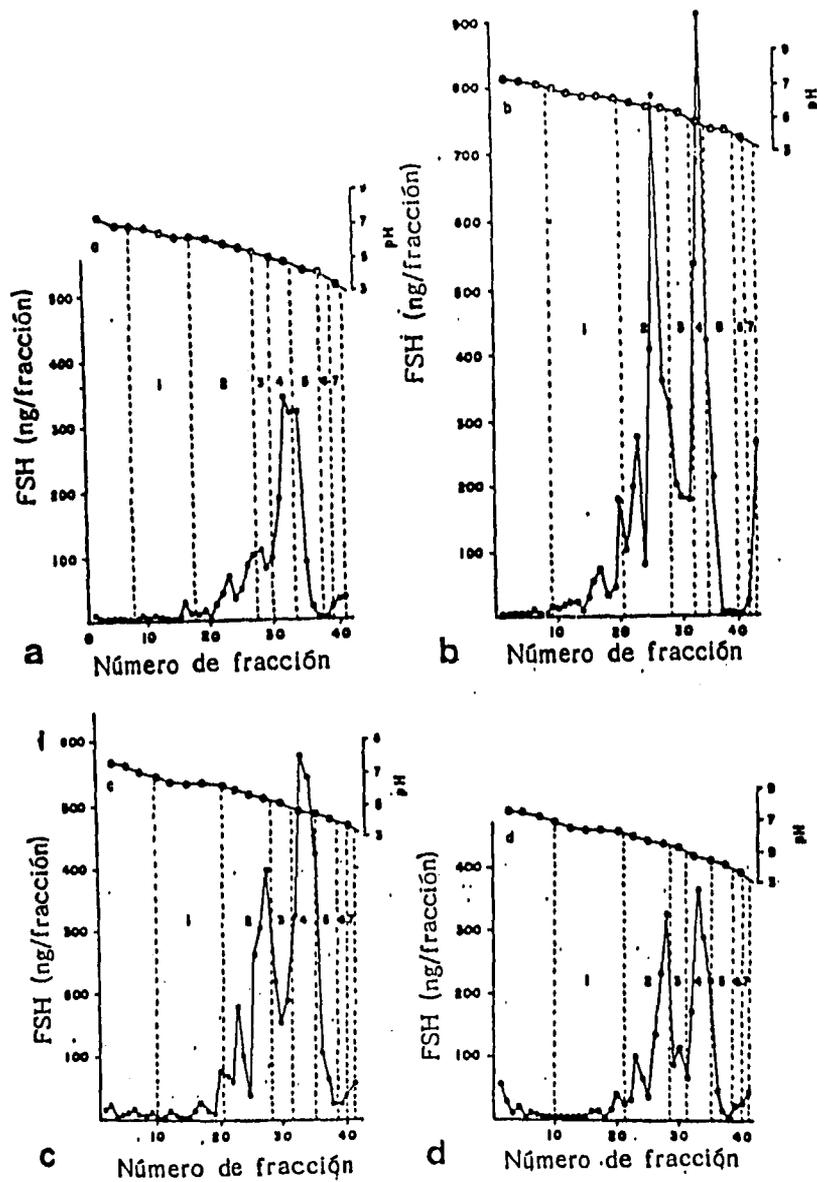


Figura 4. Patrones representativos de distribución por IEF-GEPA de la hormona estimulante del folículo (FSH) intrahipofisiaria de ratas hembra sacrificadas a las 09:00 h. (a), 11:00 h. (b), 13:00 h. (c) y 18:00 h. (d) del día del proestro. Las líneas discontinuas indican los límites de las áreas 1 a 7.

**TABLA 1.** Cambios en la distribución de la hormona estimulante del folículo (FSH) intrapituitaria de ratas hembra, a lo largo de un gradiente de pH. Los valores se expresan como las medias  $\pm$  SEM (n=5).

Área de pH	FSH por zona (expresado como el % del total del gel)						
	1 (7.0 - 6.3)	2 (6.2 - 5.5)	3 (5.4 - 5.0)	4 (4.9 - 4.5)	5 (4.4 - 4.0)	6 (3.9 - 3.5)	7 (<3.5)
<b>Día del Ciclo y Hora</b>							
D1(0900)	6.7 $\pm$ 1.3	26.0 $\pm$ 2.6	17.8 $\pm$ 2.1	39.0 $\pm$ 1.7	11.6 $\pm$ 3.2 <sup>e</sup>	—	1.3 $\pm$ 0.4(n=3)
D1(1300)	1.2 $\pm$ 0.5	13.2 $\pm$ 4.8	21.3 $\pm$ 4.4	55.6 $\pm$ 8.2	11.2 $\pm$ 7.4 <sup>e</sup>	0.9(n=1)	0.6(n=1)
D2(0900)	2.9 $\pm$ 0.8	20.1 $\pm$ 1.7	19.1 $\pm$ 3.6	41.9 $\pm$ 3.6	15.1 $\pm$ 5.5	0.7(n=1)	0.9(n=2)
D2(1300)	2.2 $\pm$ 2.1	21.9 $\pm$ 6.0	24.0 $\pm$ 2.1	48.1 $\pm$ 6.5	4.1 $\pm$ 1.8 <sup>e</sup>	0.6(n=2)	0.4(n=1)
P(0900)	3.3 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 2.2	15.4 $\pm$ 1.6 <sup>e</sup>	37.2 $\pm$ 1.3	22.1 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.4
P(1100)	4.0 $\pm$ 2.2	31.4 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	15.3 $\pm$ 4.5 <sup>e</sup>	41.1 $\pm$ 6.5	5.5 $\pm$ 2.2 <sup>f</sup>	1.0(n=2)	2.6(n=2)
P(1300)	3.1 $\pm$ 0.9	32.8 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	48.7 $\pm$ 3.1	2.6 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	—	1.3(n=2) 1.1(n=2)
P(1800)	3.9 $\pm$ 0.9	30.0 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	11.8 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	48.2 $\pm$ 2.7	3.6 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	1.9 $\pm$ 0.5(n=3)	1.5(n=2)
P(2200)	5.3 $\pm$ 2.7	14.3 $\pm$ 1.3	11.7 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	42.5 $\pm$ 3.0	21.2 $\pm$ 4.0	4.4 $\pm$ 1.4(n=3)	2.0 $\pm$ 0.7(n=3)
E(0200)	4.6 $\pm$ 1.6	14.8 $\pm$ 4.0	14.1 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>	50.2 $\pm$ 4.4	13.5 $\pm$ 4.4	—	—
E(0900)	4.1 $\pm$ 0.7	19.3 $\pm$ 3.5	22.3 $\pm$ 2.4	41.1 $\pm$ 3.5	13.3 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.5(n=3)	1.8 $\pm$ 0.5(n=2)
E(1300)	5.7 $\pm$ 2.1	11.4 $\pm$ 3.3	23.1 $\pm$ 0.8	53.7 $\pm$ 3.2	7.7 $\pm$ 2.7 <sup>e</sup>	—	—
<b>Media<math>\pm</math>SEM</b>	3.9 $\pm$ 0.4	21.1 $\pm$ 2.0	17.2 $\pm$ 1.2	45.6 $\pm$ 1.6	10.9 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup>p<0.05 comparado con el D1, D2, P y E a las 09:00 h; D1, D2 y E a las 13:00 h P a las 22:00 h; y E a las 02:00 h, en grupos de la misma área

<sup>b</sup>p<0.05 comparado con el D2, y E a las 09:00 h; D1, D2 y E a las 13:00 h, en grupos de la misma área

<sup>c</sup>p<0.05 comparado con el D2, a las 13:00 h, E a las 09:00 h, y E a las 13:00 h en grupos de la misma área

<sup>d</sup>p<0.05 comparado con el D1, D2, P y E a las 09:00 h; D1 a las 13:00 h; P a las 22:00 h y E a las 02:00 h en grupos de la misma área

<sup>e</sup>p<0.05 comparado con el D2, P y E a las 09:00 h; P a las 22:00 h; y E a las 02:00 h, en grupos de la misma área

<sup>f</sup>p<0.05 comparado con el D2, y P a las 09:00 h; y P a las 22:00 h, en grupos de la misma área

<sup>g</sup>p<0.05 comparado con el P a las 09:00 h; y P a las 22:00 h, en grupos de la misma área

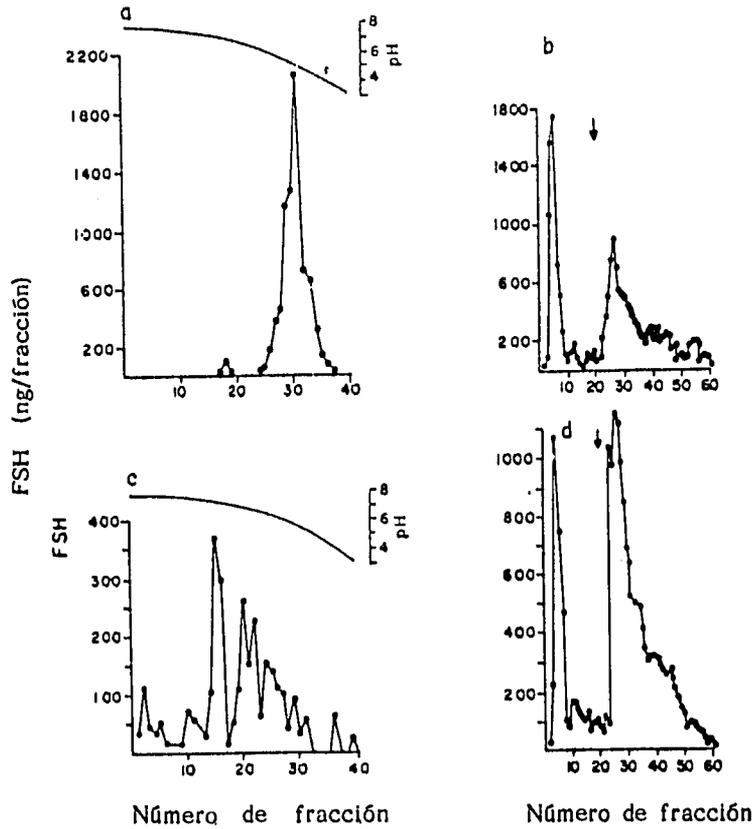


Figura 5. Patrones representativos de elución por cromatografía con Con-A (derecha) y de distribución de IEF-GEPA (izquierda) de una preparación altamente purificada de FSH de rata después de su incubación (NIDDK-rRSH-I-6, Bethesda, MD) en ausencia (a y b) o presencia (c y d) de neuraminidasa. Las flechas indican la adición de un azúcar competitivo a la columna de Con-A.

## DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la heterogeneidad por carga de la FSH intrahipofisaria varia de acuerdo al día y hora del ciclo estral. A diferencia de informes anteriores <sup>(71,15)</sup>, en el presente estudio la recolección de las muestras se llevó a cabo con una mayor frecuencia. Aunque los perfiles de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida de la FSH intrapituitaria fueron del todo similares durante todo el ciclo respecto al pico principal más ácido (pI 4.9 - 4.5), durante la tarde del proestro se observó un incremento en la proporción relativa de la forma de FSH con un punto isoeléctrico de 6.2 - 5.0. Este incremento en la proporción relativa de una forma de FSH más básica (y más potente en términos de actividad de unión al receptor) en momentos de mayor exposición a estrógenos <sup>(73)</sup> y GnRH <sup>(75)</sup>, concuerda con los hallazgos de Galle et al, 1983 <sup>(32)</sup>, quienes demostraron en hamsters ovariectomizados expuestos a estradiol durante un período de 30 h, la presencia de un incremento en la producción de formas de FSH intrapituitarias con pIs > 5.2. Además, estos autores encontraron que la administración de GnRH a animales ovariectomizados tratados con estradiol y posteriormente fenobarbital, reiniciaron los mecanismos hipofisarios responsables de la producción de formas de FSH más básicas. Los resultados en conjunto indican que ambos factores (estrógenos y GnRH) inducen selectivamente la producción de formas más básicas durante la mañana tardía y las primeras horas de la tarde del proestro.

Los patrones de distribución por isoelectroenfoque de la FSH encontrados en el presente estudio, claramente contrastan con aquellos previamente encontrados en ratas macho <sup>(80)</sup>, en los cuales durante la pubertad [cuando los testículos en maduración incrementan la producción de testosterona <sup>(67)</sup>] ocurre un cambio

permanente hacia una forma de FSH más ácida, indicando por lo tanto que estrógenos y andrógenos ejercen efectos opuestos en la carga neta de la molécula de FSH sintetizada por la hipófisis anterior.

La heterogeneidad por carga de la FSH se debe a diferencias en la composición de carbohidratos, principalmente en el contenido de ácido siálico <sup>(74,10,17,79)</sup>. Como previamente se ha demostrado, la desialización progresiva de una molécula de FSH ácida induce la producción de isohormonas de FSH con puntos isoeléctricos menos ácidos, las cuales son similares a aquéllas encontradas dentro del tejido pituitario <sup>(79)</sup>. Como el punto isoeléctrico de la molécula llega a ser menos ácido, su actividad de unión al receptor y potencia biológica *in-vitro* [una excelente correlación existe entre estas dos características <sup>(18,54)</sup>] se incrementan <sup>(54,78)</sup> y su vida media en plasma disminuye <sup>(9)</sup>.

En el presente estudio, los dos picos de FSH detectados después del isoelectroenfoco de extractos hipofisarios colectados durante la tarde temprana del proestro difirieron uno del otro no solamente en su capacidad para desplazar a la <sup>125</sup>I-FSH de su receptor, sino también para unirse a la Concanavalina-A. Esta observación concuerda con hallazgos previos en extractos intrahipofisarios de ratas hembra y macho, los cuales sugieren que cada forma de FSH posee un arreglo y/o composición particular de carbohidratos <sup>(31)</sup>. El hallazgo de que la desialización enzimática de una molécula de FSH ácida da como resultado la producción de formas básicas de FSH (las cuales presentan un aumento en la afinidad por la Con-A) sugieren que durante momentos específicos del ciclo estral (por ejemplo durante la mañana tardía y/o tarde del proestro) se llevan a cabo modificaciones estructurales en la molécula de FSH (regulados por estrógenos y GnRH), lo cual resulta posiblemente en la eliminación de residuos de ácido siálico produciendo

formas de FSH biológicamente más potentes en condiciones in-vitro. Esta hipótesis está apoyada por hallazgos previos en los cuales la incubación de una preparación de FSH ácida (rFSH-1-5, NIADDK, pI=4.5) con proteínas hipofisarias colectadas de hamsters a las 12:00 hrs del proestro, dió como resultado la producción de formas menos ácidas de esta hormona <sup>(79)</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que durante el ciclo estral de la rata se presentan cambios en las características fisicoquímicas de la FSH intrapituitaria, principalmente en su contenido de ácido siálico. Estos cambios conducen a la producción de formas específicas de FSH que poseen potencia biológica y vida media en plasma únicas para cada isohormona. Posiblemente estas formas son eventualmente secretadas hacia la circulación en momentos determinados del ciclo, para ejercer acciones específicas durante la maduración y/o la ovulación <sup>(54,9,15)</sup>.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **CONCLUSIONES**

- 1.- La hipófisis anterior de la rata hembra posee la capacidad de sintetizar diferentes formas de FSH dependiendo del día y la hora del ciclo estral.
- 2.- Durante la mañana tardía y la tarde temprana y media del día del proestro la hipófisis anterior sintetiza una forma de FSH menos ácida que es más potente en términos de capacidad de unión al receptor.
- 3.- Las isohormonas de la FSH menos ácidas poseen una mayor afinidad por la Concanavalina-A (Con-A) y una capacidad de unión a su receptor mayor que las presentadas por las formas ácidas.
- 4.- La desialización de una isoforma ácida de la FSH incrementó su afinidad por la Concanavalina-A. Este hallazgo sugiere la existencia de una estrecha correlación entre el contenido particular de carbohidratos (o su arreglo espacial) en la molécula de FSH y su acción a nivel de la célula blanco. Alternativamente este hallazgo podría también indicar la existencia de efectos inhibitorios del ácido siálico en la unión de FSH a su receptor.
- 5.- Posiblemente los estrógenos y GnRH actúan conjuntamente para determinar los tipos específicos de FSH que son sintetizados por la hipófisis anterior.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Araki S., Toran-Arelland D., Ferin M., Vande W.R. (1975): Immunoassay reactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during maturation in the rat: ontogeny of regional hypothalamic difference. *Endocrinology* 97:696.
- 2.- Arimura, A., Debeljuk, L. and Schally, A.V. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 140:609, 1972.
- 3.- Austin C.R. y Short R.V. (1972): Células germinales y fertilización. Libro 1. *Procesos de reproducción en los mamíferos.* Cambridge University Press. p. 92.
- 4.- Austin C.R. y Short R.V. (1979): Hormonas en la reproducción. Libro 3. *Procesos de reproducción en los mamíferos.* Cambridge University Press. p. 1-3, 68.
- 5.- Baenziger J.V., Green E.D. (1988): Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem et Biophys Acta*, 947:287-306.
- 6.- Bishop, L.A., Robertson, D.M., Cahir, N. and Schofield, P.R. (1994): Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle-stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Molecular Endocrinology*, 8:722-731.
- 7.- Bloom, W. and Fawcett, D.W. (1975): "A textbook of histology. Tenth Ed. Saunders, Philadelphia. p. 506-535.
- 8.- Blum W., Gupta D. (1980): Age and sex-dependent nature of the polymorphic forms of rat pituitary FSH: The role of glycosylation. *Neuroendocrinol Lett.* 2: 357.
- 9.- Blum W.F.P., 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.

- 10.- Blum W.F.P. Riegelbauer G., Gupta D. (1985): Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on in-vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J. Endocrinol* 105: 17-27.
- 11.- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y. and Schally, A.V. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37:705, 1969.
- 12.- Boothby M., Rudson R.W., 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.
- 13.- Brown-Grant, K., Exley, D. and Naftolin, F.J. (1970): Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during oestrous cycle of the rat. *J. Endocr.* 48:295.
- 14.- Burgus, R., Dunn, T.F., Desiderio, D., Ward, D.N. Vale, W. and Guillemin, R. (1970): Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature*, 226:321.
- 15.- Cameron J.L., Chappel S.C. (1985): Follicle-stimulating hormone within and secreted from anterior pituitaries of female golden hamster during the estrous cycle and after ovariectomy. *Biol. Reprod.* 33:132-39.
- 16.- Chappel S.C. (1981): The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by Concanavalin-A chromatography. *Endocrinology* 109:935.
- 17.- Chappel S.C., Coutifaris C., Jacobs S.J. (1982): Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* 110:847-854.
- 18.- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C. (1983): Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev.* 4:179.

- 19.- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A., Ramaley J.A. (1983): Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*. 28:196-205.
- 20.- Chappel S.C., Bethea C.I., Spies H.G. (1984): Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology*. 115:452.
- 21.- Clayton R.N. (1982): Gonadotropin-releasing hormone modulation of its on pituitary receptors: Evidence for biphasic regulation. *Endocrinology*. 111:152-155.
- 22.- Cobo E., López G., Pérez G. (1979). Reproducción, Corporación Centro Regional de Población (CCRP). Fotolito García e Hijos, Bogotá, Colombia. p 15-22.
- 23.- Dalkin A.C., Haisenleder D.J., Ortolano G.A., Ellis T.R., Marshall J.C.(1989): The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulating differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 125:917-921.
- 24.- Debeljuk, L., Arimura, A. and Schally, A.V. (1972): Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in intact male rats of different ages. *Endocrinology*, 90:585.
- 25.- Debeljuk, L., Arimuara, A. and Schally, A.V. (1972): Cichoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized Rhesus monkey. *Endocrinology*, 90:1499.
- 26.- Dierschke, D.J., Bhattacharya, A.N., Atkinson, L.E. and Knobil, E. (1970): Pituitary responsiveness to LH-releasing hormone in intact female rats of different age. *Endocrinology*, 87:850.

- 27.- Esch F.S., Mason A.J., Cooksey K., Mercado M., Shimasaki S. (1986): Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the chain of bovine follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 256:5121-5127.
- 28.- Feder, H.H. (1981): Estrous cyclicity in mammals. En: "Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior". N.T. Adler Dir. Chapter 10 p. 279-348. Plenum Press-Nueva York.
- 29.- Filicori M., Mimmi P., Bolelli G., Franceschetti F., Possati G., Flamigni C. (1982): The pattern of LH and FSH pulsatile release: Physiological and clinical significance. En flamigni C, Givens JR (Eds). *The Gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females*, New York. Academic Press, p. 365-375.
- 30.- Findlay A.L.R.: La reproducción y el feto. Ed. El Manual Moderno. Serie: Principios fisiológicos en medicina. México 239 p. 1987.
- 31.- Foulds L.M., Robertson D.M. (1983): Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. *Mol. Cell. Endoc.* 31:117-130.
- 32.- Galle P.C., Ulloa-Aguirre A., Chappel S.C. (1983): Effects of estradiol phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *Journal of Endocrinology* 99:31-39.
- 33.- Green, J.D. and Harris, G.W. *J. Endocrinol.* 5:136, 1947.
- 34.- Green, J.D. and Harris, G.W. *J. Physiol.* 108:359, 1949.
- 35.- Greenspan F.S. and Forsham P.H.: *Endocrinología básica y clínica*. Ed. El Manual Moderno. México. p. 386, 414, 415, 452, 458. 1988.
- 36.- Hall J.E., Schoenfeld D.A., Martin K.A., Crowley W.F. (1992): Hypothalamic gonadotropin releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal follicular transition. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:600-607.

- 37.- Ham A.W. and Cormack D.H. Tratado de Histología. Nva. Ed. Interamericana, 8a. Ed. México p. 880-900, 939-956. 1986.
- 38.- Harris, G.W. En: Control of ovulation. C.A. Villee Ed. Pergamon press, New York 1961, p. 56.
- 39.- Hsueh A.J.W., Adashi E.Y., Jones P.B.C., Welsh T.H. (1984): Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endoc. Rev.* 5:76-126.
- 40.- Hsueh A.J.W., Bicsak T.A., Jia X.C., Dahl K.D., Fauser B.C.J.M., Galway A.B., Czekala N., Pavlov S.N., 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.
- 41.- Hunter W.M. & Greenwood F.C. (1963): Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature.* 194:495-496.
- 42.- Jeffcoate S., Greenwood R., Holland D. (1974): Blood and urine clearance of luteinizing hormone releasing in man measured by radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* 60:305-309.
- 43.- Kamberi, I., Mical, R. and Porter, J.C. (1970): Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indoleamines on LH release. *Endocrinology*, 87:1.
- 44.- Kamberi, I., Mical, R. and Porter, J.C. (1971): Hypophysial portal vessel infusion in vivo demonstration of LRF, FRF, and PIF in pituitary stalk plasma. *Endocrinology*, 89:1042.
- 45.- Kato, J. (1970): In vitro uptake of tritiated oestradiol by the anterior hypothalamus and hypophysis of the rat. *Acta Endocr*, 64:687.
- 46.- Khan S.A., Katzija G., Froyso B., Diczfalusy E. (1984): Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone Baboon pituitary preparations. *J. Med. Primatol.* 13:295-304.

- 47.- Krummen L.A., Woodruff T.K., De Guuzma G. (1993): Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*. 132:431-443.
- 48.- Larrea F., Oliart R.M., Escorza A., Valencia X., Ulloa-Aguirre A.: Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisarias y regulación hormonal de la esteroidogénesis. *Rev. Invest. Clin. (Méx)*. 40:33-45. 1988.
- 49.- Lea and Febiger. (1970): *Reproduction and Breeding Techniques of laboratory animals*. E.S.E. Hafez. Philadelphia. p. 116.
- 50.- Le Nestour E., Morraoui 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.
- 51.- Locke, W. and Schally, A.V. *The hypothalamus and pituitary in health and disease*. Ch. C. Thomas, Springfield, 1972, p. 176.
- 52.- Marder M.L., Channing C.P., and Schwartz N.B. (1977): Suppression of serum follicle stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinology*. 101: 1639.
- 53.- McCann, S.M. and Taleisnik, S. (1960): Hypothalamic regulation of luteinizing hormone secretion. *Science*, 132:1496.
- 54.- 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.
- 55.- Mittler, J. C. and Meites, J. *Proc. Soc. exp. Biol. Med*. 117:309, 1964.
- 56.- Mortola J.F., Sathanandan M., Pavlov S., Dahl D.K., Vale W., River J., Yen S.S.C. (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.

- 57.- Nankin, H.R. and Troen, P. (1971): Repetitive luteinizing hormone elevations in serum of normal men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 33:558.
- 58.- O'Riordan J.L.H., Malan P.G. and Gould R.P.: *Fundamentos de Endocrinología*. Ed. Limusa. México, 1988, pp. 233.
- 59.- Padmanabhan V., Sairam M.R., Hassing J.M., Brown M.B., Ridings J.W., Beitins I.Z. (1991): Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cell. *Mol. Cell Endocrinol.* 79:119-128.
- 60.- Padmanabhan V., Micher C.D., Borondy M., Ianson H., Wood R.I., Landefeld T.D., Foster D.L., Beitins I.Z. (1992): Circulating bioactive FSH and less acidic FSH isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology.* 131:213-220.
- 61.- Peckham W.D., Yamaji T., Dierschke D.J., Knobil E. (1963): Gonadal function and the biological and physicochemical properties of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 92:1660.
- 62.- Peluso J.J. and Downey C. (1982): Pattern of follicular development during the estrous cycle of aged rats. *Cell Tissue Res.* 225:229-234.
- 63.- Pierce J.G., Parsons T.F. (1981): Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev. Biochem.* 50:465-495.
- 64.- Policastro P., Ovitt C.E., Hoshina M., Fukuoka H., Boothby M.R., Boime I. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:11492-11499.
- 65.- Popa, G. and Fielding, V.J. *Anat.* 65:88, 1930.
- 66.- Rabinovici J., Spencer S.J., Doidi N., Goldsmith P.C., Schwall R., Jaffe R.B. (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.

- 67.- Ramaley J.A. (1979): Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biol. Reprod.* 20:1-31.
- 68.- Redding, T.W., Schally, A.V., Arimura, A. and Matsuo, H. (1972): Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology*, 90:764.
- 69.- Reichert L.E., Ramsey R.B. (1977): Evidence for the existence of a large molecular weight protein human pituitary tissue having follicle-stimulating hormone activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44:545.
- 70.- Robertson D.M., Von Damme M.P., Diczfaluzi E. (1977): Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Moll. Cell. Endocrinol.* 9:45.
- 71.- Robertson D.M., Foulds S.M., Ellis S. (1982): Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing: differences between sexes and after castration. *Endocrinology*. 111:385-91.
- 72.- Rossmann W.G., Laughlin G.A., Mortola J.F., Johnson M.L., Veldhuis J.D., Yen S.S.C. (1990): Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by midluteal phase corpus luteum: Temporal link luteinizing hormone pulses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70:990-995.
- 73.- Shaikh A.A., Shaikh S.A. (1975): Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocrinology*. 96:37-44.
- 74.- Sherins R.J., Vaitukaitis J.L., Chrambach A. (1973): Physical characterization of hFSH and its desialylation products by isoelectric focusing and electrophoresis in polyacrylamide gel. *Endocrinology*. 92:1135-41.

- 75.- Sherwood N.M., Chiappa S.A., Sarkar D.K., Fink G. (1980): Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrus rats: effects of anesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. *Endocrinology*. 107:1410-17.
- 76.- Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. (1984): Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Wilkins and Wilkins, Co. 3a Ed. USA. pp. 1-107.
- 77.- Tower B.B., Clark B.R., Rubin R.T. (1977): Preparations of <sup>125</sup>I polipeptide hormones for radioimmunoassay using glucose oxidase with LPO. *LIFE Sci.* 21:959.
- 78.- Ulloa-Aguirre A., Chappel S.C. (1982): Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J. of Endocrinology*. 95:257.
- 79.- 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.
- 80.- Ulloa-Aguirre A., Mejía J.J., 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.
- 81.- Ulloa-Aguirre A., Espinoza R., Damián Matsumura P., Chappel S.C. (1988): Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Reproduction*. 3:491-501.
- 82.- Ulloa-Aguirre A., Damián Matsumura P., Espinoza R., Domínguez R., Morales L., Flores A. (1990): Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern on anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.* 126:323-332.

- 83.- 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.
- 84.- 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.
- 85.- 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.
- 86.- Wildt L., Hausler A., Marshall G., Hutchinson J.S., Plant T.M., Belchetz P.E., Knobil E. (1981): Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 109:371-376.
- 87.- Wislocki, G.B. and King, L.S. *Am. J. Anat.* 58:421, 1936.
- 88.- Yen S.S.C. and Jaffe R. (1991): *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. W.B. Saunders Co. 2nd. Ed. U.S.A. p. 75-108, 115-133, 140-150, 200-230.