



00346  
10  
24  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ACTIVIDAD BIOLOGICA E INMUNOLOGICA DE LA  
HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE EN  
CONDICIONES BASALES Y DESPUES DE ESTIMULOS  
REPETIDOS CON GnRH EN LOS DIFERENTES  
ESTADIOS DE PUBERTAD EN EL VARON.**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A :  
CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1997.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

**A mi esposo Carlos con todo mi amor, porque él es mi más grande motivación para lograr todos mis sueños.**

**A mis padres que siempre están conmigo y siguen creyendo en mí.**

**A mis hermanos y sobrinos, porque me alimentan con su alegría.**

**A mi futuro hijo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre por haber fungido como mi co-asesor a lo largo de los dos años de la Maestría

Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Al personal del laboratorio Mecanismos de Acción Hormonal II y al personal de la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la maestría.

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
Objetivos.....	17
Hipótesis.....	17
Sujetos y Métodos.....	18
Métodos.....	20
Fluoroimmunoensayo de FSH.....	20
Bioensayo "in vitro" de FSH.....	22
Radioinmunoanálisis de AMPc.....	23
Análisis estadístico.....	24
Resultados.....	25
Discusión.....	29
Conclusiones.....	36
Referencias.....	37

## ABREVIATURAS

LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
RIA	Radioinmunoanálisis
IFMA	Ensayo inmunofluorométrico
CDF	Concentrado de fracciones
AMPC	Adenosín-monofosfato-cíclico
ADnc	Acido desoxirribonucleico complementario
hFSH	FSH humana
293-hFSHR	Células fetales de riñon humano 293, transfectadas con ADnc del receptor recombinante para hFSH
H-H-G	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
SNC	Sistema Nervioso Central
B/I	Relación bioensayo/inmunoensayo

**RESUMEN**

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada se activa nuevamente durante la pubertad, después de haber permanecido en una pausa fisiológica relativa durante la infancia. La síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo estimula la secreción de las gonadotropinas hipofisiarias: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), éstas se liberan en forma bifásica, lo cual demuestra la existencia de dos pozas funcionales. Cada una representa distintas condiciones fisiológicas (sensibilidad y reserva). Las gonadotropinas ejercen su acción biológica sobre las gónadas al estimular la esteroidogénesis y la gametogénesis.

El objetivo de este trabajo es determinar, durante los diversos estadios de pubertad en el varón, la actividad inmunológica y biológica "in vitro" de la FSH secretada tanto en condiciones basales, como la obtenida después de estímulos repetidos con GnRH a una dosis baja (sensibilidad) y a una dosis alta (reserva). Se incluyeron 25 varones sanos los cuales se encontraban distribuidos en los 5 estadios de Marshall y Tanner de desarrollo puberal. A cada sujeto se le extrajo sangre cada 10 min durante 2 hrs en forma basal; posterior a ello, se administraron 10 µg de GnRH y se extrajo sangre cada 10 min durante 4 hrs. Por último, se administraron 90 µg de GnRH y se repitió el muestreo antes indicado. Para determinar las concentraciones inmunológicas de la FSH, se utilizó la técnica de fluoroinmunoensayo. Para el análisis de la actividad biológica, se constituyeron 5 grupos de

muestras para cada sujeto, correspondientes a periodos de 2 hrs cada uno (concentrado de fracciones 1 a 5) (CDF). Se practicó un bioensayo para FSH que cuantifica el AMPc en células fetales de riñon humano 293, transfectadas con ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) del receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR). Los resultados de los ensayos fluoroimunométricos, mostraron que todos los sujetos presentan respuesta significativa a ambos estímulos de GnRH; siempre existió una mayor respuesta al estímulo con 90  $\mu$ g que al estímulo con 10  $\mu$ g. La  $\Delta 2$  fue mayor en los estadios 2, 3, 4 ó 5 que la  $\Delta 1$ . Todos los grupos de muestras fueron capaces de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente. Las relaciones bioensayo/inmunoensayo de los diferentes CDF de suero de FSH, pertenecientes a los individuos clasificados en los estadios 1, 2, 4 y 5, no difirieron al compararse entre sí. Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los CDF 2 vs 4, 2 vs 5, 3 vs 4, de los individuos en el estadio de Tanner 3. Estas diferencias no pueden ser explicadas claramente y posiblemente sean debidas al reducido tamaño de la muestra. Con esto, podemos concluir que los sujetos que ya iniciaron la pubertad poseen una mayor reserva hipofisiaria en relación con la sensibilidad, que aquellos individuos prepuberales, lo que nos puede indicar la existencia de un mecanismo más de maduración hipotálamo-hipofisiario. La actividad inmunológica aumenta conforme los individuos se encuentran en un mayor estadio de Tanner, mientras que la actividad biológica permanece constante.

## INTRODUCCION

La pubertad se define como la etapa de transición de la niñez a la vida adulta. Los cambios tanto físicos como psicológicos que se presentan, condicionan que el individuo, muchas veces con dificultad, tenga que adaptarse a su nueva situación biopsicosocial. La pubertad debe de ser considerada como una fase más del desarrollo gonadal, la cual conduce finalmente a la maduración sexual completa y a la fertilidad. Durante esta etapa se desarrollan las características sexuales secundarias, como consecuencia de la síntesis y secreción de esteroides gonadales (1). La edad de la aparición de la pubertad es variable puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y medio-ambientales (2,3). La pubertad se inicia, en las sociedades occidentales, antes de los 15 años en el varón, en tanto que en la mujer este evento ocurre generalmente antes de los 13 (4). Al inicio de la pubertad las gónadas se desarrollan tanto en tamaño como en sus funciones endocrina y reproductiva especializadas. Por un lado, la producción total de hormonas sexuales aumenta progresivamente y por el otro, en asociación y dependencia íntima con los eventos hormonales, se adquiere la capacidad de la gametogénesis. La consecuencia de la producción aumentada de hormonas sexuales es el desarrollo de las características sexuales secundarias, cuya aparición señala desde el punto de vista físico, el inicio de la pubertad (1).

La descripción comparativa de los cambios físicos entre individuos y poblaciones requiere de un método objetivo y reproducible que describa y clasifique las características sexuales

secundarias. Estas características fueron agrupadas y descritas por Marshall y Tanner (5,6) y en la actualidad constituye la clasificación más aceptada internacionalmente. En el varón, dicha agrupación reconoce las siguientes características: volumen testicular, rugosidad, coloración y elongación del escroto; longitud y grosor del pene; cantidad, distribución y características de vello pubiano. Con base en esto, la pubertad del varón puede ser clasificada desde el estadio 1 de desarrollo (estado prepuberal) hasta el estadio 5 que corresponde al adulto normal (7). En los varones la pubertad se inicia con la elongación escrotal y el aumento en el volumen testicular (8). El testículo prepuberal tiene un volumen de 1.8 a 4.2 ml. El crecimiento puberal de los testículos se presenta dentro de un período promedio de aproximadamente 4 años adquiriendo un volumen final mayor de 15 ml. El crecimiento testicular se da principalmente a expensas de la maduración de los túbulos seminíferos por la acción de la FSH y de la testosterona sintetizada por las células de Leydig del intersticio testicular (7).

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) se activa nuevamente durante esta etapa de la vida, después de haber permanecido en una pausa fisiológica relativa durante la infancia (9). Los mecanismos íntimos que dan inicio a la pubertad no han sido perfectamente dilucidados, pero es la activación del eje H-H-G lo que genera todos los cambios somáticos característicos de esta etapa. La síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante

(FSH) por la hipófisis. Estas estimulan a su vez a las gónadas en sus dos funciones principales: la esteroidogénesis y la gametogénesis (4,10).

Han transcurrido casi 50 años desde que por vez primera se propuso que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas LH y FSH, se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior (11). Dentro de la complejidad de los eventos que conducen a la síntesis y secreción de las gonadotropinas, ha sido demostrado desde hace varios años que la acción de la GnRH producida en el hipotálamo es un factor determinante para este fin. En 1960, Mc Cann y cols. (12) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de LH y FSH por la hipófisis anterior. En 1971, los trabajos tanto de Matsuo (13) como de Schally (14), indicaron que un decapeptido era el directamente responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces como hormona liberadora de gonadotropinas.

El sistema nervioso central (SNC) se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico (15). Este péptido es secretado siempre en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (16).

Las neuronas controladoras de la secreción de GnRH reciben inervación de otras neuronas capaces también de estimular o inhibir la función gonadal. Ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina modifican el control central de la GnRH (17). Por ejemplo, la inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal de la rata desencadena la liberación de GnRH y consecuentemente de LH y FSH; los bloqueadores alfa adrenérgicos previenen la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y los medicamentos que controlan el bloqueo alfa adrenérgico pueden impedir la ovulación en la mujer. Las endorfinas y otros opioides endógenos pueden influir en la secreción de GnRH y consecuentemente de gonadotropinas, como ha sido demostrado por nuestro grupo (18). La morfina y sus análogos inhiben la ovulación, así como el antagonista de los opioides la naloxona induce la ovulación en algunas pacientes con hiperprolactinemia, amenorrea ó anorexia nervosa (19).

Los efectos de retroalimentación de los estrógenos son mediados en parte por un efecto central sobre las fibras catecolaminérgicas proyectadas hacia el hipotálamo (20).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión estimula la hidrólisis de fosfoinosítoles de membrana y moviliza el calcio de los depósitos intracelulares. Estas acciones junto con la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática, provocan un aumento bifásico de la concentración de calcio citosólico y consecuentemente la liberación

de las gonadotropinas (21). Los mecanismos dependientes de calcio, son los responsables de la liberación aguda de gonadotropinas contenidas en los gránulos de almacenaje y también contribuyen a la síntesis de las subunidades de las gonadotropinas. Las acciones del calcio y de los mensajeros derivados de los fosfolípidos, al igual que aquellos provenientes de los nucleótidos cíclicos (AMPC), están mediados por la activación de proteínas cinasas y la fosforilación de sustratos reguladores en las células blanco. Un mediador intracelular de la señal de calcio en el gonadotropo es la calmodulina, la cual después de unirse al calcio altera la actividad de varias enzimas y proteínas del citoesqueleto que están implicadas en los procesos secretores (22). Tanto las proteínas cinasas dependientes de calcio-calmodulina, como las proteínas cinasas dependientes de los calcio-fosfolípidos (proteína cinasa C), están involucradas en la estimulación de la liberación de FSH por GnRH (21,23,24). El mecanismo por el cual la fosforilación de las proteínas incrementa la síntesis y liberación de las gonadotropinas, probablemente involucra la fosforilación ribosomal y la modulación de los sistemas de traducción en los gonadotropos. También se ha propuesto que la activación de un elemento proteico en el complejo contráctil citoesqueleto-vesícula ocurre después de la fosforilación, llevando a la extrusión de los gránulos que contienen a las hormonas (24). El número de receptores hipofisarios a GnRH puede ser incrementado farmacológicamente mediante la exposición de la glándula a GnRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una respuesta mayor de la glándula a la estimulación de la GnRH (25,26). Por el

contrario se ha demostrado que la progesterona disminuye el número de receptores de GnRH en cultivos hipofisiarios (27).

La LH y la FSH, al igual que la tirotropina y la gonadotropina coriónica humana, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos cadenas glicopeptídicas, unidas por puentes de hidrógeno, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. La beta, es única para cada gonadotropina y le confiere su actividad biológica específica (28,29). Las gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), al estimular la secreción de esteroides, así como la maduración de los gametos (28). En los testículos, la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermatogénesis; en el ovario, también induce la gametogénesis. La LH estimula la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona; en la mujer la LH promueve la esteroidogénesis ovárica (30,31).

La GnRH, liberada en forma pulsátil condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El tónico, es el patrón de secreción observado en los varones y también uno de los mecanismos de control en la mujer. La secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente siempre es pulsátil o episódica, bien que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto). Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, existe dificultad para detectar los pulsos cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (32).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, ya que cuando se expone la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (33,34). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conduce a una respuesta hormonal disminuida. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobreestimulación de la célula (35). Asimismo, ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria. La frecuencia en la pulsatilidad de GnRH varía de acuerdo al ambiente endócrino existente. Por ejemplo, ha sido demostrado que esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (36). Por lo tanto, el SNC modifica la descarga de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo conforme al ambiente endócrino existente (37).

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas. Los receptores esteroideos han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde se han relacionado con la regulación de la conducta sexual, la regulación de la secreción de GnRH y la diferenciación del cerebro (38).

Otras hormonas diferentes a los esteroides gonadales y a las gonadotropinas también han sido relacionadas con la regulación de la función reproductiva. Estas incluyen a la inhibina y a las activinas (39-41), así como a la prolactina, que inhibe la secreción de GnRH y a la dopamina, que bajo algunas circunstancias directamente inhibe la secreción de LH (42). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar directamente en el hipotálamo para modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) y la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (43).

Por otro lado, hay que señalar que al igual que la insulina, la vasopresina y el glucagon, las gonadotropinas son almacenadas en gránulos de las células secretoras y se liberan en forma bifásica (44). Esta liberación se caracteriza por un aumento agudo inicial; posteriormente, se presenta un período de estabilización o de caída seguido por una segunda fase de incremento en la tasa de secreción. El fenómeno de la liberación bifásica se ha explicado mediante la hipótesis que señala la existencia de dos pozas metabólicas de hormona liberable. Se estima que la primera poza metabólica es sintetizada en gránulos cercanos a la membrana celular y que es fácilmente liberable. La segunda poza metabólica originada en gránulos no tan cercanos a la membrana celular, posiblemente requiere de la síntesis de "novo" de hormona y de la activación del sistema de microtúbulos y microfilamentos en respuesta a un aumento de calcio y AMPc, lo cual ocasiona la migración de los gránulos hacia la membrana celular y la subsecuente liberación de la hormona (22,45). Se ha demostrado que

durante la infusión de GnRH (por cuatro horas) en varones normales, las concentraciones de LH sérica presentan un patrón bifásico de elevación. Este patrón es caracterizado por un aumento agudo durante los primeros 30 minutos, seguido por una "meseta" o una caída hasta los 90 minutos aproximadamente, momento en el cual se inicia el segundo aumento el cual continua hasta el final de la infusión (46). Se ha sugerido que las dos fases de liberación de LH representan una clara evidencia de la existencia de dos pozas metabólicas funcionales de LH en la hipófisis humana, una que es rápidamente liberable y otra que requiere de una estimulación más prolongada para su liberación (46,47). Este mismo patrón de liberación ha sido descrito para la FSH ya que se ha observado que después del estímulo con GnRH existe una respuesta aguda a los 20 minutos y una segunda respuesta a los 120 minutos (48).

La administración de dosis submáximas de GnRH por un período de varias horas, bien sea mediante inyecciones repetidas o por infusión constante, permite evaluar tanto la poza metabólica de gonadotropinas que se libera de forma aguda como aquella que se libera tardíamente. Cada poza metabólica representaría distintas condiciones fisiológicas, pues la primera nos hablaría de la sensibilidad del gonadotropo y la segunda de la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos pozas metabólicas hipofisiarias de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisiaria. Si la estimulación con GnRH es breve y pequeña (10  $\mu$ g), el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisiaria y probablemente reflejará la

concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisiaria, requiere de una duración más prolongada de la estimulación o de una mayor cantidad de GnRH (90-100 $\mu$ g). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje, la cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100-150  $\mu$ g), no se pueden apreciar por separado los componentes de sensibilidad y reserva, ya que existe una acción más potente que ocasiona la liberación de ambas pozas (49).

Al igual que otras hormonas glicoproteicas la FSH, se une a sus células blanco incrementando los niveles intracelulares de AMPc. En el testículo, la FSH interactúa con receptores específicos de superficie celular localizados en la membrana plasmática de las células de Sertoli (50). La unión de la FSH con su receptor estimula a la adenilato ciclasa, unida a la membrana celular, catalizándose la formación de AMPc. La liberación de AMPc hacia el citoplasma es seguida por la adición de AMPc a la subunidad reguladora de la proteína cinasa. Posteriormente, se presenta la disociación de la subunidad reguladora y consecuentemente la activación de la subunidad catalítica de la enzima; ésta última, fosforila a las proteínas celulares responsables del efecto biológico del primer mensajero. En las células de Sertoli, la elevación en los niveles de AMPc después de la unión de FSH activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (51) y estimula la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) y de proteínas, incluyendo a la proteína fijadora de andrógenos y al complejo enzima aromatasa que convierte la testosterona a estradiol (52).

El receptor de la FSH es un miembro de la superfamilia de receptores unidos a proteínas Gs, los cuales tienen la característica de poseer un dominio amino terminal extracelular. Este dominio tiene varios sitios potenciales de glicosilación y posee porciones ricas en leucinas. La porción extracelular del receptor de FSH está unido a la región que contiene siete dominios transmembranales los cuales se conectan por 3 asas extracelulares y 3 asas citoplásmicas. Se ha propuesto que las asas citoplásmicas interactúan con las proteínas Gs asociadas a la membrana, las cuales activan la adenilato ciclasa después de que se lleva a cabo la unión de la hormona con dicho receptor (53,54). La región carboxilo terminal intracelular contiene un dominio que es rico en residuos de serinas y treoninas, algunas de las cuales pueden ser sitios de fosforilación. Por otra parte, se ha demostrado que la porción extracelular del receptor de FSH, el cual tiene 3 sitios potenciales de glicosilación unidos a Asparaginà, es la parte fundamental del receptor que proporciona la especificidad y la alta afinidad de la unión con la hormona (55).

Hasta ahora, al referirnos a las concentraciones de FSH lo hemos hecho tomando en consideración las concentraciones inmunoactivas de la hormona. Sin embargo, la acción biológica de las hormonas no está necesariamente determinada por los niveles inmunoactivos de las mismas, sino por la actividad biológica específica que tenga cada una de estas hormonas, ya que pueden existir concentraciones altas de una hormona, determinadas por un método inmunológico, que no posean actividad biológica alguna o en las que la actividad biológica esté disminuida, por lo que la

acción biológica estará limitada. Los métodos tradicionales para cuantificar a la FSH se basan en su actividad inmunológica, como es el caso del radioinmunoanálisis (RIA), sin embargo se ha podido comprobar que la inmunoactividad de FSH no refleja necesariamente los niveles de FSH bioactiva (56).

Con base en lo anterior, podemos señalar que la determinación de la actividad biológica de una hormona es la que finalmente indicará con mayor precisión las acciones "in vivo" que tendrá dicha hormona. Los primeros ensayos para determinar la actividad biológica de FSH fueron realizados "in vivo". En ellos, se estimulaba con FSH el crecimiento de folículos ováricos, en ratas inmaduras pretratadas con la gonadotropina coriónica, cuantificándose las respuestas en las células blanco (57). Sin embargo el realizar ensayos "in vivo", en diversas circunstancias, no es factible desde el punto de vista biológico. Asimismo, estos ensayos en muchas ocasiones no poseen una especificidad completa son imprecisos y poco sensibles. Con base en lo anterior, ha sido necesario en años recientes el diseñar ensayos biológicos "in vitro", para valorar la actividad biológica de la FSH. Estos se realizan en tejidos endócrinos, membranas, cultivos primarios de células dispersas, o en líneas celulares permanentes. Los bioensayos "in vitro" se han clasificado de acuerdo a la naturaleza específica de la respuesta hormonal, cuantificándose respuestas proximales o respuestas distales, así como también respuestas mitogénicas o citoquímicas (58,59). Debido a que un gran número de sustancias pueden potenciar o inhibir la respuesta en el bioensayo, siempre se deberá de elegir el bioensayo más específico para cada

caso. Los ensayos iniciales desarrollados para la cuantificación de la FSH eran limitados en cuanto a la sensibilidad, especificidad y precisión; en años posteriores, se han desarrollado otros bioensayos de alta calidad para la cuantificación de la actividad biológica de esta hormona (60-63). En los bioensayos desarrollados por Tilly y cols. (62) y Albanese y cols. (63), se utilizan líneas celulares establecidas, transfectadas con el receptor recombinante de FSH humano (hFSHR), lo cual permite medir la bioactividad de FSH con un alto grado de sensibilidad y especificidad, facilitándose la medición de la bioactividad en muestras de suero que contienen bajas concentraciones de gonadotropinas como sucede en los individuos prepuberales (32). Las líneas celulares con el receptor recombinante, tienen una estabilidad del cultivo por mayor tiempo, responden de una manera dosis dependiente a la FSH y no a otras hormonas glicoproteicas, permiten que el bioensayo tenga especificidad de especie, no se requiere de un cultivo primario y dicho bioensayo puede ser completado en 24 horas después de la adición de la hormona (62,63).

Un modelo experimental en el cual se han estudiado los cambios en la secreción de FSH bioactiva en inmunoactiva antes y al inicio de la pubertad han sido las ovejas hembra. Padmanabhan y cols. (64), demostraron que durante la inducción de la pubertad en dichos animales, mediante la administración pulsátil con GnRH exógena, da como resultado un incremento en las concentraciones de FSH bioactiva. Sin embargo, las concentraciones de FSH inmunoactiva no muestran dicho incremento. En los últimos años se han realizado un gran número de estudios para caracterizar la actividad inmunológica

y/o la actividad biológica de las gonadotropinas en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas en el ser humano (8,36,49,60,65). Las interrogantes actuales sobre los mecanismos íntimos que dan inicio al proceso puberal han llevado a diversos grupos de investigadores a tratar de demostrar diferencias en la actividad biológica y/o en la relación B/I a lo largo del proceso puberal. Sin embargo, en los estudios hasta ahora realizados solamente se han cuantificado muestras únicas en los sujetos estudiados. Debido a la pulsatilidad de las gonadotropinas, estos estudios no han podido determinar con precisión la relación entre las actividades biológica e inmunológica en esta etapa de la vida (66-68). De hecho, dos de los estudios (66,67) los cuales fueron llevados a cabo por el mismo grupo de investigadores, demuestran resultados contradictorios en cuanto a la relación B/I en los diferentes estadios puberales.

### OBJETIVOS

Determinar, durante los diversos estadios de pubertad en el varón, la actividad inmunológica y la actividad biológica "in vitro" de la FSH tanto en condiciones basales, como después de estímulos repetidos con GnRH a dosis baja (sensibilidad) y a dosis alta (reserva). Comparar la relación de la actividad biológica con la actividad inmunológica entre los diferentes estadios puberales del varón, bajo las diferentes condiciones experimentales.

### HIPOTESIS

La actividad inmunológica y la actividad biológica "in vitro" de la FSH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos repetidos con GnRH, presentan variaciones en los diferentes estadios de pubertad en el varón.

## SUJETOS Y METODOS

Se incluyeron un total de 25 varones normales (Tanner 1, n=5; Tanner 2, n=5; Tanner 3, n=6; Tanner 4, n=4; Tanner 5, n=5) clasificados de acuerdo con lo propuesto por Marshall y Tanner (6), tomándose como parámetro de referencia primordial el volumen gonadal, (Tabla 1). Las características clínicas de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se encuentran detalladas en la tabla 2. La exploración física siempre fue realizada por los mismos dos observadores, entre los cuales siempre se concordó en el estadio de Tanner al que pertenecía cada individuo.

En ninguno de los sujetos estudiados había existido antecedente alguno de enfermedad endocrinológica y todos ellos cumplieron con los criterios de inclusión señalados originalmente.

1. Sujetos masculinos mayores de 9 años de edad y de 30 Kg de peso y por arriba de la percentila 3 de talla y peso para cada edad específica.
2. Desarrollo puberal en estadio 1, 2, 3, 4 ó 5 de acuerdo con la clasificación de Tanner.
3. Ausencia de cualquier tipo de patología endocrinológica o crónica debilitante, después de una evaluación clínica detallada.
4. Presentar tres días antes del estudio concentraciones de hemoglobina mayores de 14 gr/dl y hematocrito mayor del 40%.
5. Consentimiento voluntario para participar en el estudio.

**TABLA 1**

ESTADIO DE TANNER	VELLO PUBICO	VOLUMEN TESTICULAR (C.C.)
1	Ausencia de vello	1.8-4.2
2	Largo, delgado, ligeramente pigmentado en la base del pene	4.3-8.9
3	Aumento del grosor, de la pigmentación y del rizamiento, se extiende hacia los lados del pubis.	9.0-11.4
4	Tipo adulto, pero no cubre parte del abdomen ni los muslos.	11.5-14.9
5	Adulto	>15

**TABLA 2**  
**CARACTERISTICAS CLINICAS**

<b>SUJETO</b>	<b>EDAD (AÑOS)</b>	<b>VOLUMEN GONADAL (C.C.)</b>	<b>PENE (cms)</b>	<b>VELLO PUBICO</b>	<b>EDAD OSEA (AÑOS)</b>
<b>TANNER 1</b>					
1	11	3.0-3.0	4.5	1	11
2	9	3.0-3.0	3.5	1	10
3	11	2.6-4.1	5.0	1	11
4	12	3.2-3.2	4.5	1	9
5	10	2.6-3.2	4.5	1	10
<b>TANNER 2</b>					
6	10	4.2-4.7	5.0	2	11
7	14	8.5-8.5	5.5	2	13
8	10	6.3-6.3	5.0	1	10
9	11	5.2-6.3	5.5	2	11
10	12	8.5-8.5	5.7	1	12
<b>TANNER 3</b>					
11	13	9.5-9.5	9.0	3	13
12	14	9.5-9.5	4.0	2	14
13	13	9.5-8.6	4.5	3	13
14	12	9.5-9.5	4.5	2	12
15	13	9.5-9.5	6.5	2	13
16	13	11.0-11.0	7.0	3	14
<b>TANNER 4</b>					
17	13	14.0-14.0	7.0	4	15
18	14	14.0-14.0	6.5	4	16
19	15	14.0-14.0	8.2	4	15
20	16	11.5-14.0	9.0	4	16
<b>TANNER 5</b>					
21	23	19.9-25.0	7.5	5	>18
22	24	15.8-15.8	8.5	5	>18
23	24	19.9-19.9	8.0	5	>18
24	24	25.0-25.0	8.5	5	>18
25	23	19.9-25.0	9.0	5	>18

I= IZQUIERDA

D= DERECHA

Como se encuentra detallado en la tabla 3, las concentraciones hormonales basales de LH, T, y E<sub>2</sub> de cada uno de los sujetos estudiados fueron concordantes con el estadio de Tanner en el que se encontraba cada sujeto. La LH fue cuantificada por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo. Los reactivos para el análisis fueron proporcionados por el Programa Especial de Investigación y Desarrollo en Reproducción Humana de la OMS (Ginebra, Suiza). Los resultados se encuentran expresados en mUI/ml de acuerdo a la primera preparación de referencia internacional. Los coeficientes de variación inter e intra-análisis fueron de 11% y 6%. Los reactivos para las cuantificaciones de T y E<sub>2</sub> también fueron donados por el Programa Especial de Investigación y Desarrollo en Reproducción Humana de la OMS. Los coeficientes de variación para T fueron menores al 7% y al 8%, mientras que para E<sub>2</sub> fueron menores al 7% y al 7.5%

Para realizar el protocolo experimental, se obtuvo la aprobación tanto del Comité de Ética del Hospital (Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán), como de los adultos y de los padres de los niños participantes.

El protocolo experimental consistió en lo siguiente: a cada sujeto se le extrajo sangre (1.5 mls) cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron (i.v.) 10 µg de GnRH sintética (SERONO, México) y se extrajo sangre (1.5 mls) cada 10 minutos durante 4 horas. Inmediatamente después, se administraron 90 µg de GnRH (i.v.) y se repitió el muestreo antes indicado. Los pacientes acudieron al Hospital media hora antes de iniciar el estudio con el fin de ser canalizados, instalándose una

**TABLA 3**  
**CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES**

SUJETO	LH (mUI/ml)	T (ng/ml)	E2 (pg/ml)
1	1.2	0.4	14.7
2	0.5	0.3	14.9
3	2.7	0.3	24.1
4	2.8	0.6	22.3
5	2.5	0.4	<13
6	1.7	0.7	38.7
7	2.7	2.1	15.5
8	2.5	3.8	29.4
9	0.9	1.1	19.5
10	2.2	1.5	23.5
11	5.0	4.7	32.1
12	2.1	1.6	37.4
13	3.3	1.2	<13
14	2.9	1.3	13.7
15	2.8	2.9	20.9
16	2.4	1.2	<13
17	3.2	4.0	47.0
18	7.7	2.4	38.4
19	2.8	4.8	21.5
20	3.2	4.7	40.7
21	6.2	5.5	36.4
22	5.0	4.2	42.0
23	5.8	4.6	32.3
24	8.3	7.5	52.2
25	12.0	6.1	27.6

**VALORES DE REFERENCIA**  
(n=20)

**PREPUBERTES**  
LH <3.0  
T <3.8  
E<sub>2</sub> <60.0

**ADULTOS**  
3.0-12.0  
3.8-10.0  
<60.0

mariposa #21, en una vena antecubital. El protocolo siempre dio inicio a las 8:00 am. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon las primeras cinco gotas correspondientes a la solución salina. Durante las 10.5 horas, los pacientes permanecieron en posición de decúbito, ingiriendo un desayuno a las 8:30 horas consistente en un vaso de jugo de naranja, un plato de cereal con leche (250 ml) y un plátano, así como una comida a las 14:00 horas consistente en sopa de pasta, guisado de carne y una pieza de fruta, además de un vaso de agua.

#### **METODOS**

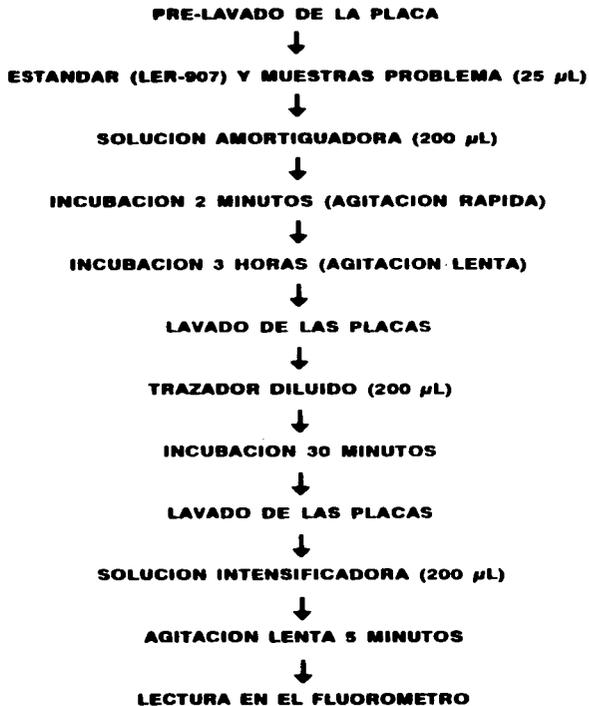
Cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se coagulara para centrifugarlas a 1000 X g. El suero resultante de cada muestra (aproximadamente 800  $\mu$ l) se separó en 2 alícuotas.

- 1) Una alícuota de 200  $\mu$ l que fue utilizada para el ensayo fluoroinmunométrico (IFMA) de FSH.
- 2) Una alícuota de 600  $\mu$ l que se utilizó para constituir los concentrados de fracciones para el bioensayo.

Ambas alícuotas se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día en que se llevo a cabo el análisis correspondiente.

#### **Fluoroinmunoensayo de FSH**

La cuantificación de FSH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90  $\mu$ g de GnRH, se hizo mediante ensayos fluoroinmunométricos (IFMA), (Figura 1) de acuerdo con la metodología descrita por Lövgren, T., y por Hemmilä, I., y cols.



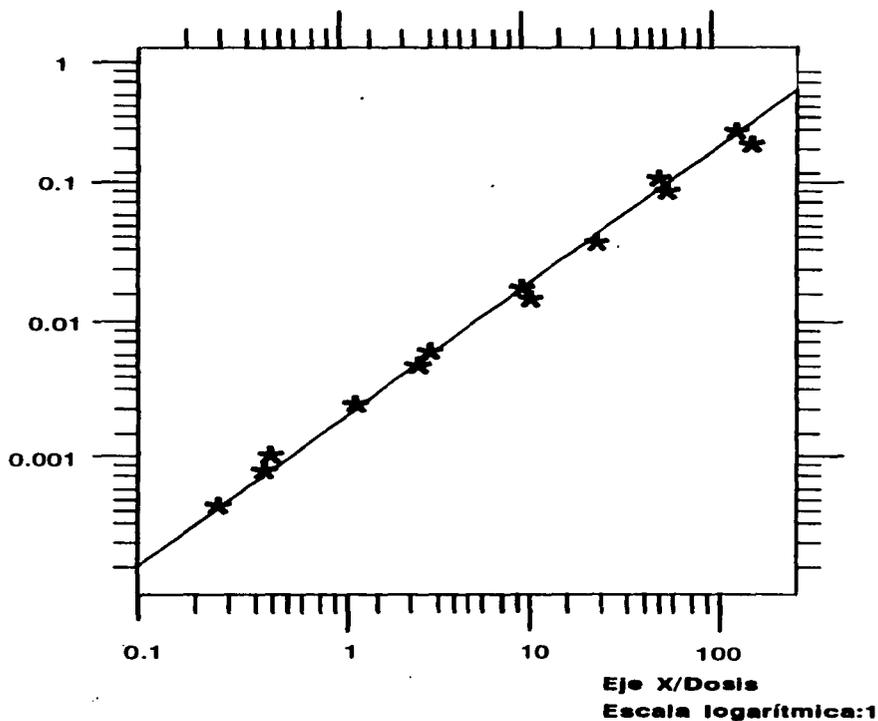
Lövgren T, Hemmlä I y cols, 1984.

**FIGURA 1. INMUNOFLUOROENSAYO DE FSH**

(69,70). Los resultados son expresados en UI/L en relación con la segunda preparación de referencia internacional de FSH (2° IRP-HMG), se realizó una curva estándar de calibración, utilizando la FSH LER-907 (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, EUA) (NIADDK), a concentraciones de 0.25 a 100.0 ng de FSH inmunoreactiva diluida en PBS 0.05 M (Figura 2). Con el fin de que no existiesen variaciones interanálisis para un mismo sujeto, todas las muestras de un individuo se incluyeron en el mismo ensayo. Para analizar las variaciones interanálisis se utilizaron los mismos controles de calidad en cada uno de los ensayos. Para determinar las variaciones intranálisis se utilizaron controles de calidad (Immunoassay Tri-level control, Lot. 012, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) al principio, a la mitad y al final de cada uno de los ensayos. El fin de cuantificar las concentraciones de FSH a lo largo del estudio, fue el de estimar tanto la actividad inmunológica, como los picos máximos de la hormona, tanto en condiciones basales como bajo el estímulo con 10  $\mu$ g y 90  $\mu$ g de GnRH.

Posterior a dicha cuantificación, se constituyeron 5 concentrados de fracciones (CDF) por separado para cada sujeto, correspondientes a las 2 horas basales (CDF 1), primeras 2 horas pos-10  $\mu$ g de GnRH (CDF 2), siguientes 2 horas pos-10  $\mu$ g de GnRH (CDF 3), primeras 2 horas pos-90  $\mu$ g de GnRH (CDF 4), y últimas 2 horas pos-90  $\mu$ g de GnRH (CDF 5), dichos CDFs fueron sometidos a un bioensayo específico.

Eje Y/Respuesta  
Escala logarítmica:1000



**FIGURA 2.** Curva estándar de calibración, el estándar utilizado fue la preparación FSH LER-907. La sensibilidad es de 0.25 ng a 100 ng de FSH Inmunoreactiva. (1ng LER-907 equivale a 0.053 UI/L de acuerdo al 2<sup>o</sup> IRP-HMG).

### **Bioensayo "in vitro" de FSH**

Previo a analizar la bioactividad de cada uno de los concentrados, se inactivaron los sueros calentándolos durante 10 minutos a 56°C antes de adicionarlos al cultivo celular; esto se llevo a cabo con el fin de evitar el efecto inhibitor no específico sobre la formación de AMPc (71-72). Se ha demostrado que con este tratamiento no se altera la inmunoactividad ni la bioactividad de la FSH (73). Este hecho se confirmó al realizar un RIA para calcular el porcentaje de recuperación de la actividad inmunológica de cada uno de los CDFs habiéndose obtenido siempre una recuperación mayor al 90%.

La actividad biológica "in vitro" de los concentrados correspondientes a cada uno de los CDFs de FSH se determinó mediante el empleo de un bioensayo que cuantifica el AMPc en células fetales de riñon humano 293, transfectadas con cDNA del receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR). Estas células fueron generosamente donadas por el Dr. Aaron J.W. Hsueh, de la Universidad de Stanford, CA, USA. El origen, manejo, especificidad del ligando y las propiedades bioquímicas del receptor de hFSH humano expresado por esta línea celular han sido descritas por Tilly et al., 1992, y Albanese et al., 1994 (62,63).

A cada pozo de cultivo se le agregaron 300  $\mu$ l de medio D-MEM bajo en glucosa (Gibco, BRL) con 0.125 mM 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA), 150,000 células en 100  $\mu$ l de medio y (25, 50, 75 y 100  $\mu$ l) de cada uno de los concentrados de FSH, por triplicado. Después de 24 horas de incubación a 37°C, en un incubador húmedo con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>,

el medio y las células fueron extraídos. El producto se calentó a ebullición por 3 minutos y posteriormente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de la cuantificación del contenido de AMPc total (intra y extracelular) el cual fue determinado por RIA.

La actividad biológica aparente "in vitro" de la FSH se expreso en términos del índice de actividad biológica entre la actividad inmunológica (B/I).

#### **Radioinmunoanálisis de AMPc**

Cada sobrenadante procedente del cultivo fue analizado en su contenido de AMPc por RIA, siguiendo la metodología descrita por Stuner y cols. (74), con las siguientes modificaciones. El RIA se llevó a cabo utilizando como estándar, el AMPc (81c-0220) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA). El anticuerpo empleado fue el AMPc CV-27 del NIADDK a una dilución final de 1:50,000. Como marcador se utilizó, 2-O-monosuccinil tirosil-metil ester de AMPc (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA) radiomarcado con  $\text{NaI}^{125}$  (Amersham International Limite, Reino Unido) por el método de Cloramina T (75). Para incrementar la sensibilidad del ensayo todas las muestras se acetilaron junto con los estándares, agregando  $25\ \mu\text{l}$  de trietilenamina y anhídrido acético en una proporción 2:1. Después se incubaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, el AMPc libre y aquel unido al anticuerpo fueron separados por precipitación etanólica, seguido esto por la centrifugación a  $1200\ \text{X g}$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , por último se decanto y se contó la radioactividad de la pastilla. La sensibilidad de los ensayos fue de  $3.125\ \text{fmol/pozo}$ . Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo fueron menores de 12% y 6% respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias entre el incremento 1 ( $\Delta 1$ ) y el incremento 2 ( $\Delta 2$ ), de cada uno de los sujetos estudiados, se realizaron comparaciones por medio de una prueba de T-pareada. Para valorar las diferencias existentes entre cada incremento, se utilizó un nivel alfa de significancia  $<0.05$ .

Con el fin de analizar la secreción total de FSH a lo largo de las 5 condiciones experimentales diferentes se hicieron comparaciones mediante la determinación de áreas bajo la curva, por el método trapezoide con la ayuda de un programa de computación (AREABACU).

Las relaciones B/I de los CDFs de FSH, se compararon por medio de un ANOVA y una prueba de T-pareada. Para valorar las diferencias existentes entre cada CDF, se utilizó un nivel alfa de significancia  $<0.05$ .

Se utilizó el análisis de regresión lineal para determinar el grado y significancia de las relaciones B/I "in vitro".

**Incremento ( $\Delta$ ):** se define como el aumento progresivo del valor más alto y se expresa como el incremento entre dicho valor y la concentración media de la parte más baja.

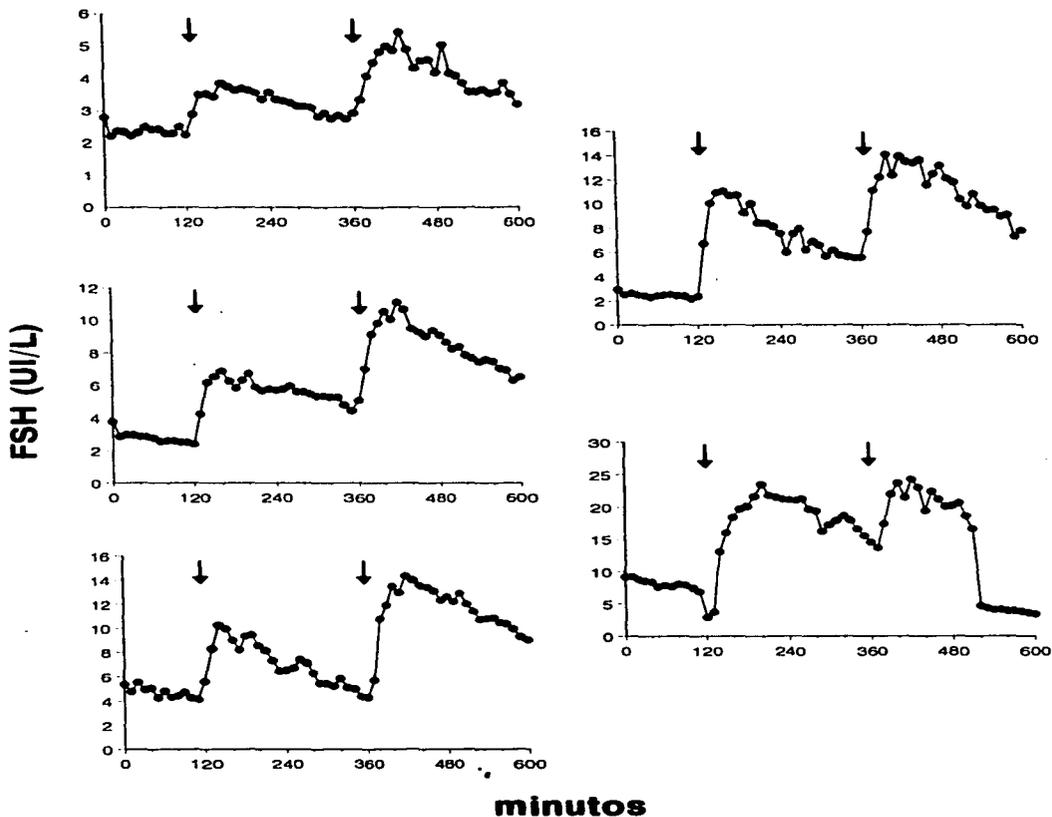
**Incremento 1 ( $\Delta 1$ )** - La resta del valor mas alto después del estímulo con 10  $\mu\text{g}$  de GnRH menos la media de los valores basales.

**Incremento 2 ( $\Delta 2$ )** - La resta del valor mas alto después del estímulo con 90  $\mu\text{g}$  menos el valor antes del estímulo.

## RESULTADOS

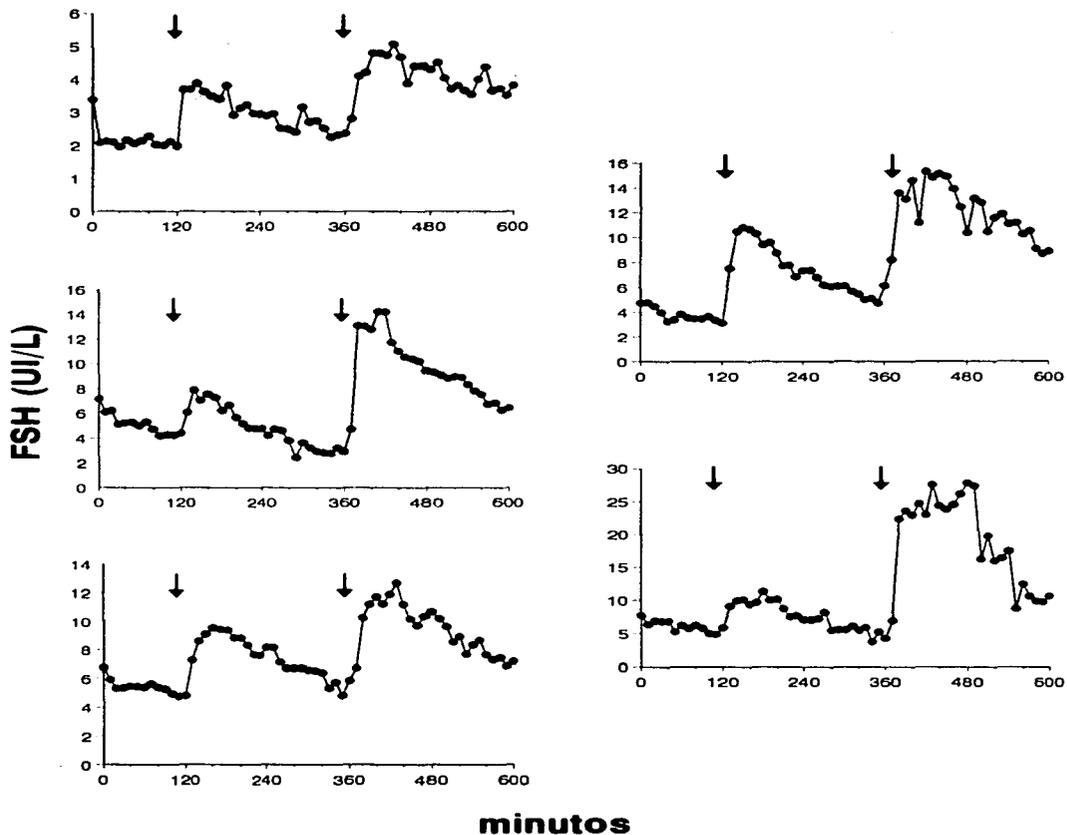
Se llevó a cabo el análisis fluoroinmunométrico con el fin de analizar la actividad inmunológica de cada una de las muestras obtenidas en cada sujeto estudiado. En todos los casos, se observaron concentraciones basales de FSH concordantes con el estadio de Tanner en el que cada individuo había sido clasificado. Estas concentraciones presentaban fluctuaciones correspondientes a la secreción pulsátil y a la vida media de la hormona. Asimismo, todos los sujetos presentaron respuesta significativa tanto al estímulo con 10  $\mu\text{g}$  de GnRH, como al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH; en todos los casos, se observó una mayor respuesta al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  que al estímulo con 10  $\mu\text{g}$ . Las respuestas fueron acordes, en cuanto a las concentraciones de la gonadotropina se refiere, con el estadio de Tanner al que pertenecía cada uno de los sujetos (Figuras 3-7). Los picos máximos de respuesta, después de la dosis de 10  $\mu\text{g}$  de GnRH, se encontraron entre los 20 y los 80 minutos (mediana de 40 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 1-4 y mediana de 20 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 5). Después del estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH, los picos máximos de respuesta se observaron entre los 20 y los 80 minutos (mediana entre 60 y 70 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 1-3 y mediana de 30 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 4 y 5) (Figuras 3-7).

Se calcularon los incrementos máximos de respuesta a ambos estímulos con GnRH. La  $\Delta 1$  fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los individuos en estadio 1 de Tanner, al compararse con aquella

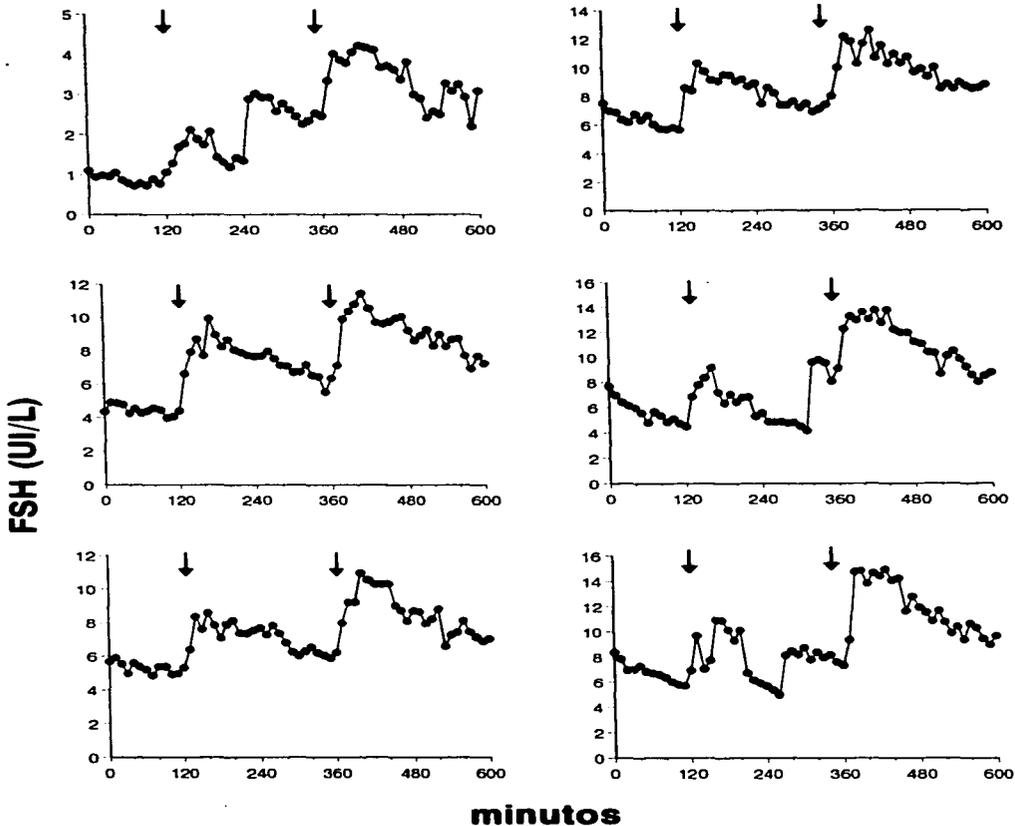


**FIGURA 3.**

Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógeno en cinco sujetos en estadio 1 de la clasificación de Tanner. En cada gráfica, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg de GnRH.

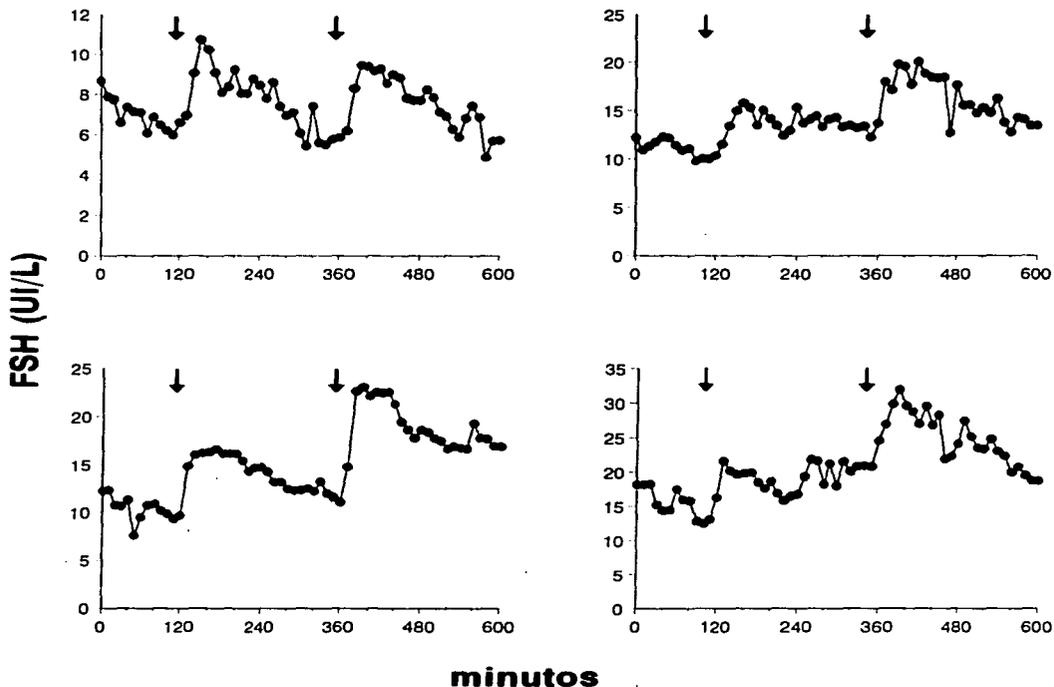


**FIGURA 4.** Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógeno en cinco sujetos en estadio 2 de la clasificación de Tanner. En cada gráfica la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10  $\mu$ g de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90  $\mu$ g de GnRH.

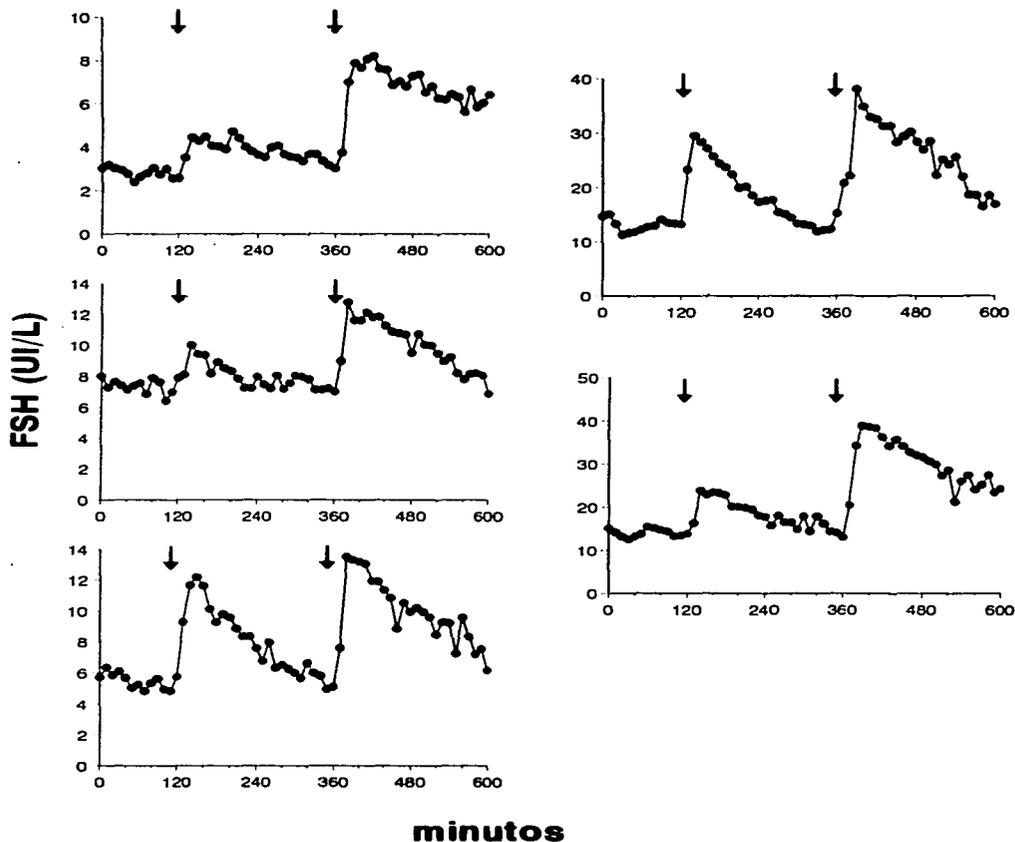


**FIGURA 5.**

Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógeno en seis sujetos en estado 3 de la clasificación de Tanner. En cada gráfica, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg de GnRH.



**FIGURA 6.** Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógeno en cuatro sujetos en estadio 4 de la clasificación de Tanner. En cada gráfica, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg de GnRH.



**FIGURA 7.** Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógeno en cinco sujetos en estadio 5 de la clasificación de Tanner. En cada gráfica, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg de GnRH.

obtenida en los sujetos que se encontraban en estadio 2 ó 3 (tabla 4). No existió diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la  $\Delta 1$  se refiere, entre ningún otro grupo. Al probar la significancia estadística de la  $\Delta 2$ , solamente se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los sujetos en estadio 3 de Tanner y aquellos en estadios 4 ó 5. La  $\Delta 2$  máxima presentó valores que no difirieron estadísticamente de aquellos encontrados en la  $\Delta 1$  en los sujetos en estadio 1 de Tanner; sin embargo, la  $\Delta 2$  fue mayor que la  $\Delta 1$  en los individuos pertenecientes al resto de los estadios de Tanner, observándose significancia estadística ( $p < 0.05$ ) en todos los casos.

Por último, con el fin de evaluar las diferencias existentes en la cantidad de secreción total de FSH entre los 5 grupos estudiados, se procedió a analizar las áreas bajo la curva de la producción de FSH. Para ello, procedimos a dividir las 10 horas totales del protocolo experimental en 5 grupos diferentes: área 1 (2 horas basales), área 2 (primeras 2 horas pos 10  $\mu\text{g}$  de GnRH), área 3 (siguientes 2 horas pos 10  $\mu\text{g}$  de GnRH), área 4 (primeras 2 horas pos 90  $\mu\text{g}$  de GnRH), y área 5 (últimas 2 horas pos 90  $\mu\text{g}$  de GnRH) (Tabla 5). El análisis estadístico al evaluar las diferencias en el patrón de secreción de la FSH sérica entre las áreas de los 5 grupos (Tanner 1-5), así como en las diferentes fases del estudio experimental demostró que las áreas bajo la curva 1,2,3 y 4 correspondientes a los sujetos clasificados como Tanner 1, difirieron significativamente de las áreas 1,2,3 y 4 existentes en los individuos en estadio 4 de Tanner, observándose una  $p < 0.05$ . El resto de las comparaciones realizadas entre los diferentes estadios

**TABLA 4**

**INCREMENTO MAXIMO DE FSH A CADA UNO DE LOS ESTIMULOS CON GnRH**

	$\Delta 1$	$\Delta 2$
Tanner 1 (n=5)	7.08 ± 4.90	7.32 ± 2.55
Tanner 2 (n=5)	4.14 ± 1.86	10.94 ± 6.50
Tanner 3 (n=6)	3.85 ± 1.01	5.13 ± 1.71
Tanner 4 (n=4)	5.92 ± 1.97	8.52 ± 3.13
Tanner 5 (n=5)	7.52 ± 5.32	13.93 ± 9.31

Los valores se expresan como  $\bar{x} \pm DE$

p < 0.05 ( $\Delta 1$ ) 1 vs 2 y 1 vs 3

p < 0.05 ( $\Delta 2$ ) 3 vs 4 y 3 vs 5

p < 0.05 ( $\Delta 1$  vs  $\Delta 2$ ) 2, 3, 4 y 5

**Incremento 1 ( $\Delta 1$ )** = La resta del valor mas alto después del estímulo con 10  $\mu g$  de GnRH menos la media de los valores basales.

**Incremento 2 ( $\Delta 2$ )** = La resta del valor mas alto después del estímulo con 90  $\mu g$  menos el valor antes del estímulo.

TABLA 5

ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE FSH  
 AREAS BAJO LA CURVA  
 ( $\bar{x} \pm DE$ )

ESTADIO DE TANNER	AREA BAJO LA CURVA (UI/L/2 HRS)					
	1	2	3	4	5	
1	483.2	251.4 <sup>a,1</sup>	1065.4±579.4 <sup>b,1</sup>	931.4±644.7 <sup>1</sup>	1403.0±623.5 <sup>1</sup>	858.6±267.7
2	539.4±167.8 <sup>a</sup>	858.9±260.9 <sup>b</sup>	586.6±183.4	1443.5±681.0	985.7±375.0	
3	679.0±080.4 <sup>a</sup>	970.2±095.9 <sup>b</sup>	841.4±055.0	1341.4±185.6	981.1±101.1	
4	1313.2±361.5 <sup>a</sup>	1691.0±424.7	1603.5±580.7	2210.0±810.4	1669.8±622.9	
5	1103.1±430.1 <sup>a</sup>	1678.5±781.4	1233.4±487.2	2275.7±1215.7	1643.6±818.9	

<sup>1</sup> P<0.05 vs Tanner 4

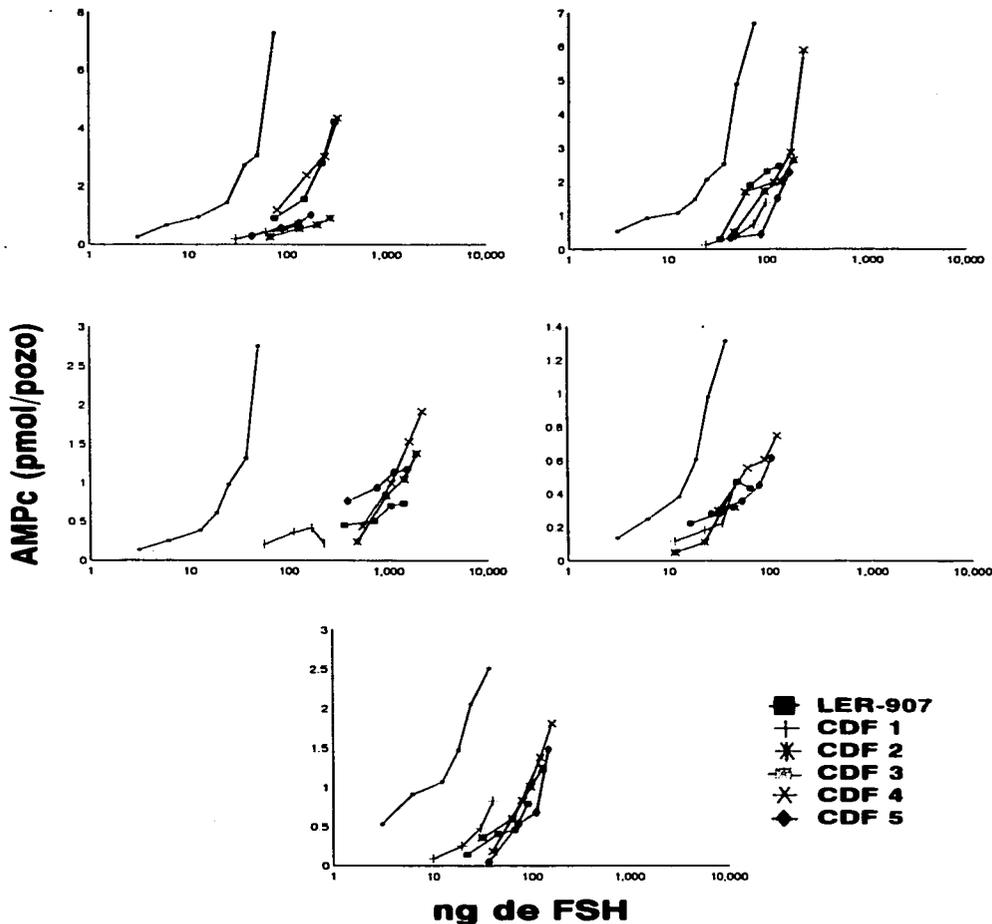
<sup>a</sup> P<0.05 vs area 2 y area 4

<sup>b</sup> P<0.05 vs area 4

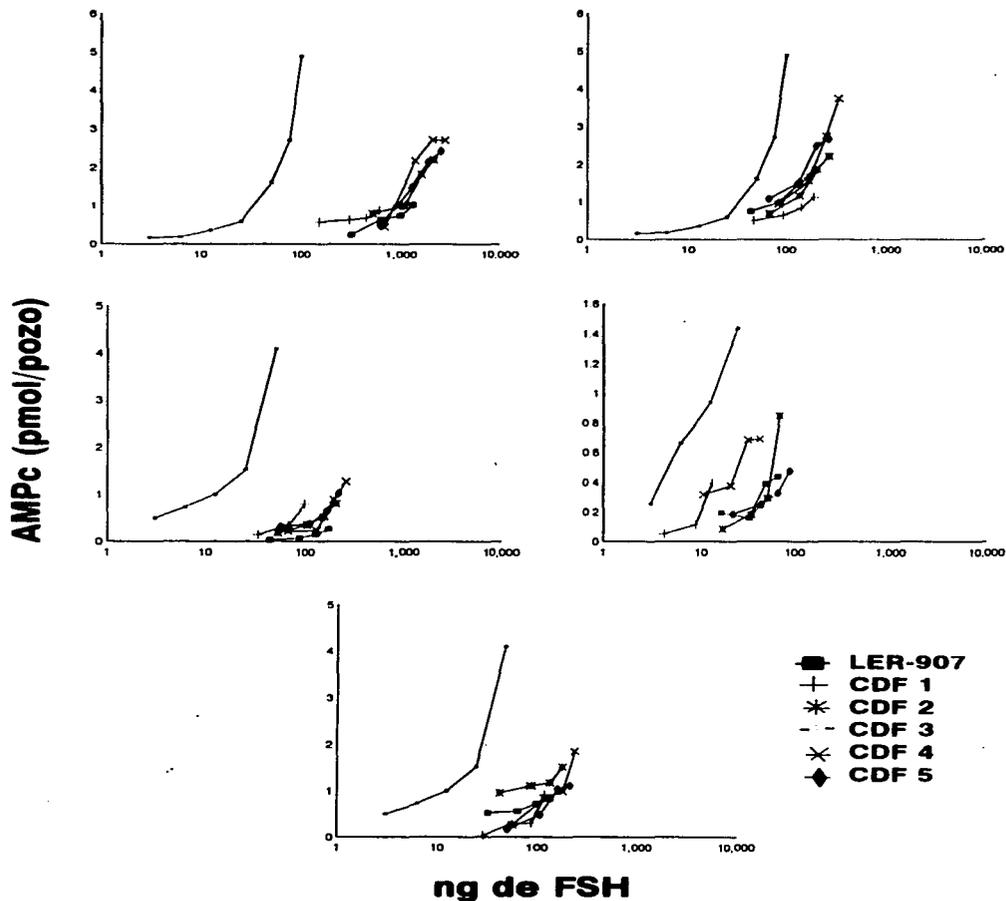
de Tanner no demostraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, a pesar de eso, posiblemente por el número reducido de pacientes estudiados, se puede apreciar claramente en la tabla 5, cómo la cantidad total de FSH secretada de manera basal (área 1) es cada vez mayor conforme avanza la pubertad. Este hecho se mantiene constante en las otras cuatro áreas salvo por los sujetos que se encuentran en estadio 1 de Tanner, ya que éstos presentan una secreción total de la hormona similar a los individuos en estadio 2 ó 3 de Tanner. Asimismo, hay que señalar que al comparar las cinco áreas bajo la curva de secreción de FSH en cada estadio de Tanner, se observó que las áreas 2 y 4 en todos los estadios de Tanner fueron significativamente mayores que el área 1 ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, se encontró que en los sujetos en estadio de Tanner 1, 2 ó 3 el área 2 difirió significativamente del área 4 ( $p < 0.05$ ); dicho fenómeno no se presentó en los estadios de Tanner 4 ó 5.

La actividad biológica relativa "in vitro" fue calculada considerando cada dosis (25, 50, 75, 100  $\mu$ l) analizada por RIA, y esto fue expresado como la relación de la actividad B/I. Cada uno de los CDF (del 1 al 5) de los diferentes sueros fueron capaces de inducir la producción de AMPc de forma dosis dependiente, de manera significativa, al ser expuestos a la línea celular 293-hFSHR (Figuras 8-12).

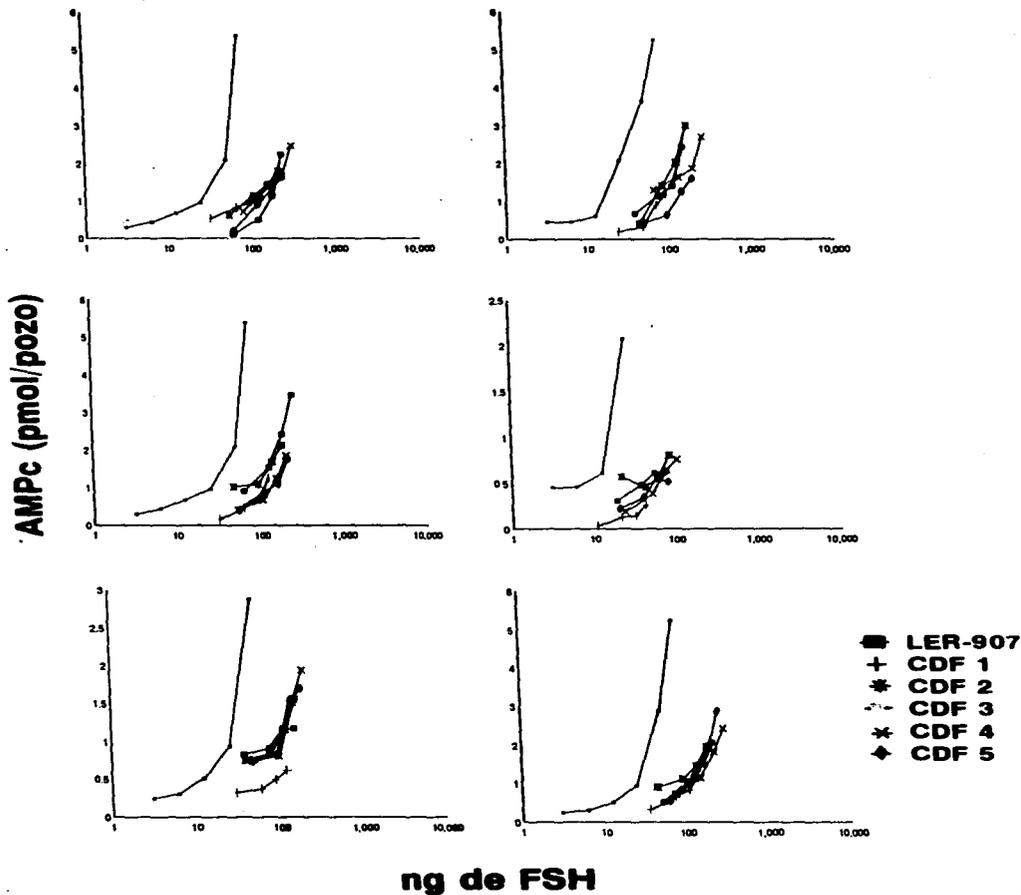
Con respecto a la curva dosis respuesta observada en los diferentes CDFs de suero que pertenecían a los individuos clasificados en los estadios de Tanner 1, 2, 4 y 5, los resultados fueron similares entre sí, ya que las relaciones B/I de FSH no



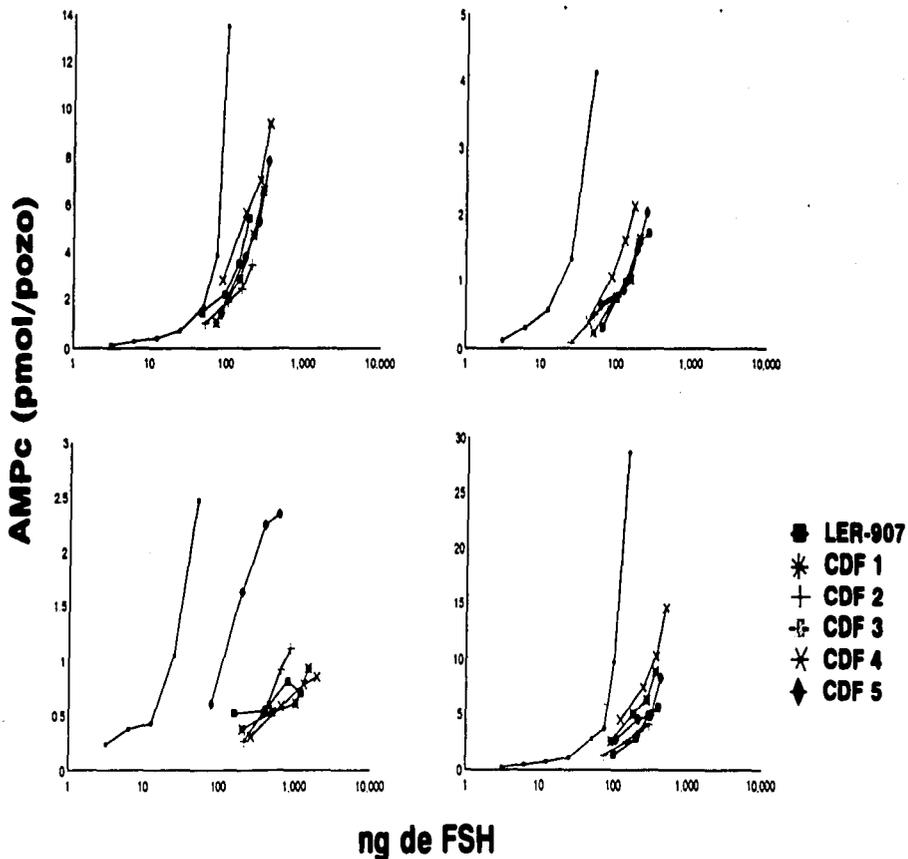
**FIGURA 8.** Curvas dosis-respuesta de los cinco sujetos en estadio 1 de la clasificación de Tanner. Cada uno de los concentrados de fracciones (CDF) fue capaz de inducir la producción de AMPC de manera dosis dependiente en la línea celular 293-hFSHR. Los cinco CDFs están expresados en  $\text{ng} \times 10^{-1}$



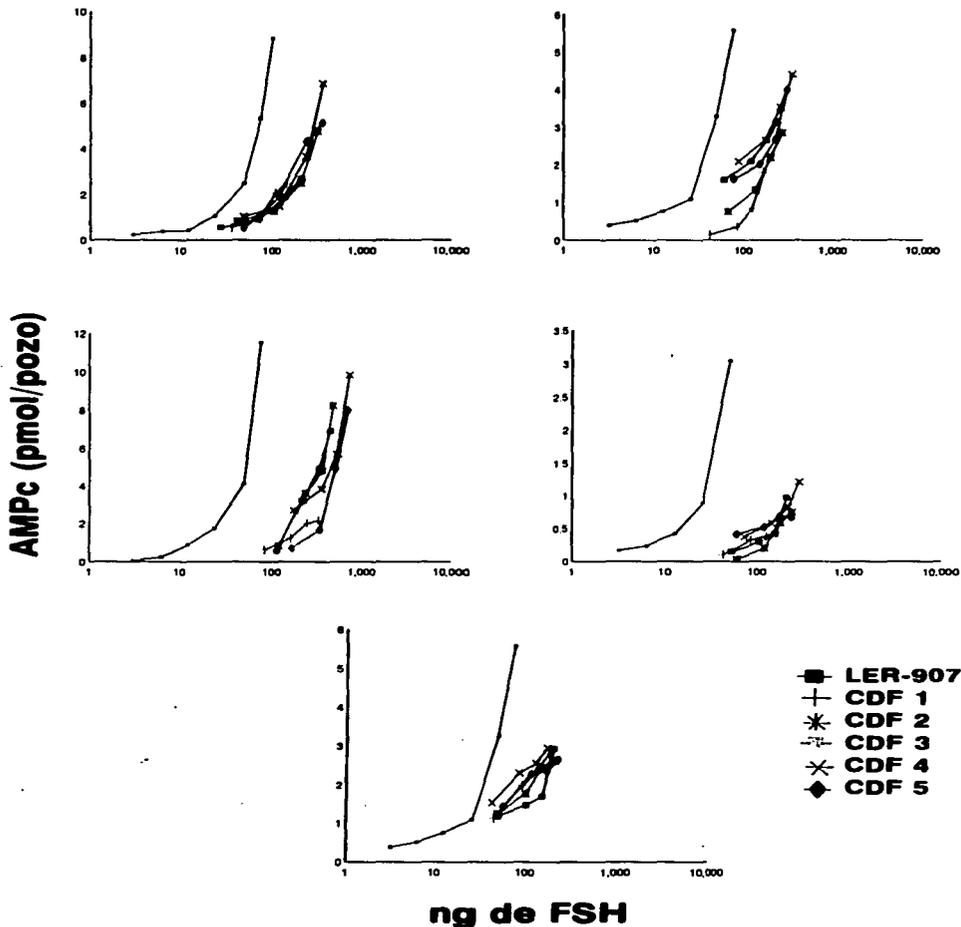
**FIGURA 9.** Curvas dosis-respuesta de los cinco sujetos en estadio 2 de la clasificación de Tanner. Cada uno de los concentrados de fracciones (CDF) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dependiente en la línea celular 293-hFSHR. Los cinco CDFs están expresados en  $\text{ng} \times 10^{-1}$



**FIGURA 10.** Curvas dosis-respuesta de los seis sujetos en estadio 3 de la clasificación de Tanner. Cada uno de los concentrados de fracciones (CDF) fue capaz de inducir la producción de AMPC de manera dosis dependiente en la línea celular 293-hFSHR. Los cinco CDFs están expresados en  $\text{ng} \times 10^{-1}$



**FIGURA 11.** Curvas dosis-respuesta de los cuatro sujetos en estado 4 de la clasificación de Tanner. Cada uno de los concentrados de fracciones (CDF) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular 293-hFSHR. Los cinco CDFs están expresados en  $\text{ng} \times 10^{-1}$



**FIGURA 12.** Curvas dosis-respuesta de los cinco sujetos en estadio 5 de la clasificación de y Tanner. Cada uno de los concentrados de fracciones (CDF) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular 293-hFSHR. Los cinco CDFa están expresados en  $\text{ng} \times 10^{-1}$

difirieron significativamente (Tabla 6). Sin embargo, la curva dosis respuesta de los diferentes CDFs de suero pertenecientes a los individuos en estadio 3 de Tanner, si mostraron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) al comparar los CDFs 2 vs 4, 2 vs 5, y 3 vs 4.

Al comparar los resultados obtenidos de cada CDF entre los diferentes estadios de Tanner, se concluyó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las comparaciones realizadas ( $p > 0.05$ ).

TABLA 6  
 BIOACTIVIDAD DE FSE  
 RELACION B/I  
 ( $\bar{X} \pm DE$ )

ESTADIO DE TAMPER	CONCENTRADO DE FRACCIONES				
	1	2	3	4	5
1	1.77±0.64	1.84±0.81	2.20±0.83	2.16±0.30	1.84±0.65
2	1.70±0.92	1.77±0.90	1.34±1.40	1.75±1.12	1.22±1.02
3	2.37±0.60	2.92±0.21*	2.67±0.31**	2.17±0.13	2.12±0.20
4	2.85±1.15	2.33±1.13	2.82±1.39	2.28±0.84	2.09±0.87
5	2.41±1.12	2.19±0.84	2.22±0.70	2.12±0.86	1.96±0.64

\*p<0.05 vs CDF y CDF 5

\*\*p<0.05 vs CDF 4

**DISCUSION**

La GnRH liberada por el hipotálamo en forma pulsátil estimula la liberación de ambas gonadotropinas por parte de la hipófisis anterior (76). Tanto la LH como la FSH, secretadas también de manera pulsátil estimulan a las gónadas en sus funciones gametogénica y esteroidogénica (77). El eje hipotálamo-hipófisis-gónada permanece en un período de relativa quietud durante la infancia y no es sino hasta la pubertad cuando se activa nuevamente. Los mecanismos precisos que reactivan el eje no han podido ser dilucidados hasta la fecha (78).

La FSH, al igual que la LH y otras hormonas peptídicas, es almacenada en gránulos de las células secretoras y liberada en forma bifásica. La secreción inicial (sensibilidad) se considera que es debida a una poza metabólica presintetizada en gránulos cercanos a la membrana celular que es fácilmente liberable; mientras que la liberación tardía (reserva) posiblemente requiere de la síntesis de "novo" y de la activación del sistema de microtúbulos y microfilamentos (22, 45-47).

Con el fin de investigar de manera precisa la secreción de FSH inmunológica y biológicamente activa, a través del proceso puberal y valorar la secreción hormonal después de estímulos repetidos con GnRH (sensibilidad y reserva hipofisarias), se estudiaron 25 varones normales los cuales se encontraban distribuidos en los 5 estadios de Tanner de desarrollo puberal. En todos los sujetos estudiados, las concentraciones de la FSH a lo largo de las 2 horas en las que se cuantificó la hormona basalmente, las concentraciones

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

de la misma fueron concordantes con el estadio de Tanner al que pertenecía cada sujeto. La gonadotropina presentó fluctuaciones a lo largo de las 2 horas, lo que se puede explicar tomando como base la secreción pulsátil y la vida media de la misma, como ya ha sido demostrado previamente. Desde luego, la limitante de solamente haber cuantificado la hormona a lo largo de 2 horas, de manera basal, no nos permitió poder determinar la presencia de pulsos, ya que la vida media plasmática de la FSH es de 4 horas (79). Como ya ha sido reportado previamente, conforme los individuos se encuentran en un estadio de Tanner más avanzado, las concentraciones basales de FSH tienden a ser mayores, aunque hay que considerar que existen imbricaciones de las mismas entre los diversos estadios de Tanner (78). Con base en lo anterior, no se ha podido establecer una clasificación hormonal de los diferentes estadios puberales, ya que dichas imbricaciones se observan también al cuantificar LH o testosterona (80). Es por ello, que la clasificación clínica de Tanner sigue siendo la utilizada para estratificar a los diversos estadios puberales (18).

Todos los individuos estudiados respondieron significativamente tanto al estímulo con 10  $\mu\text{g}$  de GnRH, como al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH, habiendo sido la respuesta mayor siempre al segundo estímulo. La liberación de una cantidad menor después del primer estímulo nos hablaría que el tamaño de la primera poza metabólica es menor, además de que la hipófisis tiene la capacidad de sintetizar una mayor cantidad de hormona después de una segunda administración de GnRH. Este patrón de respuesta apoya el concepto, desde hace muchos años conocido, de la presencia de 2

componentes diferentes en cuanto a la síntesis y secreción de FSH liberable en la hipófisis anterior; uno que se libera inmediatamente y el otro que se libera de manera tardía (81). Una explicación alterna o complementaria es que se estuviese produciendo un efecto de autoimpregnación, lo que condicionaría una mayor respuesta al segundo estímulo. Este fenómeno ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo al realizar estímulos testiculares repetidos con gonadotropina coriónica a lo largo de la pubertad en el varón (30).

Tanto con el estímulo con 10  $\mu\text{g}$  de GnRH, como después del estímulo con 90  $\mu\text{g}$ , observamos mayores concentraciones de FSH conforme el estadio de Tanner era mayor; sin embargo, también existieron imbricaciones de algunos individuos pertenecientes a un estadio de Tanner con otros que se encontraban en un estadio de Tanner diferente. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en los que se ha observado una tendencia a una mayor respuesta, en términos de FSH, a un estímulo único de GnRH conforme es mayor el estadio de desarrollo puberal (48).

La existencia de una  $\Delta$  significativamente mayor al comparar a los individuos en estadio 1 con aquellos en estadio 2 ó 3 de Tanner, nos demuestra que la hipófisis de los individuos que se encuentran por iniciar la pubertad, se encuentra preparada para responder a la liberación de la poza metabólica de sensibilidad y que posiblemente lo que aún no ha madurado en estos individuos es el sistema específico de síntesis y/o secreción de la GnRH endógena. Una explicación alternativa es que la  $\Delta$  tiende a ser mayor, en estos individuos, porque las concentraciones basales son

menores. Las diferencias encontradas entre los individuos en estadio 3 de Tanner y aquellos en estadio 4 ó 5 en cuanto a la  $\Delta 2$  se refiere, nos demuestran que a la mitad de la pubertad los individuos presentan una reserva hipofisiaria menor, en términos absolutos, que en los estadios más avanzados. Un hallazgo significativo lo constituye el hecho de que la  $\Delta 2$  fue mayor en los estadios 2,3,4 ó 5 que la  $\Delta 1$ , fenómeno que no se observó en los individuos en estadio 1 de Tanner. Esta diferencia demuestra que los sujetos que ya iniciaron la pubertad poseen una mayor reserva hipofisiaria en relación con la sensibilidad, que aquellos individuos prepuberales, lo que nos puede indicar la existencia de un mecanismo más de maduración hipotálamo-hipofisiario.

Asimismo, los hallazgos de las diferencias encontradas en las primeras cuatro áreas bajo la curva, al hacer la comparación entre los individuos en estadio 1 de Tanner y aquellos en estadio 4 no tienen una explicación clara y posiblemente pueda atribuirse al reducido número de la muestra. La diferencia entre las áreas 2 y la 4 al compararse con el área 1 en todos los estadios de Tanner, demuestra que ambos estímulos liberaron cantidades significativas tanto de la poza metabólica de sensibilidad como de la poza metabólica de reserva existentes; está último confirma reportes previos (81). Un hallazgo que merece mayor comentario es aquel en el que se demostró que en los individuos en estadio 1, 2 ó 3 de Tanner, el área bajo la curva de las primeras 2 horas después del estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH fue significativamente mayor que el área bajo la curva de las primeras 2 horas después del estímulo con 10  $\mu\text{g}$  de GnRH. Este hecho, no se encontró en aquellos individuos que

se encontraban al final de la pubertad (estadio 4 ó 5 de Tanner), ya que en éstos los estímulos tanto con 10 como con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH indujeron una secreción similar de FSH total. Este resultado nos indica que en los estadios tempranos de la pubertad, la reserva hipofisiaria es mucho mayor en términos absolutos que la sensibilidad, mientras que posiblemente por la maduración del eje hipotálamo-hipófisis, cuando los individuos se encuentran en estadios avanzados de la pubertad, la cantidad de FSH lista para ser liberada es similar a aquella que se puede sintetizar "de novo". Este hallazgo demuestra que la equiparación de las pozas metabólicas de sensibilidad y reserva pudiese representar un mecanismo más que se presenta en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis.

En este estudio, pudimos demostrar que existen cambios importantes tanto en la sensibilidad como en la reserva hipofisiarias a lo largo de la pubertad. Estos, pudiesen ser debidos a los cambios existentes en las concentraciones de testosterona a lo largo de esta etapa de la vida, los cuales se ha visto que modulan a la hipófisis en cuanto a su capacidad de respuesta al estímulo único con GnRH (82,83).

Con el fin de esclarecer la falta de información y contradicciones existentes en relación con la actividad biológica de la FSH a lo largo del proceso puberal, se procedió a determinar la actividad biológica de la hormona bajo las condiciones experimentales antes señaladas. Hasta ahora, no se ha podido determinar con precisión cómo se encuentra la actividad biológica de las gonadotropinas a lo largo del proceso puberal en el humano.

En la actualidad, solamente existen publicados 3 estudios (66-68) que han pretendido delimitar las diferencias existentes en la actividad biológica de las gonadotropinas a lo largo de esta etapa de la vida. Sin embargo, en estos trabajos solamente se cuantificó una muestra única de manera basal en los individuos estudiados, lo cual, debido a la variación fisiológica de las gonadotropinas tanto por su vida media como por su pulsatilidad hace que los resultados obtenidos pudiesen no ser por demás exactos. De hecho, dos de los estudios, los cuales pertenecen al mismo grupo de trabajo (66,67), demuestran resultados contradictorios. En el estudio publicado por Beitins y cols en 1990. (66) se demostró que la actividad biológica de la FSH se incrementaba en el estadio 2 en relación con el estadio 1 y en el 4 en relación con el 3; sin embargo, en el estudio de Kletter y cols. 1993 (67) se demostró que la bioactividad disminuía en el estadio 2 en relación con el 1, así como al comparar los resultados obtenidos en los individuos en estadio 3 en relación con aquellos estudiados en estadio 4 de Tanner. Por último, el estudio practicado por Kasa-Vubu y cols. en 1993 (68), en el cual también se tomó una muestra única de sangre, indicó que existe un incremento en las concentraciones de FSH tanto inmunoactiva como bioactiva en los primeros estadios de pubertad (1, 2 y 3) encontrándose una meseta después del estadio 3. Estos hallazgos también son cuestionables por las razones metodológicas antes expuestas.

Nuestros resultados demostraron que la actividad inmunológica, analizada por medio del ensayo inmunofluorométrico, aumentó conforme los individuos se encontraban en un mayor estadio

de Tanner. Sin embargo, la actividad biológica, no difirió ya que la relación B/I no cambio al hacer las comparaciones entre los diversos estadios de Tanner entre sí, en ninguna de las diversas condiciones experimentales estudiadas. Esto nos indica que la secreción de la gonadotropina se incrementa sólo en cantidad, sin embargo la calidad de la hormona no se modifica a lo largo de la pubertad, ésto es independiente de si se realizan las determinaciones de manera basal o al cuantificar la sensibilidad o la reserva hipofisiaria, ya que no existieron diferencias significativas al llevar a cabo las comparaciones entre los diversos estadios de Tanner en ninguno de los 5 CDFs constituidos. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar las concentraciones de cada uno de los 5 CDFs entre sí, en los estadios 1, 2, 4 ó 5 de Tanner. Las diferencias encontradas en los individuos en estadio 3 de Tanner no pueden ser explicadas claramente y posiblemente sean debidas al reducido tamaño de la muestra.

### CONCLUSIONES

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada de los varones, presenta una mayor secreción de FSH en los dos últimos estadios puberales, lo que demuestra el proceso de maduración de este eje.

La FSH se libera en mayor cantidad conforme avanza la pubertad en el varón normal.

La actividad biológica (relación B/I) de FSH no se modifica a lo largo del proceso puberal.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Van Vliet G. Clinical aspects of normal pubertal development. *Horm Res* 1991, 36:93-99
2. Wheeler MD. Physical changes of puberty. *Endocrinol Metab Clin North America* 1991, 20:1-14
3. Parra A, Ramos-Galván C. La influencia de la deprivación psicosocial y la composición corporal sobre las gonadotropinas plasmáticas en niños y adolescentes. *Gaceta Médica de México* 1992, 128:7-13
4. Ulloa-Aguirre A, Díaz-Cueto L, Méndez JP. La pubertad. *Antología de la sexualidad humana II*. Pérez Fernández C y Rubio Aurióles E, (Eds). Miguel Angel Porrúa. México D.F. 1994, II:515-540
5. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969, 44:291
6. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970, 45:13-23
7. Marshall WA, Tanner JM. Puberty. En Flakner F, Tanner JM (eds). *Human Growth*. New York:Plenum Press. 1986 117-209.
8. Burr IM, Sizonenko PC, Kaplan SL. Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone with stages of puberty, testicular size and bone age in normal boys. *Pediatrics research* 1970, 4:25-35
9. Retter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 1982, 44:595-607

10. Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenic perspective. En: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML, (Eds). Control of the onset of puberty. 1990:1-68. Baltimore. Williams and Wilkins.
11. Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. Endocrinology 1949, 44:234-241
12. Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. Soc Exp Biol Med Proc 1960, 104:432-434
13. Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, et al. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed amino acid sequence. Biochem Biophys Res Commun 1971, 43:393-405
14. Schally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. Biochem Biophys Res Commun 1971, 43:1334-1340
15. Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. In: Martin L, Ganong WF, (Eds). Frontiers in Neuroendocrinology. Raven Press 1988, 239-278
16. Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). Endocrinology 1978, 102:1325-1338
17. Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. Endocr Rev 1982 3:91-119

18. Ulloa Aguirre A, Méndez JP, González A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 1988, 29:17-27
19. García-Rubí E, Vázquez-Alemán D, Méndez JP, et al. The effects of opioid blockade and GnRH administration upon luteinizing hormone secretion in patients with anorexia nervosa during the stages of weight loss and weight recovery. *Clin Endocrinol* 1992, 37:520-527
20. Shivers BD, Harlan RD, Morrell JI. Absence of oestradiol in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 1983, 304:345-347
21. Catt KJ, Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1989, 1:15-19
22. Conn MP, Janovick JA, Stanislaus D. et al. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vit Hor* 1995, 50:151-214
23. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981, 2:186-202
24. Conn PM. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: De Groot LJ, Besser GM, Cahill GF Jr, et al., (Eds). *Endocrinology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1989:284-295.
25. Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The receptor. *Endocr Rev* 1988, 9:379-385

26. Laws SC, Webster JC, Miller WL. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology* 1990, 127:381-386
27. Laws SC, Beggs MJ, Webster JC et al. Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* 1990, 127:373-380
28. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endo Rev* 1983, 4:179-211
29. Ulloa-Aguirre A, Midgley R, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endo Rev* 1995, 16:1-22
30. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, et al. Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61:926-932
31. Veldhuis JD: Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En Yen SSC, Jaffe RB (Eds): *Reproductive Endocrinology*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders, 1991, p 409-459
32. Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 1988, 254:E658-E666

33. Lalloz MRA, Detta A, Clayton RN. Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibit expression of the luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene "in vivo". *Endocrinology* 1988, 122:1689-1694
34. Conn PM and Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 1991, 324:93-103
35. Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 1982, 257:13306-13311
36. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 1991, 47:155-168
37. Kow LM, Pfaff D. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Res* 1984, 297:275-285
38. Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V, et al. Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in humans. *J Androl* 1991, 12:27-35
39. Mason AJ, Berkemeir LM, Schmelzer CH, et al. Activin B: precursor sequence, genomic structure and "in vitro" activities. *Mol Endocrinol* 1989, 3:1352-1358
40. Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzma G. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 1993, 132:431-443

41. Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1994, 100:81-85
42. Quigley ME, Rakoff JS, Yen SS. Increased luteinizing hormone sensitivity in dopamine inhibition of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52:231-233
43. Marshall JC, Delch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Eng J Med* 1986, 315:1459-1486
44. Lacy PE, Klein JN, Fink JC. Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology* 1973, 92:1458-1468
45. Leong DA, Thorner MO, Lau SK, et al. A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem* 1991, 266:9016-9022
46. Bremner WJ, Paulsen CA. Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: Evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 39:811-815
47. Beitins IZ, Dufau ML, O'Loughlin K, et al. Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone releasing (LHRH) in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977, 45:605-608

48. Rebar R, Yen SSC, Vandenberg G, et al. Gonadotropin responses to synthetic LRF: dose-response relationship in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1973, 36:10-16
49. Wang CF, Lasley BL, Yen SSC. Gonadotropin secretion in response to low and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (Functional disparity of the gonadotrophs). *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42:427-431
50. Means AR, Dodman JR, Tash JS, et al. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle-stimulating hormone. *Ann Rev Physiol* 1980, 42:59-63
51. Reichert LE, Dattatreymurty B. The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction and properties of the purified receptor *Biol of Reprod* 1989, 40:13-26
52. Means AR, Fakunding JL, Huckins C, et al. Follicle-stimulating hormone the sertoli cell, and spermatogenesis *Recent Prog Horm Res* 1976, 32:477-527
53. Kelton CA, Cheng SU, Nugent NP, et al. The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992, 89:141-151
54. Dattatreymurty B, Reicher LE. A syntetic peptide corresponding to amino-acid 9-30 of the extracelular domains of the follitropine (FSH) receptor specifically binds FSH. *Mol Cell Endocrinol* 1992, 87:9-17

55. Braun T, Schofield PR, Sprengel R. Amino terminal leucine-rich repeat in gonadotropin receptor determine hormone selectivity. *EMBO J* 1991, 10:1885-1890
56. Zambrano E, Barrios J, Cárdenas M, et al. Studies on the relative "in vitro" biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:563-571
57. Steelman SL, Pohley FM. Assay of follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1953, 53:604-611
58. Beers WH, Strickland S. A cell culture assay for follicle stimulating hormone. *J Biol Chem* 1978, 253:3877-3881
59. Van Damme MP, Robertson DM, Marana R, et al. A sensitive and specific "in vitro" bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinol* 1979, 91:224-237
60. Jia XC, Kessel B, Yen SSC. Serum bioactive follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle and in hyper- and hypogonadotropic states: application of a sensitive granulosa cell aromatase bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 62:1243-1249
61. Padmanabhan V, Chappel SC, Beitins IZ. An improved in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH): suitable for measurement of FSH in unextracted human serum. *Endocrinology* 1987, 121:1089-1098

62. Tilly JL, Aihara T, Nishimori K. Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 1992, 131:799-806
63. Albanese C, Christin-Maitre S, Sluss PM, Cowley Jr WF, Jameson JL. Development of a bioassay for FSH using the recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Mol Cell Endocrinol* 1994, 101:211-219
64. Padmanabhan V, Miehler D, Borondy M, et al. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 1992, 131:213-219
65. Jaakkola T, Ding YQ, Kellokumpu-Lehtinen, et al. The ratios of serum bioactive/immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in various clinical conditions with increased and decreased gonadotropin secretion: reevaluation by a highly sensitive immunometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70:1496-1505
66. Beitins IZ, Padmanabhan V, Kasa-Vubu J, et al. Serum bioactive follicle-stimulating hormone concentrations from prepuberty to adulthood: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 71:1022-1027

67. Kletter GB, Padmanabhan V, Brown MB, et al. Serum bioactive gonadotropins during male puberty: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76:432-437
68. Kasa-Vubu JZ, Padmanabhan V, Kletter GB, et al. Serum bioactive luteinizing and follicle-stimulating hormone concentrations in girls increase during puberty. *Pediatr Res* 1993 34:829-833
69. Lövgren T, Hemmilä I, Pettersoon K, et al. Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay. *Talanta* 1984, 31:909-916
70. Hemmilä I, Dakubu S, Mukkala VM, et al. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Annal Biochem* 1984, 137:335-343
71. Lee DW, Shelden RM, and Reicher LE, Identification of low and high molecular-weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitors in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990, 53:830-835
72. Sluss PM, and Schneyer AL. Low molecular weight follicle-stimulating hormone receptor binding inhibitor in sera from premature ovarian failure patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 74:1242-1246
73. Gudermann T, Brockmann H, Simoni M, et al. "In vitro" Bioassay for human serum follicle-stimulating hormone (FSH) based on L cells transfected with recombinant rat FSH receptor: validation of a model sistem. *Endocrinology* 1994, 135:2204-2213

74. Stuner A, Kipnis C, Utiger D, et al. Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3'5' cyclic phosphate. Proc National Academy of Science 1969, 64:367-371
75. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation to <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J 1963, 89:114-123
76. Bridges NA, Hindmarsh PC, Matthews DR, et al. The effect of changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency on puberty. J Clin Endocrinol Metab 1994, 79:841-847
77. Bousfield GR, Perry WM, Ward DN: Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. En: Knobil E, Neill JD (Eds): The physiology of reproduction, ed 2. New York, Raven Press Ltd, 1994 pp 1749-1792
78. Oerter KE, Uriarte MM, Rose SR, et al. Gonadotropin secretory dynamics during puberty in normal girls and boys. J Clin Endocrinol Metab 1990, 71:1251-1258
79. Catt KJ, Dufau ML: Gonadotropic hormones: biosynthesis, secretion, receptors, and actions. en Yen SSC, Jaffe RB (Eds): Reproductive endocrinology, ed 3. Philadelphia, WB Saunders, 1991, pp 105-151
80. Manasco PK, Umbach DM, Muly SM, et al. Ontogeny of gonadotropin, testosterone, and inhibin secretion in normal boys through puberty based on overnight serial sampling. J Clin Endocrinol Metab 1995, 80:2046-2052

81. Wang CF, Lasley BL, Lein A, et al. The functional changes of the pituitary gonadotrophs during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42:718-728
82. Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Lannering B, et al. Twenty four hour profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and estradiol levels: A semilongitudinal study throughout puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:541
83. Hassing JM, Padmanabhan, Kelch RP, et al. Differential regulation of serum immunoreactive luteinizing hormone and bioactive follicle-stimulating hormone by testosterone in early pubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70:1082-1089