

00381 43
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

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

**ESTUDIO *in vitro* DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA
DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA
ESTIMULANTE DEL FOLICULO HUMANA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :
M. EN C. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR ALFREDO ANTONIO ULLOA AGUIRRE.

25.9.64

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F. ,

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

Fue para mí una distinción haber realizado la presente tesis en el Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, bajo la asesoría del Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, así como el haber recibido una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y apoyo financiero del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP)

AGRADECIMIENTOS

En este año 1998 se conmemora el centenario del nacimiento de Don Salvador Zubirán, 100 años en los que se han formado las raíces y el tronco de lo que hoy es nuestro Instituto. Agradezco al Maestro Zubirán por ser base, raíz y savia, y con él a una de sus importantes ramas, el Departamento de Biología de la Reproducción, del cual se desprende este trabajo que hoy entrego. Gracias al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre por su asesoría, enseñanza y los retos impuestos con el único interés de que nuestro trabajo contribuya al Conocimiento. Agradezco también al Dr. Fernando Larrea por su consejo y apoyo.

Termino hoy con un periodo producto del trabajo de equipo de un sinnúmero de personas, especialmente quiero agradecer la colaboración brindada por la Bióloga Teresa Zariñán y al M. en C. Angel Trujillo por toda la ayuda dada y por ser estímulo y ejemplo en todo momento.

Fragmento de "Diálogos con los hombres honrados"

Un milagro: alcanzar no lo que habías pedido,
sino lo que te dan,
porque hay entre el tiempo de pedir y el de dar,
un tiempo verdadero: el de cambiar...

ROSARIO CASTELLANOS

INDICE

Páginas

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 3 |
| SUMMARY | 4 |
| INTRODUCCION | 5 |
| ANTECEDENTES | 7 |
| GENERALIDADES SOBRE LA FSH | 7 |
| Funciones de la FSH | 8 |
| MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH | 10 |
| Actividad biológica | 12 |
| Métodos de estudio de la microheterogeneidad de la FSH | 14 |
| Distribución de las isoformas de FSH | 15 |
| Regulación endócrina | 16 |
| RECEPTOR DE FSH | 19 |
| Isoformas de FSH y su receptor | 23 |
| OBJETIVO GENERAL | 26 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS | 26 |
| HIPOTESIS | 27 |
| MATERIAL Y METODOS | 28 |
| Extractos hipofisarios | 28 |
| Separación de las isoformas de hFSH de los extractos hipofisarios por cromatoenfoco | 28 |
| Inmunoensayos de la hFSH | 29 |
| - RIA de hFSH | 29 |
| - ELISA de hFSH | 30 |
| - IRMA de hFSH | 30 |
| Ensayos <i>in vitro</i> | 32 |
| - Bioensayo de aromatización en células de la granulosa (GAB) | 32 |
| - Producción de AMPc en células humanas renales fetales (293) transfectadas con el receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR). | 33 |
| Ensayos de unión al receptor | 35 |

| | |
|---|-----------|
| Radiomarcage de hFSH por el método de la Cloramina T. | 36 |
| Radiomarcage de hFSH por el método de la lactoperoxidasa. | 37 |
| Radiomarcage de AMPc por el método de la Cloramina T | 37 |
| Determinación de la producción de IP | 38 |
| Análisis estadístico | 39 |
| RESULTADOS | 40 |
| Aislamiento por CF de las isoformas de hFSH hipofisarias. | 40 |
| Cuantificación inmunorreactiva de los concentrados hipofisarios de las isoformas de hFSH. | 42 |
| Bioensayos <i>in vitro</i> | 42 |
| - GAB | 42 |
| - Bioensayo en las células 293-hFSHR | 46 |
| Razón Bioactividad/Inmunorreactividad | 48 |
| Ensayos de unión al receptor | 51 |
| DISCUSION | 58 |
| CONCLUSIONES | 64 |
| REFERENCIAS | 65 |
| PUBLICACIONES ORIGINALES | 78 |

RESUMEN

La hormona estimulante del folículo (FSH) de diversas especies de animales, incluyendo al humano, es producida y secretada en múltiples formas moleculares. Las variantes o isoformas de la FSH difieren entre sí en su abundancia relativa y en sus propiedades biológicas. En el presente estudio se analizó y comparó la actividad biológica *in vitro* de diversas isoformas hipofisarias de FSH humana (hFSH), utilizando para ello 2 diferentes bioensayos. La obtención de las isoformas hipofisarias de hFSH se realizó por el método del cromatoenfoco (rango de pH de 7.40 a <3.80); las isoformas aisladas fueron analizadas a múltiples dosis por 3 inmunoensayos de alta especificidad: radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y ensayo inmunorradiométrico (IRMA); asimismo, se emplearon 2 diferentes bioensayos *in vitro*, el primero de ellos cuantificó la cantidad de estrógenos producidos por células de la granulosa de rata en cultivo, en tanto que el segundo determinó la cantidad de AMPc producido por una línea celular de riñón fetal humano (células 293) que expresa al receptor recombinante de la hFSH (293-hFSHR). Además se realizaron ensayos de radiorreceptor con las células de la granulosa de rata, membranas de testículo de rata y con las células 293-hFSHR. La potencia biológica relativa *in vitro* de cada isoforma de hFSH expresada como la razón bioactividad/inmunorreactividad (B/I) para cada uno de los inmunoensayos (B/RIA, B/ELISA y B/IRMA) fue distinta entre las diferentes isoformas: sin embargo, independientemente del bioensayo o inmunoensayo empleado, las isoformas menos ácidas presentaron mayor actividad biológica *in vitro* con respecto a las más ácidas. En cuanto a los ensayos de radiorreceptor, en los sistemas en que se utilizaron células de la granulosa de rata y membranas de testículo de rata, las isoformas menos ácidas presentaron una mayor relación radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) que las formas más ácidas; en contraste, en las células 293-hFSHR no se obtuvo una correlación entre el pH de elución de la isoformas y la razón RRA/I. La disociación entre la actividad de unión al receptor y la respuesta en términos de AMPc, sugiere que en algunos sistemas, como en las líneas celulares en donde sólo se expresa una variante de receptor, las glicofomas de hFSH pueden diferir unas de las otras en su capacidad de inducir cambios en la conformación del receptor y activar vías de señales de transducción particulares. El hallazgo de diferencias significativas en la potencia biológica relativa *in vitro* entre las diversas isoformas intrahipofisarias de FSH, sugiere fuertemente que la producción y secreción de moléculas más básicas o ácidas durante algunas condiciones fisiológicas (como la pubertad o durante el ciclo menstrual), puede representar un mecanismo adicional a través del cual la hipófisis anterior regula la función gonadal.

SUMMARY

Pituitary gonatotropins of several animal species, including man, are produced and secreted in multiple molecular forms. It has been shown that the charge variant of FSH differ from each other in their relative abundance and biological properties. In the present study, the relative *in vitro* biological activity of the various intrapituitary human follicle stimulin hormone (FSH) isoforms was analysed and compared employing two different bioassay systems. FSH was fractionated by chromatofocusing (pH range 7.10 to <3.80) and the several isoforms isolated were quantitated at multiple dose levels by three highly specific immunoassay systems: radioimmunoassay (RIA), enzyme-immunoassay (ELISA) and immunoradiometric assay (IRMA), as well as by two *in vitro* bioassays, one that measures the amount of oestrogen produced by rat granulosa cells in culture and the other that determines the amount of cAMP produced by a human kidney fetal cell line (293) expressing the recombinant human FSH receptor (293-hFSHR). The corresponding receptor binding activities were determined employing rat granulosa cells, partially purified cell membranes obtained from testes of rats and 293-hFSHR. The relative *in vitro* biological activity of each FSH isoform, expressed as the bioassay/immunoassay (B/I) activity ratio (B/RIA, B/ELISA and B/IRMA ratios) varied with its elution pH values. Regardless of the immunoassay or bioassay method employed, less acidic FSH isoforms exhibited higher B/I ratios than their more acidic counterparts. In the rat granulosa cell assay system and in the rat cell membranes from testes, the less acidic isoforms exhibited higher radioreceptorassay/immunoassay (RRA/I) ratios than the more acidic isoforms; in contrast, the RRA/I ratios of the isoforms as determined in the 293-hFSHR cells did not correlate with their elution pH value. The dissociation between the receptor binding activity and the cAMP responses suggest that in some systems, such as in a cell line expressing a unique receptor variant, hFSH isoforms might differ from each other in their ability to change receptor conformation and induce activation of particular signal transduction pathways. The finding of significant differences in relative *in vitro* biological potency among the various intrapituitary FSH isoforms, strongly suggests that the shifts toward the production and secretion of more basic or acidic FSH molecules occurring in certain specific physiological conditions (e.g. puberty and menstrual cycle), may represent an important mechanism through which the anterior pituitary regulate gonadal function.

INTRODUCCION

La reproducción de los mamíferos, incluyendo la del humano, abarca múltiples eventos en el que participan varios sistemas biológicos del organismo, entre ellos el sistema neuroendócrino. Las glándulas endócrinas involucradas directamente en este proceso son la hipófisis y las gónadas. La hipófisis, debido a su interrelación con el sistema nervioso central, regula el funcionamiento de la gónada y sincroniza los eventos del proceso reproductivo en respuesta a señales del medio externo e interno. El hipotálamo, a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), controla la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias gonadotrópicas: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH); éstas a su vez regulan directamente el funcionamiento de las gónadas, las cuales tienen la doble función de formar y madurar los gametos así como de sintetizar las hormonas esteroides sexuales necesarias para preparar el aparato reproductor tanto en el apareamiento como en la fertilización, nidación, crecimiento y nutrición adecuada de la progenie.

Esta tesis está enfocada al estudio de la FSH, gonadotropina hipofisaria de naturaleza proteínica compuesta por dos subunidades glicosiladas, la subunidad α y la β . Dentro de sus funciones principales se encuentran la regulación de los procesos de gametogénesis, esteroidogénesis y ovulación.

La FSH no es una molécula de estructura única, sino que se sintetiza y secreta en múltiples formas moleculares, similares entre sí, pero distintas en la composición de carbohidratos₍₁₎. La "microheterogeneidad" de la FSH está dada por la diferencia estructural de la hormona; bioquímicamente cada una de las formas constituye una isohormona, con propiedades fisicoquímicas y biológicas particulares como carga eléctrica, vida media plasmática, unión al receptor y potencia biológica. Las isoformas de la FSH, han sido detectadas y caracterizadas en diversos compartimentos orgánicos, como la hipófisis anterior, el suero y la orina de diferentes especies de animales, incluyendo al humano. La composición y la distribución relativa de estas isoformas depende de variables como la técnica utilizada en su separación, el tejido de extracción, la especie de la que se trate y el estado fisiológico del donador en el momento de la obtención de la muestra.

Todavía no es clara la importancia fisiológica de la existencia de la microheterogeneidad de la FSH; la biopotencia neta de las diferentes isoformas en

condiciones *in vivo* depende de la interacción de múltiples factores como son la afinidad por el receptor, la señal de transducción inducida y la vida media circulante de la isohormona. Muchos estudios han analizado la actividad biológica *in vitro* de las isoformas humanas de la FSH, sin embargo los resultados obtenidos han sido diferentes; mientras que algunos de ellos han encontrado que la biopotencia *in vitro* es menor en las isoformas más ácidas con respecto a las menos ácidas₍₂₋₆₎, otros estudios han demostrado que no hay diferencias entre las isoformas en términos de unión al receptor y/o inducción de una respuesta biológica en la célula blanco₍₇₋₉₎. Las discrepancias entre los hallazgos encontrados se han atribuido al uso de diferentes métodos para analizar su unión al receptor, así como de bioensayos e inmunoensayos, cada uno con distinta especificidad y sensibilidad. Estas discrepancias se han atribuido también al uso de estándares que tienen composición molecular variable y al empleo de anticuerpos con diferente especificidad por el o los epítopes de la molécula.

Es claro que existe una multiplicidad molecular de la FSH y que la calidad del estímulo gonadotrópico, determinado por la capacidad de cada isohormona de inducir una respuesta biológica, podría estar relacionado estrechamente con la estructura molecular de la hormona. Asimismo, dado el papel determinante de los carbohidratos en la expresión del efecto biológico de la FSH, existe la posibilidad de que los cambios en la distribución relativa de las isohormonas que ocurren en ciertas condiciones fisiológicas, puedan alterar significativamente el efecto neto de la mezcla de isohormonas circulantes₍₁₀₋₁₃₎. Es por lo tanto factible que las diferentes isoformas tengan diversas funciones y que esto represente un mecanismo regulador a través del cual la hipófisis anterior controla la función gonadal.

El definir con mayor precisión la bioactividad de las isoformas o variantes moleculares de la FSH, es crítico para poder esclarecer la importancia y el significado funcional de la existencia de la microheterogeneidad de esta hormona. Por tanto el objetivo de la presente tesis fue estudiar en mayor detalle la actividad biológica *in vitro* de las isoformas hipofisarias de la FSH humana, empleando para ello sistemas de bioensayo y de radioreceptor homólogos y heterólogos y analizando a la hFSH por distintos inmunoensayos de alta afinidad.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES SOBRE LA FSH

En los mamíferos la hipófisis anterior sintetiza y secreta hormonas glicoprotéicas bajo la regulación y el control del hipotálamo. Estas hormonas son la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y las 2 gonadotropinas hipofisarias: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La TSH es la principal reguladora de la actividad de la glándula tiroidea ⁽¹⁴⁾, mientras que la FSH y la LH tienen una función importante en la reproducción de los mamíferos ^(15,16). Además durante la gestación de los primates y de los equinos, se sintetiza en la placenta otra gonadotropina indispensable para el mantenimiento del embarazo llamada hormona gonadotropina coriónica (CG) ⁽¹⁷⁾.

Las gonadotropinas LH, FSH, CG junto a la TSH constituyen una familia conocida como hormonas glicoprotéicas. Estructuralmente estas hormonas son complejas, tienen un peso molecular (PM) entre 28 y 38 KDa y están formadas por dos subunidades de cadenas polipeptídicas (la α y la β) unidas de manera no covalente ⁽¹⁸⁾. Ambas cadenas son sometidas a modificaciones post-traduccionales mediante la adición de oligosacáridos, ligados en posición N- a residuos de asparagina (Asn) para la LH, FSH, TSH y CG y en unión O- a residuos de serina (Ser) para la CG, con diferentes grados de sulfatación y sialidación ⁽¹⁹⁾. Mientras que la subunidad α es idéntica en las 4 glicoproteínas y es codificada por un solo gen ⁽²⁰⁾, la cadena β proviene de genes diferentes ⁽²¹⁾ y es la que confiere la especificidad tanto biológica como inmunológica de la hormona. La subunidad α humana está compuesta de 92 residuos de amino ácidos (aa) con una homología entre las diferentes especies del 80-85%. Las subunidades β varían en el tamaño; la FSH, LH, CG y TSH humanas tienen 111, 114, 145 y 112 residuos de aa respectivamente. Aunque las subunidades β tienen entre sí diferencias importantes en especificidad y en composición de aa, es posible encontrar algunas regiones con alta homología ^(18,22,23), las cuales probablemente estén involucradas en la interacción de cada una de ellas con la subunidad α común. La cadena α tiene 10 residuos de cisteínas y la β 12, las cuales forman puentes disulfuros cruzados, lo que contribuye a la estabilización de la estructura tridimensional de la

proteína. Estas regiones de cisteínas están muy conservadas entre las diferentes subunidades β y entre las distintas especies, lo que sugiere una estructura tridimensional similar entre las hormonas.

La asociación entre la subunidad α y la β es indispensable para la expresión de la actividad biológica de las hormonas glicoprotéicas, ya que cuando se encuentran separadas no presentan ninguna actividad biológica detectable^(18,22,23).

Funciones de la FSH

De manera general la función primaria de la FSH es la regulación del crecimiento y maduración folicular en las hembras y la espermatogénesis en los machos.

- Funciones en el ovario

En la hembra la FSH está involucrada en varios procesos como la maduración folicular, la prevención de la atresia folicular, la aromatización de los andrógenos, la producción de inhibina y activina (hormonas ambas de estructura peptídica que suprimen o estimulan, respectivamente, la secreción de la FSH), la proliferación de las células de la granulosa y la inducción de la síntesis de receptores de la LH entre otros⁽²⁴⁻²⁶⁾.

La principal acción de la FSH es promover la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, lo cual conlleva al desarrollo del folículo ovárico y la síntesis de estrógenos; asimismo, incrementa la producción y acumulación del líquido folicular y aumenta el número de receptores de LH⁽²⁷⁾. La LH potencia el efecto de la FSH en la promoción del desarrollo de los folículos, particularmente durante sus estadios finales. La FSH induce la expresión del gen que codifica para la enzima P450_{AROM}, lo cual da como resultado la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca interna bajo el estímulo de la LH, por lo que conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos. Ambos, la FSH y el estradiol, ejercen una acción mitogénica estimulando aún más la proliferación de las células de la granulosa y promoviendo el incremento del número de receptores de FSH por unidad celular⁽²⁷⁾. Es necesaria la presencia de estradiol y de FSH para el crecimiento folicular, así como para la maduración del ovocito. En el humano, únicamente un folículo llegará a ser preovulatorio, en tanto que los demás sufrirán un proceso que se conoce como atresia^(16,27). Mientras que el estradiol ejerce una

influencia estimuladora en la acción de la FSH dentro del folículo maduro, tiene un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisiario, lo que ocasiona una disminución de las gonadotropinas y por consiguiente el retiro del soporte gonadotrópico a los folículos menos desarrollados. Sin embargo, el folículo dominante permanece dependiente de la FSH y debe completar su desarrollo antes de que ocurra la ovulación. Para ello, cuenta con un mayor contenido de receptores de FSH, lo que le permite mantener la síntesis de estrógenos. En esta etapa, la FSH induce el desarrollo de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo antral. A la mitad del ciclo, durante la fase folicular tardía, ocurre un aumento agudo de la secreción de LH y de FSH, esencial para completar la maduración del ovocito e inducir la ruptura del folículo y la ovulación_(16,27,28). Posteriormente, las células de la granulosa y de la teca se diferencian en células luteínicas, las cuales constituirán el cuerpo lúteo o amarillo. Durante esta fase, llamada fase lútea, las concentraciones de gonadotropinas disminuyen debido a la retroalimentación negativa que ejercen tanto el estradiol como la progesterona a nivel de la unidad hipotálamo-hipofisaria. De no ocurrir la fertilización del óvulo se presenta la luteólisis unos días después, con la subsecuente disminución de la síntesis de estrógenos, progesterona e inhibina, el aumento en la secreción hipofisaria de la FSH y la reanudación de un nuevo ciclo.

- Funciones en el testículo

En los testículos se lleva a cabo la síntesis de andrógenos y la producción de gametos (espermatozoides). Estructuralmente ambas funciones se realizan de manera separada en dos compartimentos, el intersticial que contiene las células de Leydig ó intersticiales y el tubular que contiene dos tipos celulares diferentes, las células de Sertoli y las células germinales en diferentes estadios de maduración. Las células de Leydig llevan a cabo la biosíntesis de andrógenos, principalmente testosterona, bajo la acción de la LH₍₂₉₎. En los túbulos seminíferos las células de Sertoli actúan como células "nutrientes" que aportan una gran variedad de factores necesarios para la adecuada maduración de los gametos₍₂₉₎. También regulan el movimiento de las células germinales en los túbulos seminíferos y la liberación de los espermatozoides maduros. La FSH actúa principalmente en la maduración de los túbulos seminíferos y en la iniciación y control de la espermatogénesis; ejerce sus funciones gonadotrópicas a través de las células de Sertoli, las cuales al ser estimuladas producen compuestos necesarios para la maduración espermática₍₂₇₎. La FSH es necesaria para iniciar la espermatogénesis, sin embargo, para la maduración total de los espermatozoides se

requiere no sólo del efecto de la FSH, sino también el de la testosterona. Al unirse la FSH a los receptores específicos de las células de Sertoli, estimula la producción de la proteína fijadora de andrógenos; de hecho, una de las principales acciones de la FSH en la espermatogénesis es a través de la estimulación de la producción de la proteína fijadora de andrógenos, que se une a la testosterona y provee una reserva alta de andrógenos intratubular, útil y necesaria para el desarrollo de las células germinales⁽²⁷⁾.

También en testículo se sintetizan dos tipos de inhibina, A y B; ambas inhiben de modo selectivo la liberación de la FSH a partir de la hipófisis, sin afectar la liberación de la LH. La FSH estimula de manera directa a las células de Sertoli para secretar inhibina. La inhibina, junto con los esteroides gonadales, actúa como un regulador fisiológico de la secreción hipofisiaria de la FSH⁽³⁰⁻³²⁾.

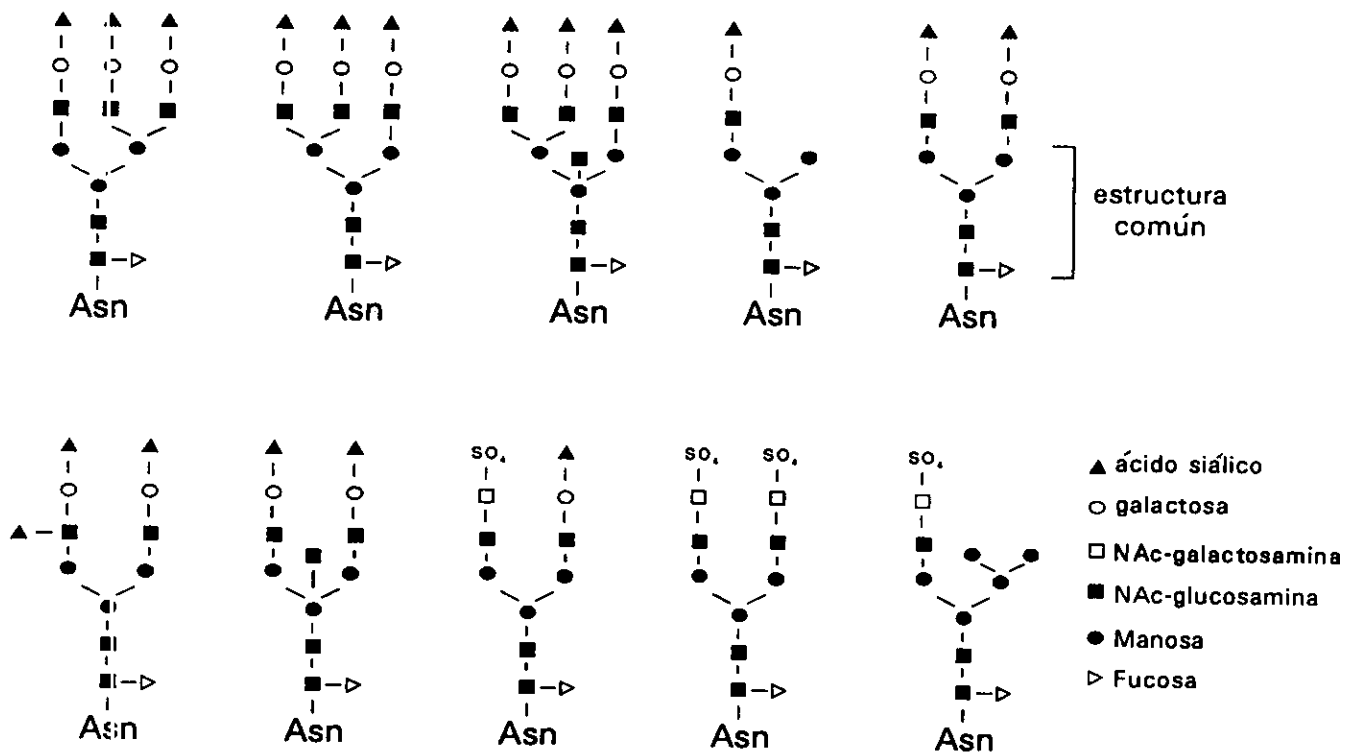
MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH

La FSH existe en múltiples formas moleculares, debido a la diversidad de oligosacáridos que tiene unidos a la proteína base, los cuales juegan un papel determinante en la definición de las características fisicoquímicas y las propiedades biológicas de la hormona^(2,33-39). La FSH está formada por dos subunidades glicosiladas (α y β); la subunidad α tiene entre 92 a 96 residuos de aa con dos sitios para N-glicosilación localizados en la posición Asn 52 (ó 56) y Asn 78 (ó 82), mientras que la subunidad β está compuesta por 111-112 aa e incluye 2 sitios de N-glicosilación en la Asn 6,7 ó 13 y Asn 23, 24 ó 30⁽⁴⁰⁻⁴⁶⁾.

La glicosilación se inicia en el retículo endoplásmico rugoso y continúa a través del Aparato de Golgi, una vez que la hormona madura es transportada a gránulos secretorios⁽³³⁾. La estructura de los carbohidratos en la FSH es altamente variable, la mayoría de sus cadenas oligosacáridicas son estructuras bifurcadas, con grupos cargados negativamente en las terminaciones de ambas ramas (GalNAcSO₄ o Gal-ácido siálico), o bien, con una rama que termina con un residuo cargado negativamente y la otra en un carbohidrato neutro como la manosa^(33,34,47). También existen en menor proporción diferentes grupos terminales así como otros tipos de ramificaciones tales como estructuras tri- y tetrantenarias. Además hay una variabilidad en la distribución de estos carbohidratos dependiendo de la especie de la

que se trate, por ejemplo, la FSH de hipófisis humana tiene oligosacáridos precominamente sializados (83%), mientras que la FSH ovina contiene sólo el 28% de éstos⁽⁴⁷⁾; el porcentaje de estructuras de oligosacáridos neutros es mucho mayor en la FSH bovina y ovina (32% del total) que en la FSH humana (10%)^(33,47).

Figura 1. Principales estructuras de los oligosacáridos unidos a la FSH⁽⁴⁸⁾.



Las variaciones en la estructura y distribución de los carbohidratos internos y terminales, así como de la concentración de ácido siálico y de grupos sulfatos, constituye la principal base química de las diferencias de las isoformas de FSH, particularmente de la extensa heterogeneidad por carga que muestra esta gonadotropina hipofisiaria^(4,48-51). Las isoformas hipofisiarias de FSH humana y de rata, con el mismo punto isoeléctrico (pI) o carga, pero que provienen de donadores con diferentes condiciones endócrinas, pueden tener distinta actividad biológica *in vitro*^(49,52). Estas observaciones sugieren fuertemente que la hipófisis anterior sintetiza una gran cantidad de isoformas de FSH, que a pesar de tener la misma carga presentan variabilidad en la composición de sus oligosacáridos^(19,49); las moléculas con carga distinta podrían tener diferentes proporciones de siálicos/sulfatos en diversas posiciones de la proteína, o inclusive contener estructuras ramificadas en sus carbohidratos internos.

La heterogeneidad de la FSH no se puede atribuir totalmente a la variabilidad de los carbohidratos en la molécula, ya que se han encontrado diferencias en la composición de la cadena peptídica^(53,54). Este aspecto aún no es muy claro, ya que la disparidad encontrada en la secuencia de aminoácidos de la hormona podría deberse a los métodos de extracción y purificación empleados para su aislamiento.

El espectro de la heterogeneidad por carga de la FSH incluye desde isoformas con un pH básico hasta formas con un pH fuertemente ácido; sin embargo la mayor proporción de isoformas tienen un pH menor a 5.5. La incubación de FSH con la enzima neuraminidasa, disminuye progresivamente las formas más ácidas mientras que a la par incrementa la proporción de las menos ácidas, dando isoformas con un pH de elución de 6.4 o mayor⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾, estas observaciones indican que en gran medida la acidez de la hormona está determinada por la cantidad de ácido siálico presente en la molécula.

Actividad biológica

Como consecuencia de la variabilidad estructural de la FSH es posible detectar diferencias en la unión a los receptores membranales, así como en la vida media plasmática de las isoformas, lo que da lugar a distintas respuestas biológicas finales tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*^(2,3,59).

- Actividad biológica *in vitro*.

Para el análisis de la potencia biológica de las formas moleculares de la FSH se han empleado diversos tipos de bioensayos *in vitro*, los más utilizados son aquellos que valoran la capacidad de la FSH para inducir la aromatización de estrógenos, ya sea en células de granulosa de ratas inmaduras pretratadas con dietil etil bestrol_(16,28), o en células de Sertoli de ratón₍₃₇₎. Recientemente se han realizado ensayos en los que se cuantifica la producción de AMPc en células que expresan el receptor recombinante humano de la FSH₍₆₀₎. Para evaluar la potencia biológica *in vitro* de las isoformas de FSH, se considera habitualmente su actividad biológica, su unión al receptor y su inmunorreactividad, de cuyos valores se obtiene los cocientes bioactividad/inmunorreactividad (B/I) y unión al receptor/inmunorreactividad (RRA/I). Sin embargo los resultados obtenidos a través del uso de estos cocientes deben de ser tomados con cautela. A pesar de que las mediciones de la bioactividad e inmunorreactividad de las isoformas de FSH han servido para esclarecer diferencias entre aspectos sutiles en su estructura molecular, es necesario probar para cada método que dichas diferencias no se deben al tipo particular de reconocimiento del anticuerpo ó al sistema específico del bioensayo empleado. Por lo tanto, para una adecuada interpretación de estas mediciones se deben de considerar cuidadosamente la fuente y pureza del receptor o preparado celular, el estándar utilizado para su cuantificación, la especificidad del antisuero, el punto final de la cuantificación (en el caso de los bioensayos) y la presencia de paralelismo entre el estándar y la muestra desconocida₍₆₁₋₆₄₎.

Aunque es difícil obtener conclusiones definitivas con respecto a la actividad biológica de las isoformas de FSH, en términos generales, en condiciones *in vitro*, la bioactividad y la unión al receptor declina conforme el pI de la isohormona es más ácido. Estos hallazgos han sido consistentes en varias especies de animales como roedores, monos y humanos_(3,5,65,66). Sin embargo los resultados y la interpretación de los diferentes bioensayos *in vitro* depende en gran parte del sistema utilizado. Los ensayos que evalúan la inducción de aromatización han obtenido que la máxima bioactividad *in vitro* las tienen aquellas isoformas con pIs de 5.9 a 4.1 y la menor las de pIs menores a 4.0_(3,67). Las isoformas de la FSH humana con un pI mayor o igual a 7, muestran una actividad biológica intermedia entre las más ácidas y las menos ácidas_(3,6). Esta distribución en campana en la bioactividad *in vitro* de las isoformas de FSH concuerda con los resultados de estudios que muestran una ausencia de

bioactividad en las isoformas con un pH alcalino (pH 10.0-9.94)⁽⁶⁸⁾, las cuales podrían ser variantes totalmente desializadas o deglicosiladas.

- Actividad biológica *in vivo*.

La sobrevida de las diferentes isoformas de FSH en la circulación depende de manera importante del contenido de ácido siálico o grupos sulfatos de la molécula. De hecho, se ha encontrado una correlación significativa entre el pH de las isoformas y su depuración plasmática^(3,4). Tanto para la FSH de rata como para la humana, conforme se incrementa el pl de sus isoformas, su vida media circulante disminuye^(69,70). En contraste a lo encontrado en estas especies, en la FSH ovina⁽⁷¹⁾ no existen diferencias en la depuración plasmática entre varias isoformas; ésto puede deberse a que las moléculas ácidas de la FSH ovina tienen una gran cantidad de oligosacáridos cargados negativamente por la presencia de residuos de grupos sulfatos, los cuales facilitan su degradación hepática⁽⁴⁷⁾. En general, las isoformas menos ácidas de FSH tienen una bioactividad *in vivo* considerablemente menor que las más ácidas⁽⁵⁹⁾, lo cual parece ser consecuencia de su bajo contenido de ácido siálico y de la rápida degradación circulatoria a la que están sujetas^(3,58,59).

En resumen, los bioensayos *in vitro* indican que las formas menos ácidas de FSH son más potentes e inducen una mayor respuesta en la célula blanco^(3,59), en tanto que en condiciones *in vivo* las formas menos ácidas presentan una menor bioactividad a juzgar por su respuesta casi indetectable en los bioensayos clásicos⁽⁷²⁾; esta reducida bioactividad es consecuencia de su corta vida media plasmática^(3,4,70).

Métodos de estudio de la microheterogeneidad de la FSH

Los métodos más empleados para el fraccionamiento de las isoformas de FSH son aquellos que las separan de acuerdo a su carga eléctrica. Un ejemplo es el isoelectroenfoco (IEF), el cual separa los diferentes isómeros de la proteína por su migración a través de un gradiente de pH hasta que la proteína alcanza su pl. Otro método es el cromatoenfoco (CF), el cual es una cromatografía de intercambio iónico en donde el amortiguador de corrimiento forma un gradiente de pH permitiendo que las isoformas eluyan progresivamente al alcanzar su pl correspondiente⁽⁷³⁾. Un tercer método es la electroforesis de zona en suspensión de agarosa⁽⁷⁴⁾, en esta técnica la

movilidad electroforética de la hormona es expresada en relación a la movilidad de un estándar, habitualmente la albúmina⁽⁷⁵⁾.

Distribución de las isoformas de FSH

Las isoformas de la FSH, han sido aisladas a partir de extractos de hipófisis anterior, suero y orina de diferentes especies de animales, incluyendo al humano. Su número y cantidad relativa dependen de diversas variables tales como la técnica utilizada en su separación, la muestra de extracción y el estado fisiológico del donador al momento de la obtención de la muestra^(70,71,76). En términos generales las isoformas circulantes son más ácidas que las intrahipofisarias ^(3,10,77), esta aparente discrepancia entre la carga de las isoformas almacenadas y las circulantes se puede atribuir a la mayor vida media circulatoria de las formas más ácidas^(3,70). Los estudios en orina se han llevado a cabo en muestras parcialmente purificadas de mujeres postmenopáusicas^(4,78,79); en estos estudios la mayor proporción de isoformas urinarias se recuperaron en pls menores a 5.0, mientras que sólo se detectó una pequeña cantidad entre valores de pH de 5.8 a 5.0^(4,78). Al comparar los perfiles de distribución de las isoformas de FSH extraídas de diferentes muestras de partida, es evidente que la FSH urinaria contiene una menor cantidad de formas menos ácidas que las hipofisarias y las séricas. La mayor abundancia de isoformas ácidas en muestras de orina puede ser el resultado de los métodos de purificación empleados y/o al hecho de que la glándula hipofisaria de mujeres postmenopáusica secreten formas más ácidas en comparación con las secretadas por mujeres en edad reproductiva^(11,76).

En el humano ocurren cambios cuantitativos importantes en la FSH durante el desarrollo sexual, estos cambios se acompañan de modificaciones en la distribución por carga de las isoformas de la FSH hipofisaria y circulante⁽⁷⁶⁾. La carga media de la FSH hipofisaria en los niños prepúberes es menos negativa que la de los hombres adultos; sin embargo está cargada más negativamente que la de las niñas de edad similar. Por el contrario la carga media de la FSH hipofisaria es similar entre niñas prepúberes y mujeres jóvenes⁽⁷⁶⁾. Con respecto a la FSH circulante, los estudios realizados también demuestran que las niñas tienen isoformas menos ácidas que los niños de la misma edad⁽⁸⁰⁾. La bioactividad de la FSH circulante de las niñas durante la pubertad es similar a la que presentan las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual, sin embargo es menos biopotente que las isoformas de FSH de las mujeres durante la fase preovulatoria⁽⁷⁶⁾. Esta serie de datos indican que la maduración sexual

se acompaña de cambios en las características fisicoquímicas y biológicas de la FSH almacenada y secretada.

Con respecto a la heterogeneidad de la FSH durante la edad reproductiva, se ha encontrado una mayor proporción de formas menos ácidas en el suero de mujeres durante la fase folicular tardía y el medio ciclo_(10,67). Por otro lado, la vida media de la FSH secretada 2 a 3 días antes de la ovulación es considerablemente menor que la de la FSH presente en la fase folicular temprana y media_(10,81). Las observaciones de que las isoformas de FSH menos sializadas, con vida más corta son preferencialmente secretadas durante el periodo preovulatorio, es compatible con la hipótesis acerca de la existencia de mecanismos reguladores que controlan tanto la intensidad como la duración de la señal gonadotrópica durante el crecimiento y la maduración folicular. Aún no es claro si el aumento relativo de la distribución de isoformas menos ácidas durante la fase preovulatoria es el resultado del aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH, o de las concentraciones de estrógenos, o de la combinación de ambos.

Regulación endócrina

La distribución relativa de las isoformas de la FSH está modulada por los cambios en el ambiente endócrino. Varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en animales de experimentación y en humanos han encontrado que la mezcla de las diferentes isoformas hipofisarias y circulantes de la FSH es regulada por los esteroides gonadales y la GnRH_(2,61,67,82-84). Este tipo de regulación endócrina puede variar dependiendo de la especie estudiada; por ejemplo, el perfil de distribución de las isoformas de FSH hipofisarias se modifica significativamente durante la pubertad en el roedor y en el humano_(76,85,86), pero casi no se detectan cambios en el bovino₍₈₇₎.

Los esteroides sexuales, particularmente los estrógenos, están involucrados en la producción y secreción de las diferentes isoformas de FSH_(48,57,86,88). En términos generales el 17 β -estradiol (E₂) favorece la formación de formas menos ácidas de FSH, por ejemplo, en la rata hembra ciclante las formas menos ácidas se incrementan significativamente el día del proestro_(48,86), en el cual la concentración de estrógenos es relativamente alto. Un incremento similar en estas formas de FSH puede observarse en hamsters y monos ovariectomizados (Ovx) tratados con E₂_(57,88). Sin embargo, este efecto modulador de los estrógenos en la distribución por carga de la FSH intrahipofisaria varía dependiendo del diseño experimental, la dosis y la duración de la

exposición al estradiol. Por ejemplo, en el hámster Ovx, los cambios en la distribución por carga de las isoformas de FSH son tiempo dependientes⁽⁸⁸⁾; una exposición prolongada de estradiol (30h) incrementa la producción de las formas menos ácidas de FSH, en tanto que un menor tiempo de exposición (20h), ocasiona un aumento en la síntesis de formas más ácidas.

Algunos estudios en humanos apoyan la importancia del estradiol en la regulación de la heterogeneidad de la FSH. En mujeres ovariectomizadas o con hipogonadismo, la exposición prolongada a estrógenos sintéticos conduce a un aumento en la proporción de isoformas menos ácidas^(11,12,67,89). Después de la menopausia, estado hipocestrogénico natural, es posible observar un incremento de las formas más ácidas. El tratamiento con estrógenos a mujeres postmenopáusicas ocasiona cambios en la distribución de las isoformas de FSH de formas relativamente más ácidas a relativamente menos ácidas^(12,89).

A pesar de que los efectos de los estrógenos en el pleomorfismo de la FSH no son uniformes para todas las especies, la evidencia en roedores y primates indica que este esteroide gonadal altera significativamente la carga de las gonadotropinas

Con respecto a la influencia de los andrógenos en la heterogeneidad por carga de la FSH, las evidencias en roedores y humanos sugieren que estos esteroides favorecen la producción de formas más ácidas; por ejemplo, la FSH hipofisaria de roedores es invariablemente más ácida en los machos que en las hembras^(2,48,52,86). La orquidectomía origina modificaciones en la producción de las isoformas de FSH, aunque la dirección de los cambios varía dependiendo de la especie animal estudiada. En la rata y el carnero, la castración incrementa el contenido de isoformas menos ácidas^(90,91), mientras que en el hámster y en el mono macho ocurre lo opuesto^(92,93). Los cambios de la heterogeneidad de la FSH en varones con diferentes alteraciones de la función testicular, son indicadores de un papel regulador importante de los andrógenos. Por ejemplo la vida media plasmática de la FSH es mayor en ancianos que en los jóvenes, lo que probablemente implica que las isoformas de aquellos están sializadas. Por otro lado, la potencia biológica neta de la FSH se modifica en paralelo a los cambios de las concentraciones de testosterona^(94,95). Con respecto a los estudios *in vitro* se ha observado que la exposición con testosterona a células hipofisarias en cultivo ocasiona un incremento de la secreción de formas más ácidas de FSH⁽⁹⁶⁾.

La GnRH juega un papel importante en la regulación de la heterogeneidad por carga de la FSH. Durante la pubertad tanto de roedores como de humanos, tiempo durante el cual se incrementa la secreción de la GnRH, hay alteraciones evidentes en el perfil de distribución por carga de las isoformas de FSH_(76,85,97). En términos generales, los estudios sugieren que la GnRH tiene un efecto en la secreción de formas menos ácidas, por ejemplo, el inducir la pubertad a ovejas con GnRH exógena, ocasiona un cambio en el incremento de formas menos ácidas en la circulación₍₈₃₎.

Algunos estudios *in vitro* han mostrado que cuando las células hipofisarias_(65,82) son estimuladas con GnRH, secretan isoformas menos ácidas en comparación con las células no estimuladas. Por el contrario, en otros estudios realizados también con células hipofisarias de rata₍₉₈₎ y de oveja₍₉₉₎, no se observó un efecto modulador de la GnRH en la relativa distribución de isoformas de FSH secretadas. Las discrepancias encontradas entre los diversos estudios puede deberse al estado fisiológico en el que se encuentra el donador.

Aunque los diferentes hallazgos indican que la GnRH juega un papel importante en la determinación de la heterogeneidad por carga de la FSH, la presencia de las gónadas en los diferentes modelos experimentales empleados, hace difícil el poder discriminar entre los efectos directos de la GnRH y los inducidos por los esteroides sexuales.

Se han realizado pocos estudios relacionados con la influencia de los péptidos gonadales en la distribución del perfil de las isoformas de la FSH; los hallazgos encontrados sugieren que los efectos de los péptidos gonadales son menos pronunciados que los ocasionados por los esteroides sexuales y por la GnRH. Para analizar el efecto de la activina en la heterogeneidad de la FSH se realizó un estudio *in vitro*₍₈₂₎ en donde células hipofisarias de rata fueron incubadas con Activina-A humana recombinante, lo cual indujo la síntesis y secreción de FSH, pero no alteró la distribución del perfil del pI tanto en la FSH intracelular como en la secretada. Sin embargo, el hallazgo de que la activina-A modula la secreción de la GnRH en la línea neuronal celular GTi-7₍₁₀₀₎ da la posibilidad de que este factor puede regular indirectamente *in vivo* la producción de isoformas de FSH al modular la producción y/o secreción de GnRH. En cuanto a la inhibina, el hecho de que las concentraciones circulantes de este péptido gonadal se incrementen durante la fase lútea del ciclo menstrual_(101,102), podría asociarse a la disminución de formas menos ácidas de FSH durante esta fase_(10,87).

Para la regulación endócrina de las isoformas de FSH, hay un efecto tanto a nivel hipotalámico como a nivel gonadal que modula la naturaleza molecular de la hormona y como consecuencia sus propiedades biológicas. Por lo tanto, los cambios en la producción y secreción de las isoformas de FSH parece ser el resultado de la acción concertada de varios factores.

RECEPTOR DE FSH

El receptor de la FSH se expresa en la membrana de células gonadales, específicamente en las células de la granulosa en el ovario y en las células de Sertoli en el testículo, en donde en respuesta a la FSH hipofisaria estimula la gametogénesis. También se ha encontrado en baja concentración en otros tejidos que no son gonadales, pero el significado biológico de esta expresión aún no es clara⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾.

El receptor de la FSH, junto con el de la LH y el de la TSH, pertenece a los receptores de las hormonas glicoprotéicas, los cuales forman un subgrupo en la superfamilia de receptores acoplados a proteínas que unen a nucleótidos de guanina, también llamadas proteínas G. La proteína G es una estructura heterotrimérica formada por 3 subunidades, la α , la β y la γ . En su forma no activa, la subunidad α está unida al difosfato de guanidina (GDP)⁽¹⁰⁶⁾. El cambio del GDP por una molécula de trifosfato de guanidina (GTP) promueve la disociación de la subunidad α del complejo β - γ . La subunidad α activa (unida al GTP) así como el complejo β - γ , son los responsables de la modulación de la actividad de distintos efectores intracelulares, como las adenilato ciclasas, las fosfolipasas y los canales membranales para diferentes iones. Los cambios en la actividad de los efectores intracelulares ocasiona un cambio iónico y/o metabólico en la célula⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. La hidrólisis del GTP por una GTPasa provoca la reasociación de la subunidad α con el complejo β - γ ⁽¹¹⁰⁾ y la subsecuente inactivación de la proteína G.

Los receptores acoplados a proteínas G se caracterizan por tener una región muy extensa extracelular amino terminal, una porción con 7 dominios transmembranales, y una región intracelular carboxilo-terminal.

La mayoría de los receptores acoplados a proteínas G y que pertenecen a la familia de receptores semejantes al de la rodopsina, tienen como característica común que están codificados por un solo exón y que la región amino-terminal extracelular es muy

pequeña (entre 30 y 40 aa). Esta es una diferencia importante con respecto a los receptores de las hormonas glicoprotéicas, en los cuales este dominio es muy extenso (348, 333 y 398 residuos de aa para los receptores de FSH, LH/CG y TSH de humano, respectivamente); en estos receptores esta sola región está codificada por múltiples exones (de 9 a 10 exones) y aproximadamente comprende la mitad del total de la proteína. La región transmembranal y la intracelular, están codificadas por un solo exón.

En los receptores de las hormonas glicoprotéicas, el dominio extracelular es la parte responsable de la unión a la hormona₍₁₁₁₋₁₁₃₎. El receptor de la FSH tiene en esta región 4 sitios potenciales de N-glicosilación y una zona rica en leucinas, similar a las encontradas en las proteínas de adhesión celular o en los dominios de interacción entre proteína-proteína₍₁₁₁₎, por lo que se cree que esta zona es importante para la interacción de la hormona con su receptor₍₁₁₄₋₁₁₆₎. Un grupo de cisteínas presentes en la sección amino-terminal, pueden formar puentes disulfuro en esta región y con las asas extracelulares del dominio transmembranal del receptor. Esta parte rica en cisteínas está muy conservada entre los distintos receptores de las glicoproteínas₍₁₁₄₋₁₁₉₎ lo que sugiere la existencia de puentes disulfuro con una función importante en la conformación de la estructura tridimensional del dominio extracelular del receptor.

La región amino terminal podría funcionar como una antena que une a la hormona, mientras que la activación del receptor y la generación de la señal intracelular dependerán de elementos estructurales presentes en los dominios transmembranales e intracelulares.

La parte transmembranal está compuesta de 7 dominios, conectados entre sí por tres asas intracelulares y tres extracelulares. La región intracelular es la porción encargada de activar la señal de transducción en estos receptores de glicoproteínas₍₁₂₀₎. Las asas intracelulares, en especial la tercera asa y la región carboxilo-terminal, son las porciones responsables del acoplamiento del receptor con las proteínas G_(119,121), y por tanto están involucradas en la estimulación de distintas vías de activación.

Una proporción alta de serinas y treoninas, potencialmente fosforilables, se encuentran en las porciones intracelulares. La fosforilación por cinasas específicas de esta región podría jugar un papel muy importante en la desensibilización temprana y en la regulación decreciente del receptor₍₁₂₂₎. Específicamente se ha demostrado que para el receptor de la FSH segundos después de la estimulación hormonal, el receptor es fosforilado_(123,124).

Receptor de hFSH

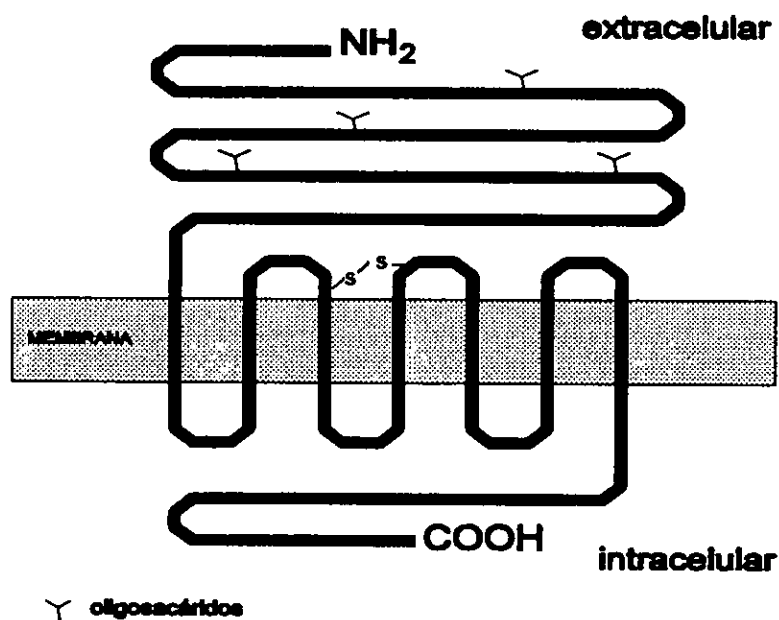


Figura 2. Esquema del receptor de la FSH humana.

El principal mecanismo de acción de las hormonas glicoprotéicas es a través de la vía del AMPc-PKA (cinasa de proteínas A)_(122,123). Cuando la LH/CG, la FSH y la TSH se unen a su receptor específico se activa la proteína G estimuladora (Gs) con la subsecuente activación de la adenilato ciclasa₍₁₁₀₎; cada molécula de ciclasa, cataliza la conversión de un número elevado de moléculas de ATP en AMPc, el cual funciona como un efector alostérico que activa a las proteínas cinasas dependientes de AMPc, éstas a su vez fosforilan y activan a varias proteínas endógenas las cuales regulan una gran diversidad de procesos celulares₍₁₂₅₎. Como ejemplo de respuesta biológica para la FSH se encuentra la aromatización de andrógenos₍₁₂₆₎.

Los receptores de las hormonas glicoprotéicas también pueden estar acoplados a proteínas Gq/11 que activan a la fosfolipasa C-β (PLC-β)₍₁₂₇₎, enzima que cataliza la hidrólisis de polifosfoinositoles a inositol trifosfato y diacilglicerol; éstos son mensajeros intracelulares que inducen la activación de cinasas de proteínas C (PKC), la liberación del calcio intracelular y probablemente también la entrada del calcio

extracelular, lo que origina la activación de enzimas cinasas dependientes de calcio. También el receptor puede regular directamente los canales de iones, modulando el tránsito de éstos a través de la membrana celular_(108,128). En el caso de la LH, al unirse a su receptor no solamente activa la estimulación de la adenilato ciclasa, sino también la vía de la PLC- β _(108,123,127,129-132) y fosfolipasa A_2 ₍₁₃₃₎. Para la FSH, algunos estudios recientes comprueban que la activación del receptor de FSH recombinante de rata también origina el incremento de la hidrólisis de los fosfoinositoles_(124,134). Como dichas cascadas de amplificación necesitan de una regulación, no es sorprendente que las células tengan mecanismos eficientes para la rápida degradación del AMPc por fosfodiesterasas, así como para inactivar proteínas fosforiladas.

La unión de la FSH a su receptor ocasiona la activación de la adenilato ciclasa con la subsecuente activación de la PKA₍₁₃₅₎, pero también ocasiona un incremento intracelular de calcio, lo cual es un efecto independiente de la PKA₍₁₃₆₎.

A la fecha se ha clonado el receptor de FSH de rata, a partir de DNA proveniente de testículo₍₁₁₄₎ y el receptor de FSH humano de DNA de ovario y de testículo₍₁₁₄₎. El receptor clonado para hFSH tiene una secuencia de 2,327 nucleótidos en el cDNA que codifica para una proteína de 678 residuos de aa con un peso molecular aproximado de 75.5 KDa. Ambos receptores clonados, el de rata y el humano, muestran 89% de homología, la parte más altamente conservada es la región transmembranal, la cual tiene una similitud del 95%, mientras que la parte extracelular tiene aproximadamente un 86% de homología.

Comparando el receptor recombinante de la hFSH con el de la hLH/CG, la porción extracelular tiene un 50% de homología; la región rica en cisteínas localizada en este dominio es altamente conservada entre los dos receptores de estas glicoproteínas, lo que sugiere un posible papel conformacional de este segmento. La parte extracelular tiene 349 residuos de aa, mientras que la región transmembranal tiene 264. Este último dominio es el de mayor homología (70%) con respecto al de LH/CGR. La región intracelular del receptor de FSH tiene 65 residuos de aa; esta región en su parte amino terminal tiene una gran similitud entre los tres receptores de glicoproteínas mientras que la parte carboxilo terminal es variable en todos los receptores, y puede tener una función más específica para cada uno de ellos₍₁₃₇₎. La localización cromosómica del gen del receptor de FSH humano es 2p21-p16, similar a la encontrada para el gen del receptor de LH humano₍₁₃₈₎.

Aparentemente los carbohidratos que se encuentran en el dominio extracelular del receptor de FSH no son necesarios para la unión de la hormona al receptor, aunque no se descarta que estos puedan tener un papel importante en la correcta conformación tridimensional de la proteína₍₁₃₉₎.

Se han encontrado distintos transcritos del RNAm del receptor de FSH. Esta diferencia puede tener importantes implicaciones con respecto a la naturaleza de la interacción hormona-receptor y el subsecuente mecanismo de la señal de transducción₍₁₄₀₎.

Isoformas de FSH y su receptor

Cuando la FSH totalmente deglicosilada se une al receptor actúa como un antagonista, ya que sólo ocupa el lugar de la hormona glicosilada y no activa a la adenilato ciclasa₍₃₇₎. Los hallazgos de la importancia que tienen los oligosacáridos de la hormona en la unión al receptor se han obtenido de estudios con mutagénesis dirigida en las asparaginas correspondientes a los sitios de glicosilación₍₃₉₎. La ausencia de los oligosacáridos no impide la unión al receptor, sin embargo, de las 4 cadenas oligosacáridicas, aparentemente la que corresponde a la asparagina 52 de la subunidad α , es la más importante para inducir la activación del receptor_(39,139).

Curiosamente, en estudios recientes en que también se utilizó mutagénesis dirigida₍₁₄₁₎, se encontró que tanto la unión al receptor como la señal de transducción, son funciones dissociables; cada una involucra diferentes sitios en la molécula de FSH (un aminoácido específico β Arg35- para el sitio de unión del receptor y un oligosacárido específico α Asn52- para la señal de transducción). Esto no implica que las cadenas de los oligosacáridos de la subunidad β no son importantes, de hecho existen estudios₍₃₉₎ en que se demuestra que cuando la FSH carece de cualquiera de los oligosacáridos de la subunidad β , la mayor producción de estradiol disminuye; estos investigadores también encontraron que la FSH sin el oligosacárido de la α Asn52- tiene una biopotencia reducida. Por lo tanto, la potencia de la hormona depende tanto de la estructura del ligando como de los cambios en la afinidad resultante; la unión hormona-receptor puede producir un espectro de respuestas celulares a través de diversas vías de señales post-receptor.

En apoyo a que las isoformas de la FSH pueden inducir diferentes funciones específicas existen estudios realizados con bioensayos en donde se analizaron múltiples puntos finales después del estímulo con distintas preparaciones de FSH, simultáneamente se cuantificó AMPc, estradiol e inhibina en un cultivo de células de Sertoli₍₄₈₎. Los resultados del ensayo comparativo de la potencia de FSH ovina (oFSH) químicamente deglicosilada (DG-oFSH) contra oFSH nativa, demostraron respuestas diferentes de las dos variantes dependiendo del punto final de medición. Para el AMPc, la oFSH nativa indujo un mayor incremento con respecto a la DG-oFSH; en términos de producción de estradiol, también la DG-oFSH fue menos potente que la oFSH nativa. Sin embargo al analizar la producción de inhibina, la DG-oFSH fue más potente que la oFSH nativa. De manera similar, una comparación preliminar de hFSH intacta y un análogo segmentado enzimáticamente en la posición β 38-39, reveló que tanto la FSH hendida como la intacta tienen una potencia similar en términos de inducción de la aromatasa, pero la molécula hendida fue más potente en la inducción de la producción de inhibina con respecto a la intacta₍₄₈₎. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que los cambios selectivos de las diferentes isoformas de FSH no solamente alteren la potencia real de la hormona, sino que también pueden ocasionar un evento único a nivel de la célula blanco.

Después de la adición de FSH a la célula blanco, hay un incremento detectable en orden de minutos de calcio y de AMPc_(136,142,143); aún más, bajo condiciones de estimulación intermitente del receptor, la proteína G activada puede tener vidas medias del orden de segundos₍₁₄₃₎. Esto podría explicar las distintas respuestas originadas de la mezcla de isoformas, en donde las isoformas menos ácidas de FSH, que tienen una depuración mucho más rápida, dan la potencia necesaria al ovario para el desarrollo del folículo preovulatorio. La liberación pulsátil de estas isoformas podría inducir de una manera relativamente breve pero constante, una respuesta biológica completa a pesar de la corta exposición del estímulo.

Alternativamente, las isoformas de FSH pueden inducir efectos diferentes en las células blanco a través de diversas variantes de poblaciones de receptores de FSH, ya que se han identificado diversos tipos de transcritos de RNAm para el receptor de FSH_(142,144). La diferencia en la afinidad por el receptor, puede ocasionar cambios en la cascada de señal y culminar en una respuesta celular diferente. La combinación de activación de diversos sistemas de mensajeros intracelulares depende de la

interacción ligando-receptor, lo cual estará dado tanto por la naturaleza del receptor como por la de la isoforma.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo de la actividad biológica y de la unión al receptor de las diferentes isoformas de la FSH intrahipofisaria humana empleando distintos sistemas *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Separar las isoformas de la FSH hipofisaria humana por el método del cromatoenfoque.
- Analizar la potencia biológica *in vitro* de las isohormonas de hFSH por medio del bioensayo de aromatización de la granulosa (GAB), cuantificando simultáneamente la acumulación de AMPc y de estrógenos.
- Comparar la potencia biológica *in vitro* de las isoformas de hFSH con base en su capacidad de inducir la producción de AMPc en las células 293 permanentemente transfectadas con el cDNA del receptor recombinante de hFSH (293-hFSHR).
- Realizar un estudio comparativo de la unión al receptor de las isoformas de hFSH utilizando diferentes tipos celulares.
- Investigar la formación del inositol trifosfato (IP3) como posible mensajero intracelular inducido por el estímulo de la hFSH hipofisaria en células de la granulosa de rata hembra inmadura y en las células 293-hFSHR.

HIPOTESIS

La FSH intrahipofisiaria existe en múltiples formas moleculares. Dado que la principal diferencia estructural entre las isohormonas es la cantidad de ácido siálico incorporado a cada una de ellas, hay una divergencia en la unión al receptor y como consecuencia diferencias en la respuesta celular en términos de producción de AMPc y de estrógenos. Las isohormonas menos ácidas producen un incremento mayor en la esteroidogénesis ya que se unen con mayor afinidad al receptor y a que alternativamente activan otras rutas intracelulares.

MATERIAL Y METODOS

Extractos hipofisarios

Se colectaron hipófisis humanas de autopsias de cadáveres de ambos sexos, examinados antes de cumplir 72 horas de fallecimiento y que habían sido conservados a 8°C a partir de las 3-4 horas posteriores a la muerte. Las hipófisis se almacenaron a -70°C, hasta el momento de preparar los extractos de glicoproteínas totales por el método de Jones y cols⁽¹⁴⁵⁾ y su posterior uso en el cromatofoco (CF).

Separación de las isoformas de hFSH de los extractos hipofisarios por cromatofoco

La obtención de las isoformas hipofisarias de hFSH se realizó por CF, método que separa los diferentes isómeros de la proteína por la interacción de la carga superficial de la molécula en una matriz. El CF es una cromatografía de intercambio iónico en donde el amortiguador de corrimiento forma un gradiente de pH de tal forma que la isoforma eluye cuando alcanza su punto isoeléctrico. En este caso se utilizó como intercambiador iónico la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) y el amortiguador de inicio imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4. Para poder incrementar la resolución de la separación de las isoformas, el tamaño de la columna fue de 90 x 1.5 cm, estas dimensiones son mayores a las previamente reportadas^(3,4,10). La muestra, correspondiente a 15-25 mg de FSH inmunorreactiva, fue depositada en la suspensión de la columna y después se agregó el amortiguador de corrimiento Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals), pH 4.0, diluido 1:8 con agua desionizada. Se midió el pH de cada fracción y cuando este alcanzó un valor <4.0, el amortiguador de corrimiento se sustituyó por una solución de NaCl 1 M, para recuperar el material no eluido dentro del rango de pH 7.4-4.0. Se colectaron entre 550 y 600 fracciones de 3 ml cada una, a una temperatura de 4°C y a una velocidad de 0.25 ml/min. Las fracciones fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta el momento de la determinación de su contenido de hFSH por el método del radioinmunoensayo (RIA). De acuerdo al perfil de distribución de FSH obtenido del CF, se mezclaron las fracciones que contenían mayor concentración de hFSH distribuidas por áreas de pH. Los grupos resultantes fueron dializados contra agua bidestilada en bolsas de membrana para diálisis con un límite de permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum

Medical Industries, Los Angeles, CA, E.U.A.) y posteriormente liofilizados. Se realizaron 3 CFs en estas condiciones.

El contenido inmunorreactivo de hFSH de cada mezcla de isoformas fue cuantificado por 3 diferentes métodos: RIA, ensayo inmunoenzimático (ELISA) y ensayo inmunorradiométrico (IRMA).

Inmunoensayos de la hFSH

- RIA de hFSH

El fundamento del RIA para la determinación de la hFSH se basa en la competencia en equilibrio entre la hFSH marcada radiactivamente y la hFSH de la muestra, contra un anticuerpo de conejo específico para la hFSH.

El RIA de hFSH se llevó a cabo con los reactivos donados por NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, E.U.A), utilizando como estándar la preparación hipofisiaria de referencia LER-907; el anticuerpo policlonal fue el anti-hFSH-6 y como trazador se empleó hFSH-I-3 radiomarcado con NaI^{125} (Amersham International Limited, Reino Unido) por el método de Cloramina $T_{(146)}$. El procedimiento del RIA consistió en agregar 100 μl de amortiguador PBS 0.05 M, gelatina 0.1%, pH de 7.4 (PBS-Gel), 100 μl de la muestra problema o de la dosis de la curva estándar, 100 μl de hFSH-I¹²⁵ (15,000 cpm), 100 μl de anti-hFSH a una dilución de trabajo 1:100,000 (final 1:400,000) preparado en PBS 0.05 M, EDTA 0.05 M (PBS-EDTA) y suero normal de conejo (SNC) al 2%, pH 7.4. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Posteriormente se añadieron a cada tubo 100 μl de 2° anticuerpo (suero de carnero inmunizado con gamma globulina de conejo) a una dilución de 1:10 (con la finalidad de precipitar los complejos inmunológicos) y se incubaron por 24 horas más a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 2 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y se determinó la radiactividad unida al anticuerpo presente en los precipitados empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, II, E.U.A.).

- ELISA de hFSH

El ELISA para la hFSH se realizó con reactivos de la Organización Mundial de la Salud (Co laborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, Londres, Reino Unido) y con el estándar LER-907 (NIADDK). Este es un ensayo inmunométrico, en el que se utilizan dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la hFSH, el primero es contra la cadena β de la molécula y se encuentra adherido al tubo de reacción, el segundo es contra la cadena α , y está marcado con la enzima fosfatasa alcalina. El procedimiento consistió en 3 pasos:

1) **Inmunoextracción.** La muestra se incubó con el anti-FSH adherido al tubo por 30 minutos a 37°C. La FSH se unió al anticuerpo y los demás componentes se removieron por decantación seguido del primer lavado con amortiguador TRIS/HCl 0.1M.

2) **Reacción del anticuerpo marcado.** Los tubos se incubaron con anti-FSH marcado con fosfatasa alcalina por 2 horas a 37°C, el cual reaccionó con la FSH unida al primer anticuerpo. El excedente de anticuerpo marcado se eliminó por decantación seguido de dos pasos de lavados.

3) **Desarrollo colorimétrico.** Los tubos se incubaron por 1 h a 37°C con monofosfato de fenoftaleína (sustrato para la fosfatasa alcalina), dando una reacción colorida, ya que la presencia de la enzima ocasiona un cambio de color de amarillo a rosa. La intensidad del color producido es una medida de la cantidad de FSH unida a ambos anticuerpos. La reacción se detuvo con 2 ml de amortiguador de glicina, pH=10.4 y la densidad óptica se midió con un espectrofotómetro (Beckman) a una longitud de onda de 550 nm.

- IRMA de hFSH

En el caso del IRMA, se utilizó el reactivo comercial I^{125} -IRMAkit (Immunochem™, ICN Biomedicals, Inc, Costa Mesa CA) y el estándar LER-907 (NIADDK). Este inmunoensayo también utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad α y una mezcla de anticuerpos monoclonal y policlonal contra la subunidad β de la hFSH; el primer anticuerpo está unido al tubo de reacción, mientras que los segundos están marcados con I^{125} . Cuando la FSH está presente, ésta se une simultáneamente a ambos anticuerpos formando un complejo que queda unido a la fase sólida, mientras

que el excedente de anticuerpo marcado (radioisótopo) permanece en solución y es eliminado por decantación.

La técnica consistió en agregar 100 µl de estándar o de muestra en los tubos que tienen adherido el primer anticuerpo y 200 µl de diluyente (PBS 0,01M). Después de la agitación se incubó por 45 minutos a 37°C, para posteriormente desechar por decanteo la fracción soluble. Se lavaron los tubos con 1 ml de amortiguador y se agitó vigorosamente la gradilla por aproximadamente 5 segundos. Los tubos se decantaron nuevamente y se incubaron con 300 µl del anti-hFSH-I¹²⁵ por 45 minutos más a 37°C. Se decantó el contenido de los tubos y se lavó dos veces con el amortiguador de lavado. Se cuantificó la radiactividad de la pastilla en un contador de radiaciones gamma (Packard Instrument Company).

En los tres inmunoensayos (RIA, ELISA e IRMA) se usaron de 6 a 8 dosis diferentes de cada grupo de isoformas para analizar el paralelismo con la curva estándar y entre cada una de ellas; cada muestra fue analizada por duplicado. Los valores fueron expresados en términos del estándar LER-907 (NIADDK). La sensibilidad para los 3 métodos fue de 4.6 ng/tubo.

Cada uno de los grupos de isoformas de FSH fueron además analizados en su contenido de LH y PRL con el objeto de descartar posibles interferencias en los bioensayos por la acción de estas dos hormonas.

RIA de LH

El RIA de hLH se llevó a cabo con reactivos donados por NIADDK, utilizando como estándar a la preparación hipofisiaria LER-907. El anticuerpo empleado fue el anti-hLH-2. Como trazador se utilizó hLH-I-3 radiomarcado con NaI¹²⁵ por el método de la Cloramina T. El Procedimiento consistió en agregar 100 µl del amortiguador de trabajo PBS 0.01 M, EDTA 0.05M, 0.1% ASB, 100 µl de la muestra problema o de estándar, 100 µl de hLH-I¹²⁵ a una concentración de 15,000 cpm y 100 µl de anticuerpo específico a una dilución de trabajo 1:50,000 (final 1:200,000). Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 18-24 horas. Posteriormente se añadieron 100 µl de 2° anticuerpo a una dilución de 1:10, incubándose con éste por 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 1 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los

sobrenadantes y a partir de los inmunoprecipitados se determinó el contenido de radiactividad unida al anticuerpo en un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company). Cada muestra fue analizada por duplicado y la sensibilidad del ensayo fue de 0.31 ng/tubo expresados en términos del estándar LER-907 (NIADDK).

RIA de Prolactina

El RIA se realizó con reactivos donados por NIADDK. El Procedimiento consistió en agregar 100 µl de amortiguador de fosfatos 0.1 M-ASB al 0.1%, 100 µl de la muestra problema o de estándar, 100 µl de PRL- I^{125} (radiomarcada por el método de la Cloramina T) a una concentración de 15,000 cpm y 100 µl de anticuerpo específico anti-hPRL a una dilución de trabajo 1:100,000 (final de 1:400,000). Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Posteriormente se añadieron 100 µl de 2° anticuerpo (anticuerpo anti-gamma globulina de conejo generado en carnero) a una dilución de 1:20, incubándose con éste por 2 horas más a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 1 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y de los inmunoprecipitados se determinó la radiactividad unida al anticuerpo en un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company). Cada muestra fue analizada por duplicado y la sensibilidad del RIA fue de 0.156 ng/tubo.

Bioensayos *in vitro*

La actividad biológica *in vitro* de las isoformas de hFSH hipofisarias, se determinó por medio del bioensayo de aromatización en células de la granulosa de rata (GAB) descrito por Jia y Hsueh₍₂₈₎ y con la cuantificación del AMPc en células fetales humanas de riñón (células 293) permanentemente transfectadas con el receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR).

- Bioensayo de aromatización en células de la granulosa (GAB)

Se utilizaron ratas hembras Wistar, de 21 a 22 días de edad, a las que se les implantó en el dorso una cápsula subcutánea de silástico (10x2 mm) conteniendo aproximadamente 10 mg de dietil-estil-bestrol (DES) (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, E.U.A.). Tres días después, los animales fueron sacrificados por dislocación

cervical y se obtuvieron los ovarios, los cuales fueron disecados y decapsulados; los folículos fueron puncionados para obtener las células de la granulosa, que fueron lavadas con medio de cultivo. Se realizó un conteo del número total de células y se diluyeron en medio de cultivo McCoy 5a sin suero fetal (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, E.U.A.) a una concentración de 100,000 células en 100 μ l de medio. Las células fueron cultivadas en medio McCoy 5a complementado con 4 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co.), 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina (Gibco Laboratories), 1.125 μ M de androstendiona (Sigma Chemicals Co.), 0.125 μ M de DES (Sigma Chemicals Co.), 1 μ g de insulina bovina (Eli Lilly y Cia de México, México, D.F.), 0.157 de μ M metil isobutil xantina (MIX) (Sigma Chemicals Co.), a un pH de 7.4. Los andrógenos actúan como sustrato de las aromatasas, en tanto que los estrógenos (DES) amplifican el efecto de la FSH sobre las aromatasas. A altas dosis de insulina se incrementa la estimulación de la FSH sobre la producción de estrógenos en las células de la granulosa, mientras que el MIX inhibe la acción de la fosfodiesterasa, enzima que hidroliza el AMPc.

A cada pozo de cultivo se le agregaron 300 μ l de medio de cultivo, 100 μ l de células y 100 μ l de la muestra de hFSH desconocida, quedando un volumen final de incubación de 500 μ l por pozo de cultivo en placas con 24 pozos de 16 mm (Gibco Laboratories).

Los cultivos se llevaron a cabo a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 horas. Los medios de cultivo obtenidos del bioensayo fueron centrifugados y almacenados a -20°C hasta el momento de cuantificar por RIA los estrógenos y el AMPc producidos *in vitro*.

Los resultados fueron expresados en ng totales de estrógenos y pmol de AMPc producidos por pozo de cultivo.

- Producción de AMPc en células humanas renales fetales (293) transfectadas con el receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR).

La línea celular 293 transfectada con el receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR) fue donada por el Dr. Aaron J.W. Hsueh, Stanford University, CA, EUA. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Gibco, BRL) que contenía 5% de suero de ternera (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co.), 100 mg/ml de geneticina (Gibco, BRL), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomicina (Gibco, BRL), a un pH de 7.2-7.3.

Para la cuantificación del AMPc producido por las células en respuesta al estímulo con FSH, se cultivaron las células en placas de 24 pozos de 16 mm (Gibco BRL). A cada

pozo de cultivo se le agregaron 300 μ l de medio de cultivo con 0.125 mM de MIX (Sigma Chemicals Co.), 150,000 células en 100 μ l de medio y 100 μ l de la dosis estándar o de la muestra desconocida de hFSH. Después de 24 horas de incubación, el medio y las células fueron aspirados. El producto obtenido fue calentado a ebullición por 3 minutos y posteriormente almacenado a -20°C hasta el momento de la cuantificación del contenido de AMPc por el método de RIA.

En ambos bioensayos se utilizó como estándar la preparación de LER-907 y para cada isoforma hipofisiaria se utilizaron de 8 a 10 dosis diferentes en incubaciones por duplicado. Los cultivos se llevaron a cabo a 37°C , en un incubador húmedo con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 . La actividad biológica relativa *in vitro* se calculó considerando cada dosis analizada en 3 a 4 bioensayos separados, y fue expresada como la razón bioactividad/inmunorreactividad (B/I), en términos de cada uno de los 3 inmunoensayos: RIA (B/RIA), ELISA (B/ELISA) e IRMA (B/IRMA).

- RIA de 17- β -estradiol

Las concentraciones de estradiol provenientes del GAB se determinaron por el método de RIA, empleando como trazador estradiol tritiado (Amersham International Limited, Reino Unido) y como curva estándar y anticuerpo los reactivos donados por el Programa Especial de Investigación en Reproducción de la Organización Mundial de la Salud (Cuba-México). El amortiguador de trabajo fue PBS 0.01 M, gelatina 0.1%, timerozal 0.01%. El método consistió en agregar 500 μ l de muestra o de curva estándar, 100 μ l de anticuerpo específico y 100 μ l del trazador. Se agitó e incubó por 1 hora a 40°C y 1 hora a 4°C . Al término de este tiempo se añadieron 200 μ l de carbón-dextrán, y se incubó por 20 minutos más a 4°C . Posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 4°C y se decantó, al sobrenadante se le agregó 5 ml de líquido de centelleo. La radiactividad presente en cada muestra se cuantificó empleando un contador de centelleo de radiaciones β (Packard Instrument Company). La sensibilidad del ensayo fue de 6.4 pg/tubo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado

- RIA de AMPc

Las concentraciones de AMPc provenientes de ambos bioensayos (GAB y 293-hFSHR) se determinaron por el método de RIA en el que se utilizó como curva estándar la sal sódica del 3,5'-monofosfato cíclico de adenosina (Sigma Chemicals Co.) y como trazador al tirosilmetiléster 2-O-monosuccinyl 3'5'-adenosin cíclico (TME-

sAMPc) (Sigma Chemicals Co.) radiomarcado con I^{125} por el método de la cloramina T. El antisuero fue el CV-27 AMPc (NIADDK). Tanto la curva estándar como las muestras problema fueron previamente acetiladas con 25 μ l de trietilamina-anhidrido acético (1:2) y diluidas en acetato de sodio 5 mM, pH 4.7. El método consistió en agregar 100 μ l de muestra o dosis estándar, 100 μ l de trazador (15,000 cpm) y 100 μ l de anticuerpo diluido 1:50,000 con acetato de sodio 50 mM, ASB al 0.1%, pH 6.1 (dilución final de 1:150,000); la mezcla se incubó por 24 horas a 4°C. La reacción fue detenida con 2 ml de etanol frío y los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y a partir de los inmunoprecipitados se determinó la radiactividad unida al anticuerpo empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y la sensibilidad del ensayo fue de 4.0 fmol/tubo.

Ensayos de unión al receptor

Con el objeto de analizar la capacidad de unión de las diferentes isoformas hipofisiarias de hFSH al receptor, se realizó un ensayo por competencia de unión al receptor (RRA), en el cual la hormona radiomarcada compitió con la hormona radionerte (isoformas) por la unión a un receptor. Con este propósito se emplearon 3 diferentes tipos celulares: células de la granulosa de rata inmadura pretratada con DES, membranas de testículo de rata macho adulta y células 293-hFSHR.

Para el ensayo de unión al receptor se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.01 M con $MgCl_2$ 5 mM, 100 mM de sacarosa y BSA al 0.1%, a un pH de 7.5 (amortiguador de RRA) y como trazador 30,000 cpm de hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcada con I^{125} por el método de glucosa oxidasa-lactoperoxidasa₍₁₄₇₎. La capacidad de unión al receptor de cada isoforma fue analizada en los 3 diferentes modelos mencionados anteriormente.

En los 3 modelos se utilizaron 30,000 cpm de trazador/100 μ l, 200,000 células o membranas de testículo, en un volumen de 100 μ l y 100 μ l de muestra de hFSH conteniendo diferentes concentraciones de las isoformas. El ensayo se incubó de 18 a 24 horas, a temperatura ambiente con agitación constante. La reacción se detuvo con 2 ml del amortiguador de RRA a 4°C. Se agitó cada tubo y se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el precipitado resultante fue analizado en su contenido de radiactividad empleando un contador para

radiaciones gamma (Packard Instrument Company). Como estándar se utilizó el preparado hFSH-I-SIAFP(1)-B (NIADDK). Cada ensayo de unión incluyó de 6 a 8 dosis diferentes de cada grupo de isoformas. Las muestras desconocidas fueron analizadas por duplicado. La capacidad de unión al receptor se calculó considerando cada dosis analizada en 3 a 4 radiorreceptores separados y fue expresada como la razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I).

- Obtención de las membranas de testículo

Se utilizaron ratas macho Wistar de 28-30 días de edad las cuales fueron sacrificadas por dislocación cervical. Posteriormente se extrajeron los testículos para ser pesados y homogenizados con un pistilo de teflón; el tejido obtenido se filtró a través de una malla doble. Posteriormente se realizó la segunda homogenización; el homogenado resultante fue filtrado nuevamente y resuspendido en el amortiguador de RRA a una concentración de 1 ml por gramo de peso inicial del tejido.

- Obtención de las células de la granulosa

Para la obtención de las células de la granulosa, se realizó la misma técnica descrita para el GAB, con la variante de que las células fueron resuspendidas en medio para RRA a una densidad de 200,000 células/100 μ l.

- Obtención de células 293-hFSHR

Las células 293-hFSHR fueron cultivadas en placas de polipropileno de 10 mm (Gibco Laboratories) en medio de cultivo; a las 48 horas, se resuspendieron y centrifugaron; posteriormente se contaron y diluyeron en amortiguador de RRA a una concentración de 200,000 células/100 μ l.

Radiomarcage de hFSH por el método de la Cloramina T.

Se hidrató el Sephadex G-100 (Sigma Chemicals Co.) con PBS 0.01 M, posteriormente se agregó en una columna de cromatografía de 10 x 1 cm; la columna fue equilibrada con PBS-BSA y se lavó con PBS 0.01 M. A 25 μ g/25 μ l de hFSH-I-3 se le agregaron 25 μ l de PB 0.5M, pH 7.4. Posteriormente se le añadió 1mCi de NaI¹²⁵ (Amersham International), 10 μ l de Cloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonaminada) (0.25 mg/ml) y se incubó por 50 segundos. Al término de la reacción se añadieron 50 μ l de metabisulfito

de sodio (1 mg/ml). La hormona marcada fue separada del NaI^{125} libre utilizando la columna de Sephadex G-100 y colectando 0.5 ml en tubos que contenían 200 μl de PBS 0.01 M, pH 7.4 y ASB 0.1%. El amortiguador de elución fue PBS 0.01 M, pH 7.4.

Radiomarcaje de hFSH por el método de la lactoperoxidasa.

Se preparó la columna de Sephadex G-100 al igual que lo realizado para el radiomarcaje por el método de la cloramina T. A 25 μl de hormona (2.5 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$) se le agregaron 25 μl de PB 0.5 M y 20 μl de PB 0.1 M. Posteriormente se le adicionó 1 mCi de NaI^{125} (Amersham International) y se cuantificó la radiactividad. La reacción inició con la adición de 10 μl de lactoperoxidasa, 5 μl de glucosa-oxidasa y 10 μl de β -D-glucosa. Se agitó por 5 segundos y se detuvo la reacción con 100 μl de azida de sodio. Posteriormente la mezcla fue depositada a la superficie de la columna, lavando el residuo del vial con 100 μl de amortiguador de fosfatos 0.5 M. Se colectaron 30 tubos con 0.5 ml a cada uno a los cuales se les adicionó previamente 200 μl de PBS 0.01 M, pH 7.4 y ASB 0.1%.

Radiomarcaje de AMPc por el método de la Cloramina T

Para el marcaje del AMPc se utilizó 2.5 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ de sCAMPc-MET al cual se le adicionó 25 μl de agua desionizada, 30 μl de amortiguador de fosfatos de sodio 0.5 M, pH 7.4 y 1mCi de NaI^{125} (Amersham International). Se cuantificó la cantidad de radiactividad presente en el tubo y se adicionaron 50 μl de Cloramina T. Se incubó durante un minuto y se detuvo la reacción con 100 μl de solución de metabisulfito de sodio y 15 ml de agua desionizada. La muestra resultante se depositó a la superficie de la columna previamente preparada.

La separación del AMPc marcado se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico. Dos miligramos de la resina DEAE Celulosa (dietilaminoetil celulosa) (Sigma Chemical Co.), fueron previamente activados con 100 ml de NaOH 0.25 M; ajustándose el pH a 7.0 con HCl concentrado. Después de 30 minutos se filtró y lavó con 100 ml de agua desionizada y se volvió a filtrar la resina, se resuspendió en 100 ml de HCl 0.25 M y se dejó reposar por 10 minutos más; finalmente se filtró y lavó con 100 ml de agua desionizada. A la resina de DEAE celulosa previamente activada se le agregaron 100 ml de una solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico

1M, pH 4.4 por 10 minutos. La resina fue lavada con agua desionizada y transferida a una columna de 4.0 x 0.5 cm.

Para formar los gradientes se conectó la columna a una bomba peristáltica (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suiza) y se eluyó la muestra con 20 ml de amortiguador de fosfato de potasio dibásico 5 mM, pH 4.4 y posteriormente con 70 ml de solución amortiguadora de fosfato de potasio dibásico 10 mM, pH 4.4. Se colectaron 1.5 ml por tubo que contenían 200 μ l de PBS 0.01 M. Finalmente se cuantificó la radiactividad en cada fracción recuperada de la columna.

Determinación de la producción de IP

La determinación de los inositoles de fosfato (IP) en las células de la granulosa de rata hembra inmadura y en las células 293-hFSHR en respuesta al estímulo de hFSH, se realizó con la técnica descrita por Berridge y cols⁽¹⁴⁸⁾, la cual consistió en el cultivo de 100,000 células/pozo en medio DMEM/F12 sin inositol y bajo en glucosa (Gibco, BRL), a las que se le adicionó por 48 horas 4 μ Ci/ml de H³-mioinositol a 37°C (Amersham International). Posteriormente se removió el medio de cultivo marcado y las células se lavaron e incubaron por 15 minutos a 37°C con amortiguador de fosfatos suplementado con 10 mM de LiCl, 0.44 mM de CaCl₂, 3.5 mM de KCl, 0.5 mM de MgCl₂ y 1 g/l de glucosa. Transcurrido este tiempo, el amortiguador se removió y las células se incubaron por 1 hora en medio de cultivo que contenía 0.25 mM de MIX y en presencia o ausencia de diferentes dosis de hFSH. La reacción se detuvo con 1 ml de ácido perclórico al 5%. El medio resultante se centrifugó y el sobrenadante se aplicó a una columna de cromatografía de intercambio aniónico Dowex (Sigma Chemicals Co.). La resina Dowex se lavó previamente 2-3 veces con agua bidestilada eliminando las partículas finas y posteriormente se regeneró con NaOH 1 N, agua bidestilada, formato de amonio 1 M y agua bidestilada. Las columnas se equilibraron con EDTA 0.5 mM, Hepes 2.5 mM, pH 7.4. y posteriormente se adicionó la muestra. Para la recuperación de los inositoles de fosfato, inositol monofosfato (IP1), inositol difosfato (IP2) e IP3, se agregó formato de amonio 1 M/ácido fórmico 0.1 M. Las muestras fueron colectadas en viales de plástico, a las que se les adicionó líquido de centelleo. Después de su agitación por 1 minuto se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo de radiaciones β (Packard Instrument Company).

Análisis estadístico

Se utilizó el método de De Lean *et al*₍₁₄₉₎ para el cálculo del paralelismo de las pendientes obtenidas por las diferentes isoformas de hFSH y del estándar (LER-907) en los distintos inmunoensayos y bioensayos realizados.

Se empleó la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar las diferencias de la actividad biológica *in vitro* aparente entre las diferentes isoformas de hFSH y pruebas de "t" pareada con corrección de Bonferroni para definir diferencias estadísticamente significativas.

Para establecer la asociación entre el pH de elución de las isoformas de FSH y la correspondiente razón B/I ó RRA/I, se realizó un análisis de regresión lineal y la prueba de correlación de Spearman.

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

RESULTADOS

Aislamiento por CF de las isoformas de hFSH hipofisarias.

El aislamiento de las isoformas de hFSH se realizó por el método del CF, con una columna de dimensiones mayores a lo previamente informado^(3,4,10), con lo que se logró una excelente resolución y separación de las isoformas dentro de valores de pH desde >7.10 hasta <3.80 (Figura 3). Se efectuaron un total de 3 CFs con una recuperación final de hFSH del 79±4.0 % de la concentración inicial depositada en las columna. Se mezclaron las fracciones con un contenido elevado de FSH en la misma región, obteniendo 9 diferentes grupos de isoformas. La tabla 1 muestra los rangos y las medianas de pH de las isoformas separadas por el CF.

Tabla 1. Rangos y mediana de pH de cada grupo de isoforma hipofisaria de hFSH separadas por CF.

| Isoforma | rango de pH | mediana pH |
|----------|-------------|------------|
| I | >7.10 | 7.30* |
| II | 6.60-6.20 | 6.32 |
| III | 6.53-5.59 | 6.08 |
| IV | 6.14-5.53 | 5.71 |
| V | 5.47-5.10 | 5.26 |
| VI | 5.06-4.60 | 4.92 |
| VII | 4.76-4.12 | 4.43 |
| VIII | 4.05-3.82 | 3.93 |
| IX | <3.80 | 3.00* |

* Valores utilizados para el análisis estadístico.

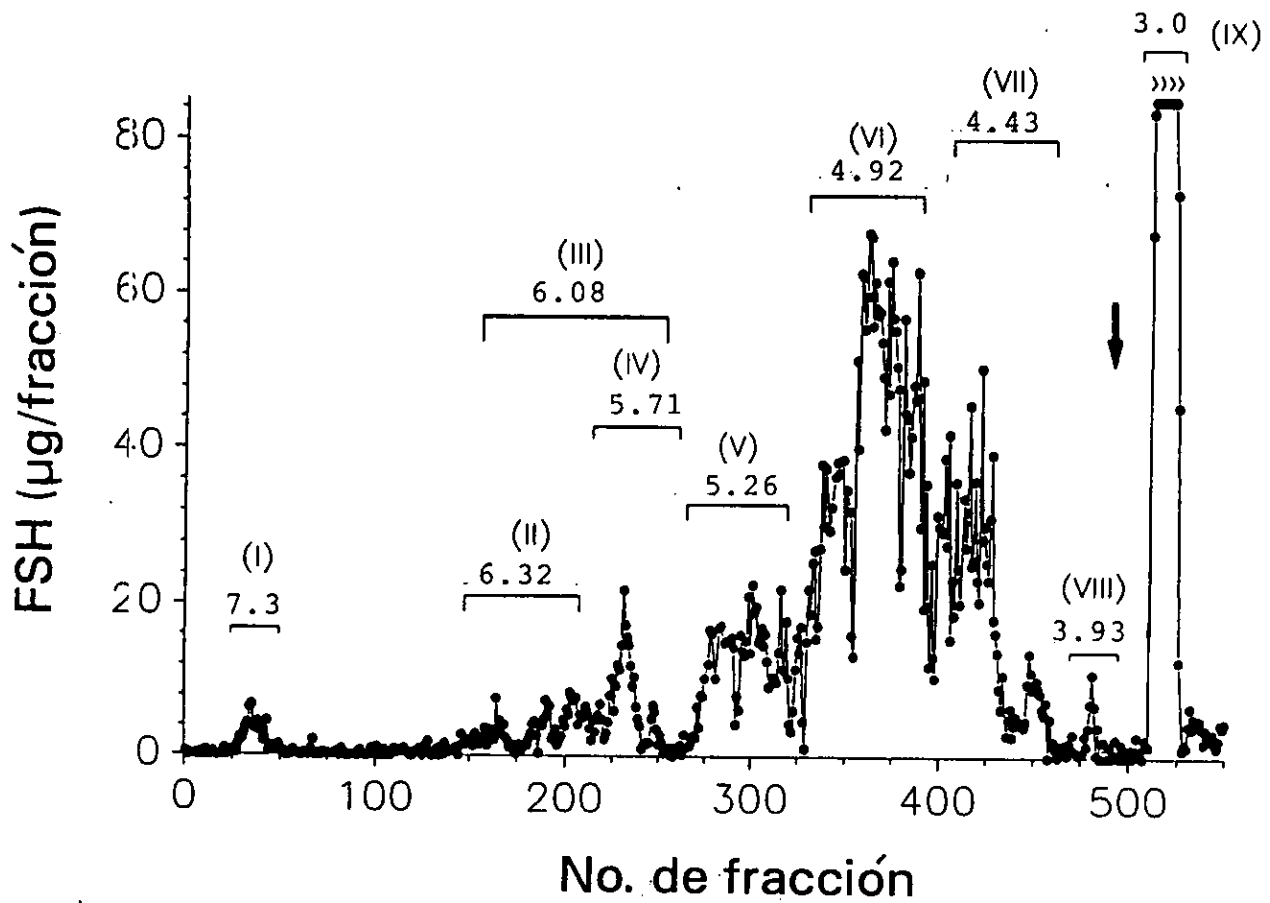


Fig 3. Patrón de distribución por pH de la FSH intrahipofisiaria después de su separación por CF en columnas de 90 x 1.5 cm.

Cuantificación inmunorreactiva de los concentrados hipofisarios de las isoformas de hFSH.

El contenido inmunorreactivo de la FSH en cada grupo de isoformas fue cuantificado a partir de 8 diferentes dosis y analizado por 3 métodos distintos: RIA, ELISA e IRMA. La figura 4 muestra las curvas de paralelismo de las isoformas de hFSH hipofisarias y del estándar LER-907 en los 3 inmunoensayos. Como se puede observar en las gráficas, todas las isoformas presentaron curvas dosis-respuesta paralelas entre sí y con el estándar en los 3 diferentes métodos empleados, a excepción de las isoformas del grupo I (con pH >7.10) el cual al ser analizado por ELISA no mostró paralelismo con las demás formas de hFSH, ni con la curva estándar.

La figura 5 muestra la relación entre cada uno de los inmunoensayos para cuantificar el contenido de FSH de las isoformas; en términos generales hubo resultados similares en la concentración inmunorreactiva de la hFSH para cualquiera de los métodos empleados, sin embargo, pese a la gran similitud de los resultados con los diferentes métodos inmunorreactivos, al realizar un análisis comparativo entre los valores obtenidos se encontró que había una sobrestimación o subestimación de la hFSH inmunorreactiva dependiendo del ensayo utilizado (Figura 5). Estas diferencias pudieron deberse a los distintos anticuerpos empleados y al reconocimiento particular de cada uno de éstos hacia la glicoproteína.

Bioensayos *in vitro*

- GAB

Los resultados del ensayo de aromatización de células de la granulosa de rata se muestran en la figura 6 en donde se observa la formación de estradiol a las 72 horas de cultivo en respuesta al estímulo con diferentes dosis de hFSH. Como se muestra en la gráfica, todas las isoformas de hFSH hipofisarias fueron capaces de inducir la producción de estradiol en forma dosis-dependiente, paralelas entre sí y con la curva del estándar LER-907.

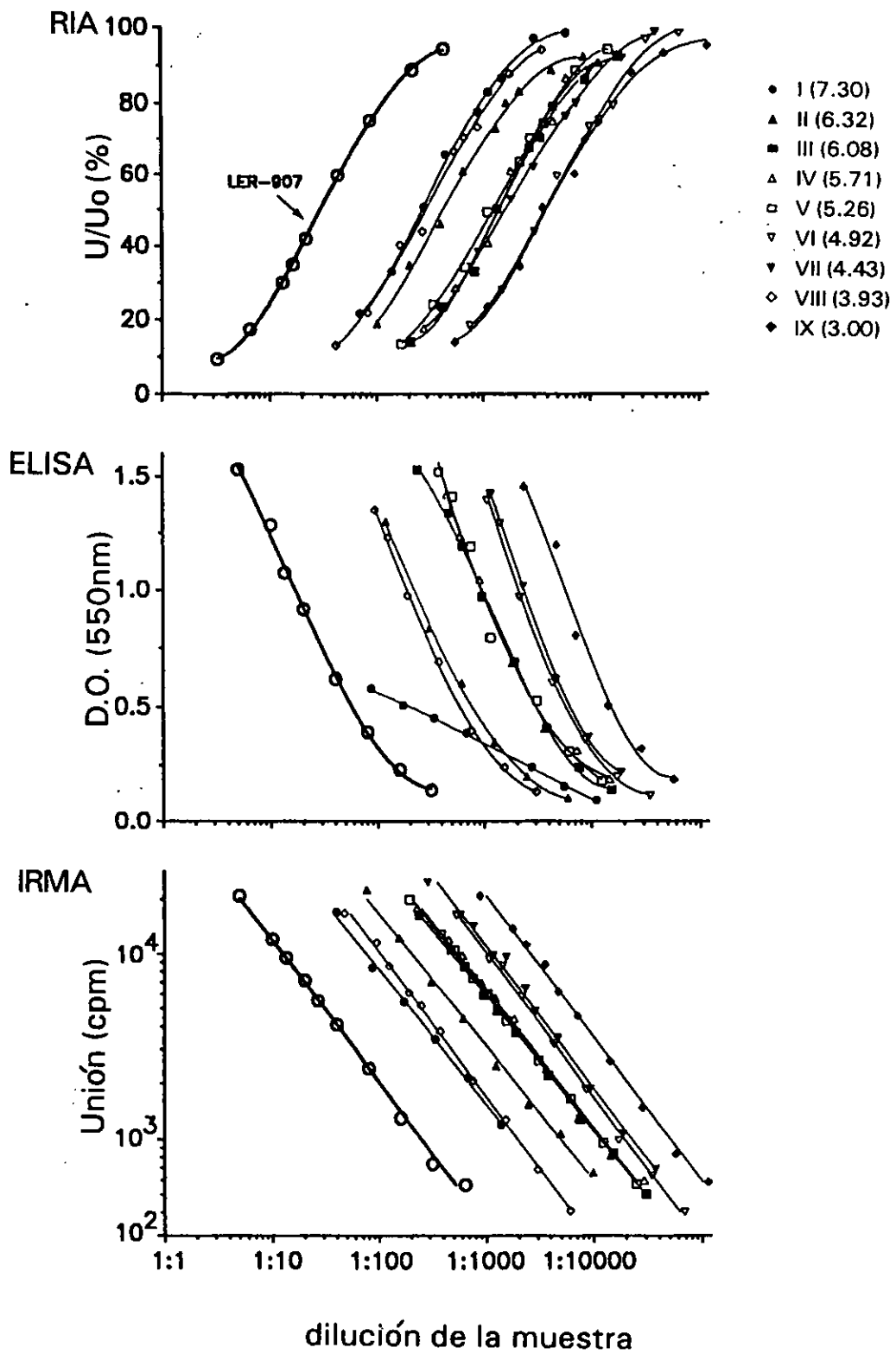


Fig 4. Curvas de paralelismo de las diferentes isoformas de hFSH hipofisaria en 3 sistemas de inmunoensayo.

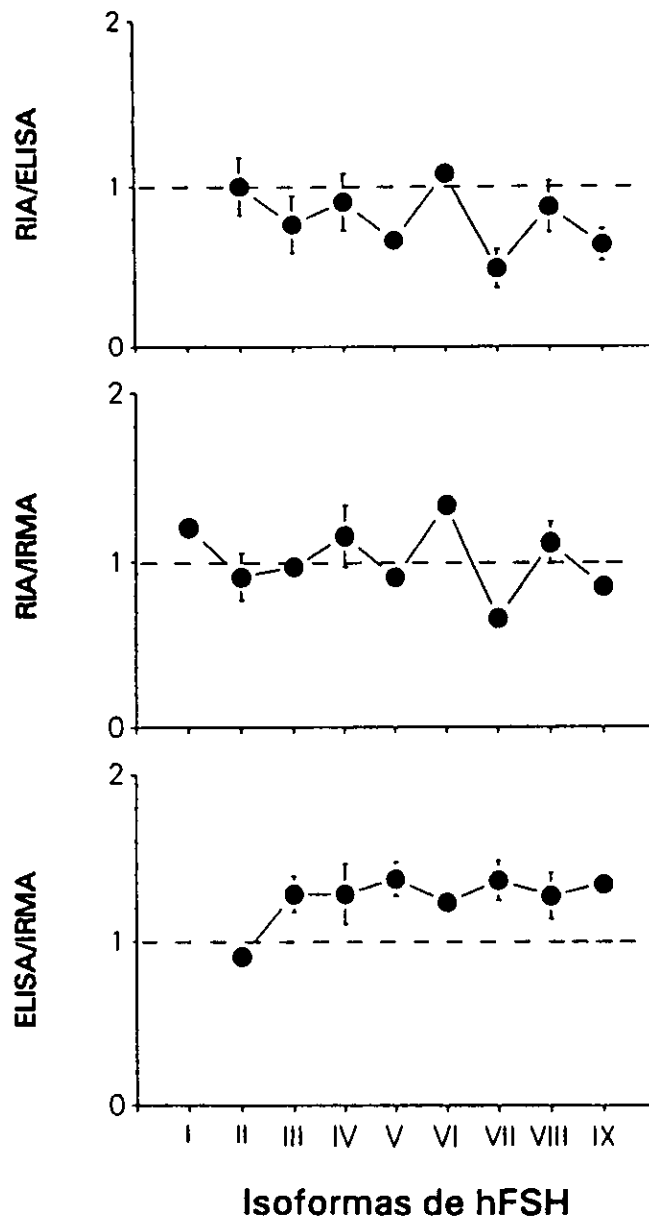


Fig 5. Relación entre los diferentes métodos inmunológicos empleados para la cuantificación de las formas moleculares de la hFSH hipofisiaria.

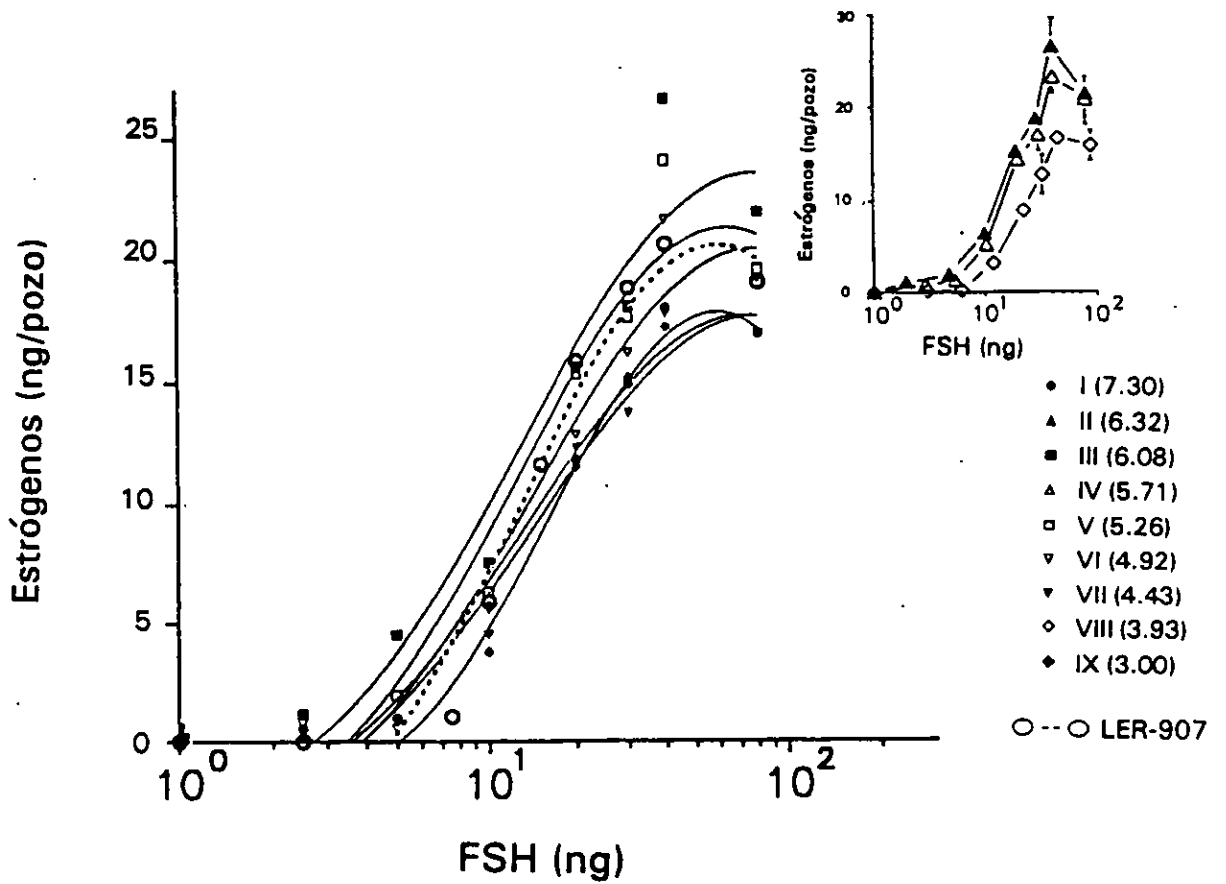


Fig 6i.

Capacidad de cada isoforma de la hFSH intrahipofisiaria para estimular la producción de estrógenos en células de la granulosa de rata en cultivo. El inserto en el borde superior derecho muestra las curvas dosis respuesta de las isoformas \blacktriangle II, \triangle IV y \diamond VIII.

- Bioensayo en las células 293-hFSHR

La figura 7 muestra la producción de AMPc por las células 293-hFSHR en respuesta al estímulo con diferentes dosis de isoformas de hFSH a las 24 horas de cultivo. Como se observa en la gráfica, todas las isoformas hipofisarias fueron capaces de inducir la formación de AMPc, siendo las curvas paralelas entre ellas y con el estándar LER-907.

Cuantificación de hLH y prolactina en los concentrados hipofisarias de las isoformas de hFSH.

Considerando que cada isoforma contiene cantidades variables de LH y de prolactina (hormonas que podrían ejercer un efecto estimulador o inhibidor sobre la producción de estrógenos en el GAB), se analizaron las concentraciones mínimas de éstas capaces de interferir en el bioensayo mencionado. Para la LH, la concentración mínima requerida para inducir aromatización fue de 1000 ng/pozo (2 µg/ml) en términos del estándar hLH-I-1 (NIADDK) en tanto que la concentración mínima de la prolactina para antagonizar los efectos de la FSH fue de 1.25 ng/pozo (2.5 ng/ml). Al cuantificar la concentración de LH y de prolactina (por RIA) en las diferentes preparaciones de las isoformas de hFSH hipofisaria, se encontró que éstas existían en cantidades extremadamente bajas para interferir con el GAB (equivalentes a < de 20 ng/ml de LH e indetectables de prolactina en el medio condicionado con las diferentes isoformas de hFSH). Por lo tanto se concluyó que no hubo interferencia de estas hormonas hipofisarias en el bioensayo.

Por otro lado, aún cuando las células 293-hFSHR no expresan receptores para la LH, se analizó el efecto de ésta en el sistema de bioensayo. La incubación de células 293-hFSHR con 0.25 ng a 10 µg de LH-I-1, no indujo ninguna respuesta celular en términos de producción de AMPc.

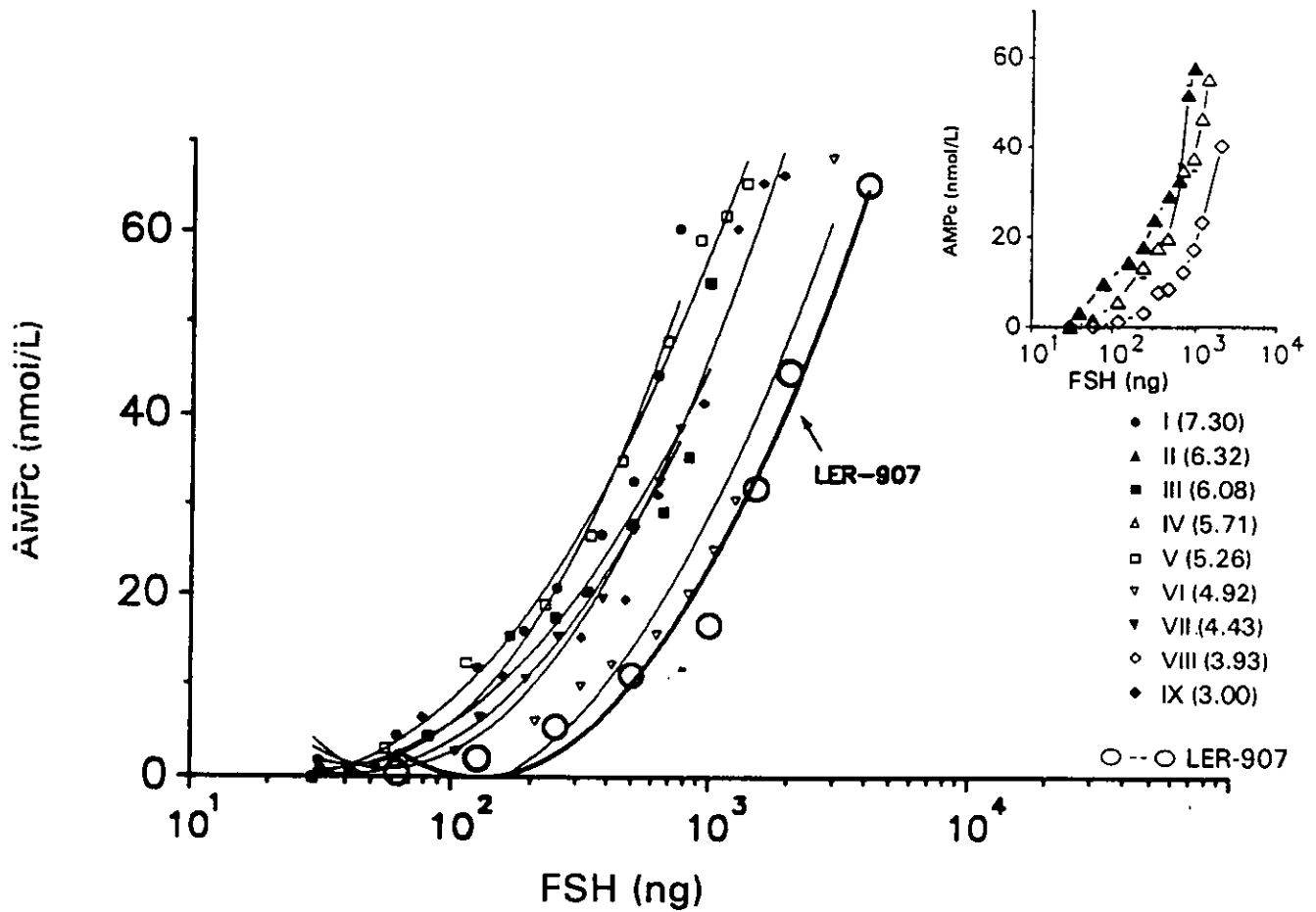


Fig 7. Capacidad de cada isoforma de la hFSH intrahipofisiaria para estimular la producción de AMPc en células de riñón fetal humano que expresan el receptor recombinante de hFSH. El inserto en el borde superior derecho muestra las curvas dosis respuesta de las isoformas \blacktriangle II, \triangle IV y \diamond VIII.

Razón Bioactividad/Inmunorreactividad

La actividad biológica *in vitro* de las isoformas de hFSH hipofisiarias, se obtuvo de los resultados de los dos bioensayos (Bioactividad) y de los 3 inmunoensayos (Inmunorreactividad) y fue expresada como la razón bioactividad/inmunorreactividad (B/I), en términos de cada uno de los 3 inmunoensayos: RIA (B/RIA), ELISA (B/ELISA) e IRMA (B/IRMA). La tabla 2 muestra la relación (B/I) de los dos bioensayos cuantificando la hFSH por RIA, ELISA e IRMA. La variabilidad en la concentración de las isoformas de FSH obtenidas por los inmunoensayos dio lugar a diferencias en las relaciones de B/I entre los 3 métodos (tabla 2). Los valores de la tabla muestran cómo la potencia biológica varió dependiendo del ensayo utilizado. Sin embargo, para cualquiera de los 2 sistemas empleados se encontró una correlación entre el pH de elución de las isoformas de hFSH y la razón B/I, siendo más potentes las isoformas menos ácidas con respecto a las ácidas (Tabla 2).

Con fines comparativos se decidió analizar la respuesta biológica de las isoformas dividiéndolas en grupos con un pH mayor a 4.5 y menor a 4.5. El valor de pH de 4.5 como punto de corte fue establecido con base en las diferencias en actividad biológica *in vitro* y vida media plasmática presentadas por las isoformas intrahipofisiarias y séricas de trabajos previos^(3,4).

Como se muestra en la figura 8, para ambos bioensayos, la bioactividad relativa *in vitro* de las formas menos ácidas (pH>4.5) fue mayor que la de las formas más ácidas (pH<4.5).

Tabla 2. Razón Bioactividad/Inmunorreactividad (B/I) de las diferentes isoformas de hFSH hipofisarias

| Isoforma (pH) | FSH B/I | | | | | |
|---------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | GAB | | | Células 293-hFSHR | | |
| | B/RIA | B/ELISA | B/IRMA | B/RIA | B/ELISA | B/IRMA |
| I (7.30) | 0.86±0.02 ^{ae} | - | 1.03±0.05 ^{acef} | 3.9±0.1 ^a | - | 4.7±0.2 ^{ag} |
| II (6.32) | 1.32±0.1 ^b | 1.31±0.1 ^a | 1.31±0.1 ^b | 3.5±0.2 ^b | 3.4±0.2 ^a | 3.2±0.2 ^b |
| III (6.08) | 1.19±0.05 ^{bcφ} | 0.90±0.04 ^{bd} | 1.18±0.05 ^{ab} | 2.7±0.2 ^{cφ} | 2.1±0.1 ^{bd} | 2.7±0.2 ^c |
| IV (5.71) | 1.14±0.1 ^{cd} | 1.03±0.05 ^{bd} | 1.24±0.08 ^b | 2.2±0.1 ^{de} | 2.0±0.1 ^{bd} | 2.6±0.1 ^{ce} |
| V (5.26) | 1.01±0.02 ^{adφ} | 0.67±0.02 ^{da} | 0.92±0.03 ^f | 3.2±0.2 ^{bφ} | 2.1±0.1 ^{bd} | 2.9±0.2 ^{cb} |
| VI (4.92) | 0.87±0.02 ^{aeφ} | 0.97±0.02 ^{bd} | 1.14±0.01 ^{abφ} | 1.4±0.1 ^f | 1.5±0.1 ^{ca} | 1.8±0.1 ^{de} |
| VII (4.43) | 0.72±0.03 ^{efφ} | 0.35±0.01 ^{ed} | 0.48±0.02 ^{de} | 2.5±0.05 ^{ceφ} | 1.2±0.03 ^{cd} | 1.7±0.04 ^{de} |
| VIII (3.93) | 0.64±0.01 ^φ | 0.56±0.01 ^{df} | 0.72±0.02 ^{ef} | 0.89±0.02 ^{gh} | 0.77±0.02 ^{da} | 1.0±0.02 ^{ef} |
| IX (3.00) | 0.77±0.1 ^{ef} | 0.48±0.05 ^{ef} | 0.65±0.1 ^{de} | 2.1±0.02 ^{gh} | 1.2±0.04 ^{cd} | 1.8±0.1 ^{de} |
| r | 0.70 | 0.81 | 0.73 | 0.98 | 0.89 | 0.88 |
| | p=0.03 | p=0.09 | p=0.02 | p<0.01 | p<0.01 | p<0.01 |

GAB = Bioensayo de aromatización de células de la granulosa; 293-hFSHR = bioensayo en el que se cuantificó AMPc. Las letras que son diferentes en la misma columna señalan las diferencias estadísticamente significativas entre las distintas isoformas de hFSH, (p<0.05). φ p<0.05 vs B/ELISA, & p<0.05 vs B/IRMA, ζ p<0.05 vs B/RIA. r = correlación de Spearman.

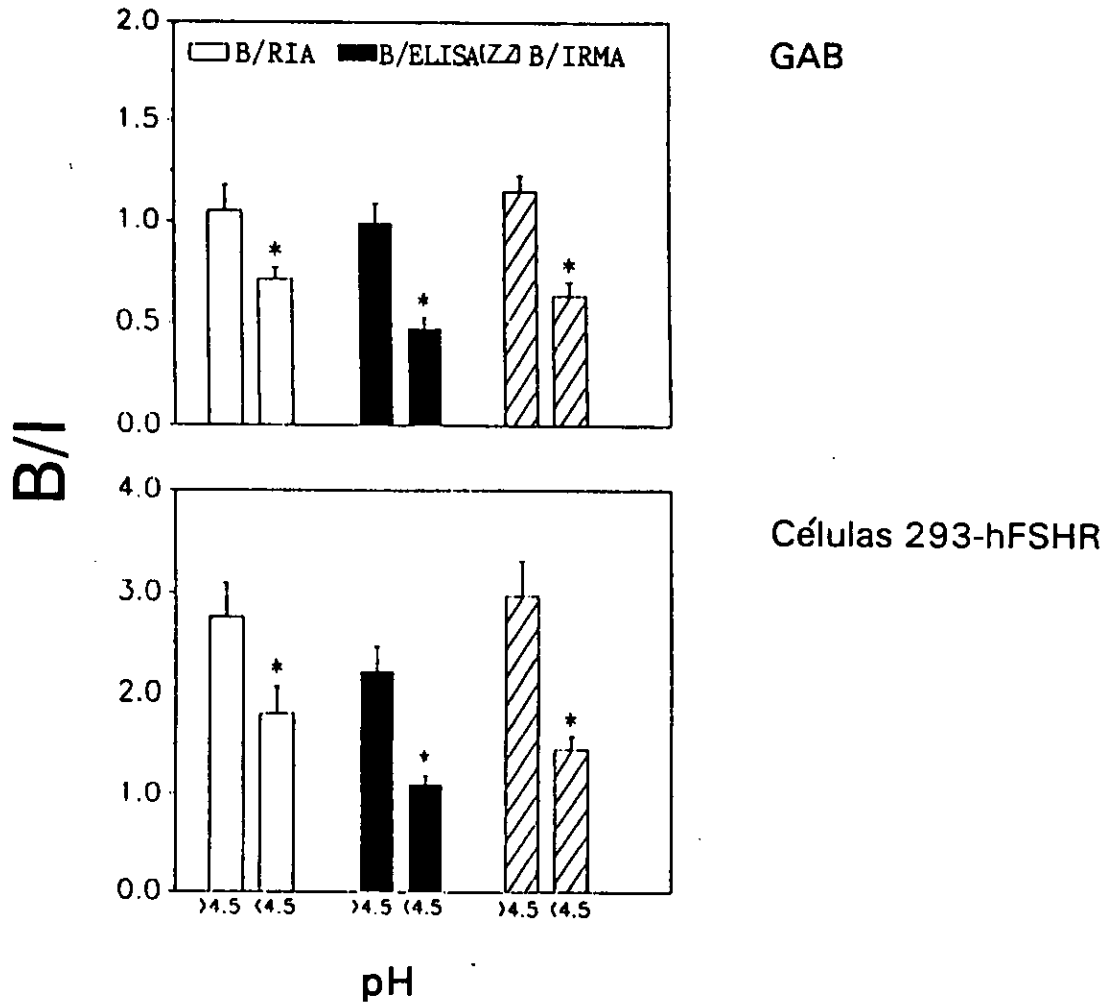


Fig 8. Razón Bioactividad/Inmunorreactividad (B/I) de las isoformas de la hFSH intrahipofisaria con un pH >4.5 y <4.5 en el GAB y en las células 293-hFSHR.

Cinética de tiempo de la producción de AMPc y E₂ en el cultivo de las células de la granulosa de rata.

La figura 9 muestra la producción de AMPc a las 24 y 48 horas de cultivo celular de granulosa de rata en respuesta al estímulo de diferentes dosis de cada uno de los grupos de isoformas de hFSH. Como se puede observar en la figura 9 la mayor producción de AMPc se alcanza a las 48 horas para casi todas las isoformas (a excepción de las isoformas del grupo VIII).

La figura 10 muestra la producción de E₂ a las 24, 48 y 72 horas de cultivo celular de granulosa de rata en respuesta al estímulo de diferentes dosis de cada uno de los grupos de isoformas de hFSH. Como se puede observar en la figura 10, la máxima producción de E₂ se alcanzó a las 48 horas o a las 72 horas, dependiendo de la isoforma de hFSH de la que se trate.

Ensayos de unión al receptor

El ensayo de unión al receptor fue un ensayo por competencia con hFSH-I¹²⁵ y las diferentes isoformas hipofisarias de hFSH en los distintos tipos celulares. Todas las isoformas presentaron curvas dosis-respuesta paralelas con la curva del estándar en los tres modelos empleados, células de la granulosa de rata, membranas de testículo de rata y células 293-hFSHR. Se calculó la razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/RIA) para los tres tipos celulares con las diferentes dosis de las isoformas de hFSH, lo cual se muestra en las figuras 11, 12 y 13.

Como muestran las gráficas la correlación entre el pH de elución de las isoformas y la relación RRA/I para las células de la granulosa y para la membrana de testículo fue cercana a uno, 0.888 y 0.762 respectivamente, no así en las células 293-hFSHR ($r=0.277$) en donde no encontramos una correlación entre la RRA/I y el pH de elución de las isoformas. Es posible observar una mayor afinidad para el grupo de isoformas menos ácidas con respecto a las más ácidas en los radiorreceptores realizados con las células de la granulosa y las membranas de testículo de macho, ambos proveniente de rata.

Se excluyó de estas gráficas y del cálculo de la correlación entre la razón RRA/I y el pH al grupo de isoformas I (pH>7.1) por presentar un comportamiento muy distinto con respecto a las demás isoformas.

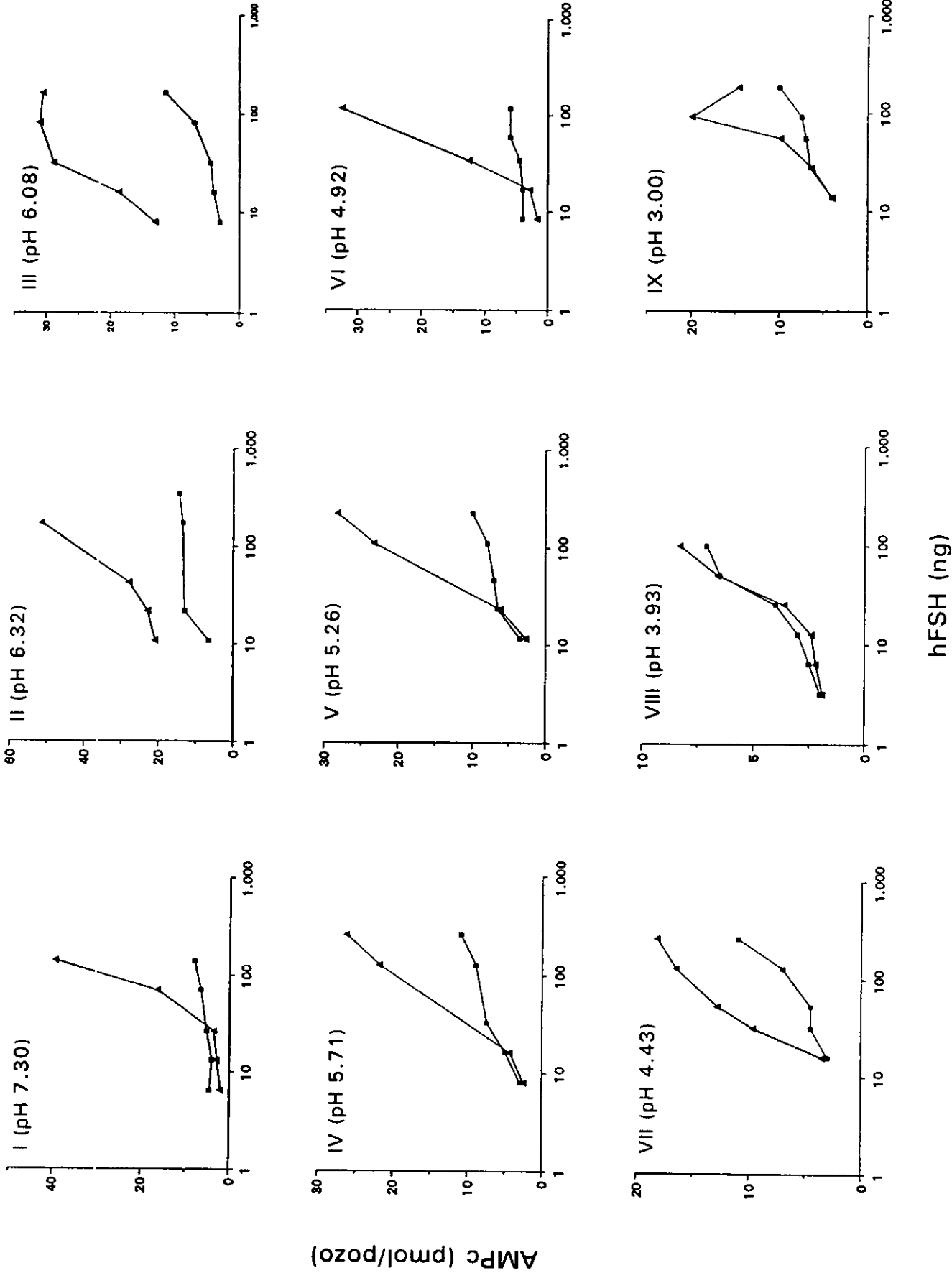


Fig 9. Producción de AMPc a las 24 y 48 horas de cultivo en las células 293-hFSHR bajo el estímulo de diferentes isoformas de hFSH. 52

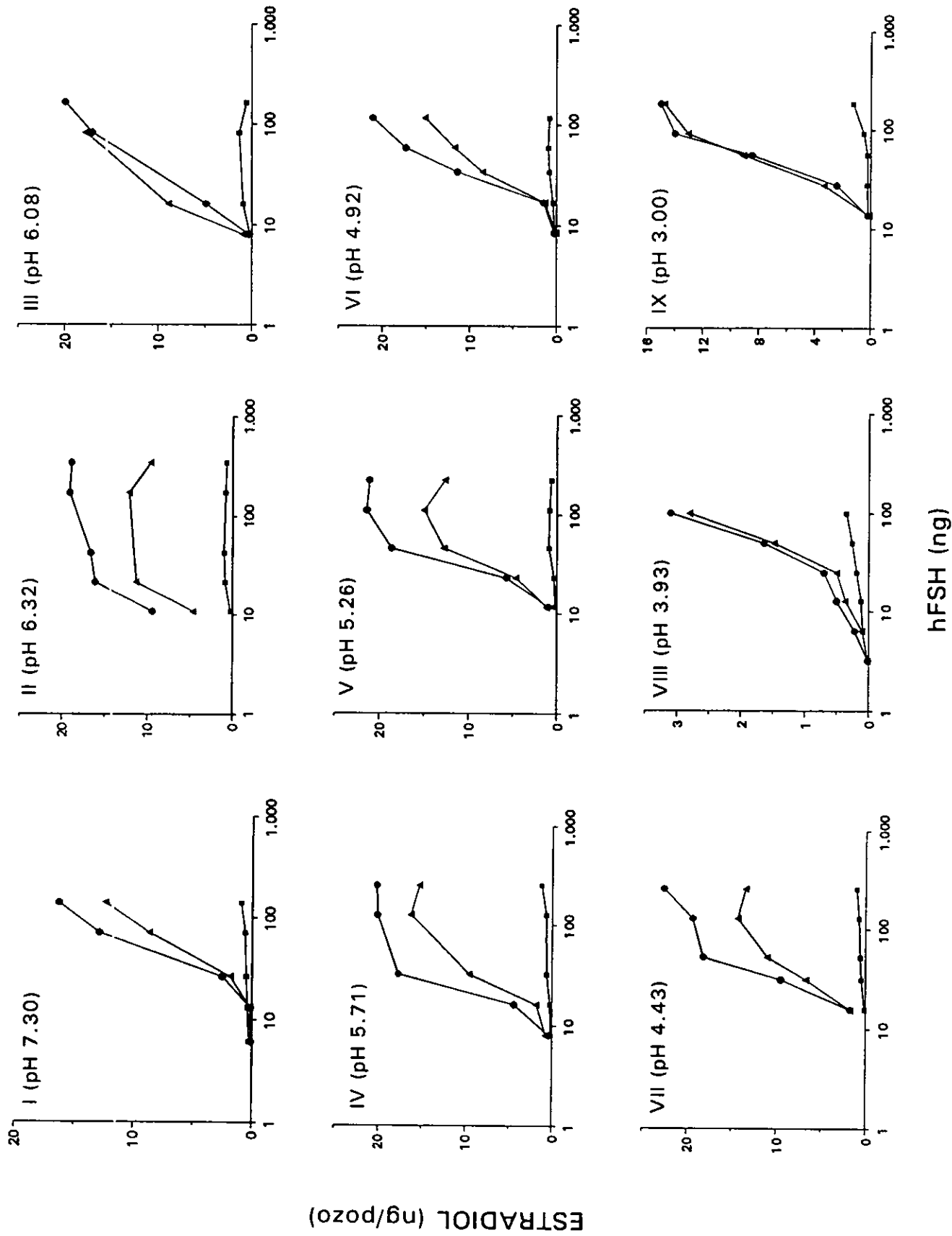


Fig 10 . Producción de estradiol a las ■ 24, ▲ 48 y ● 72 horas en cultivo de las células de la granulosa de rata estimuladas con las diferentes isoformas de hFSH intrahipofisaria.

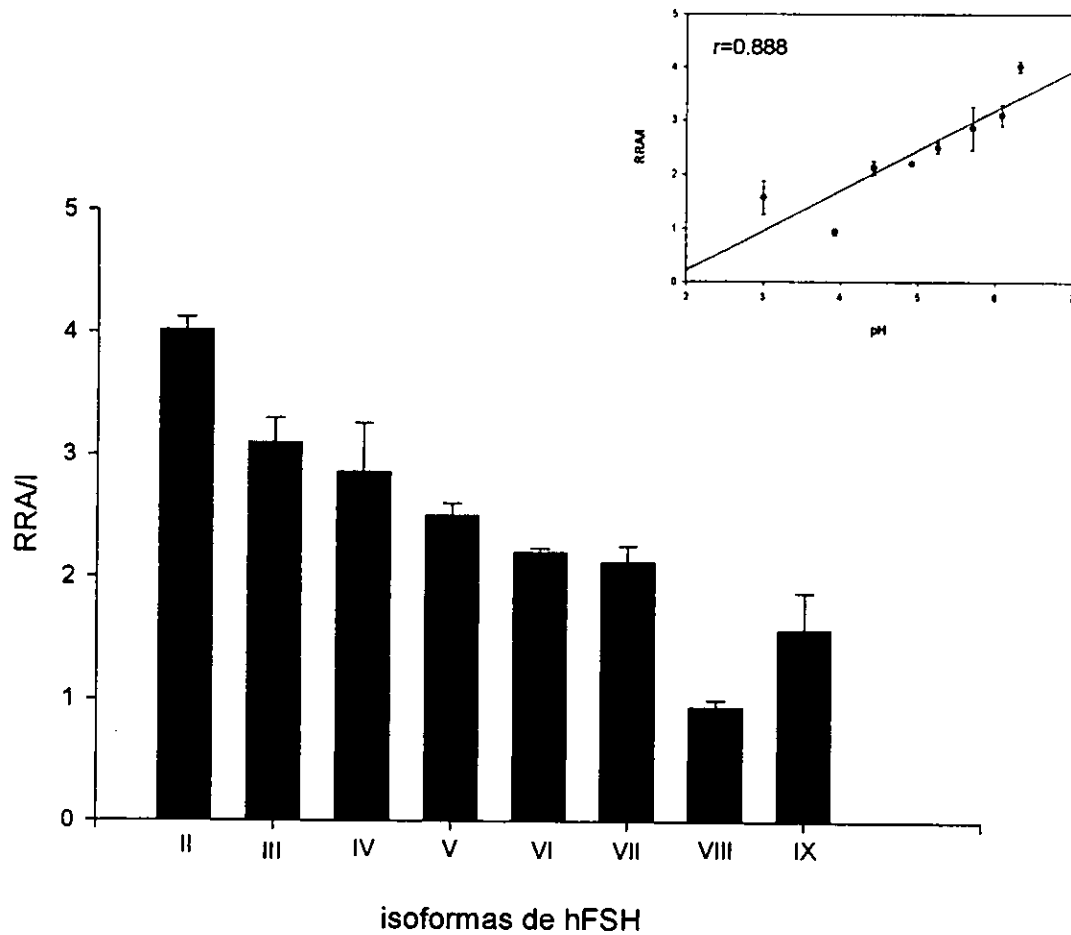


Figura 11. Razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisarias en las células de la granulosa de rata y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I.

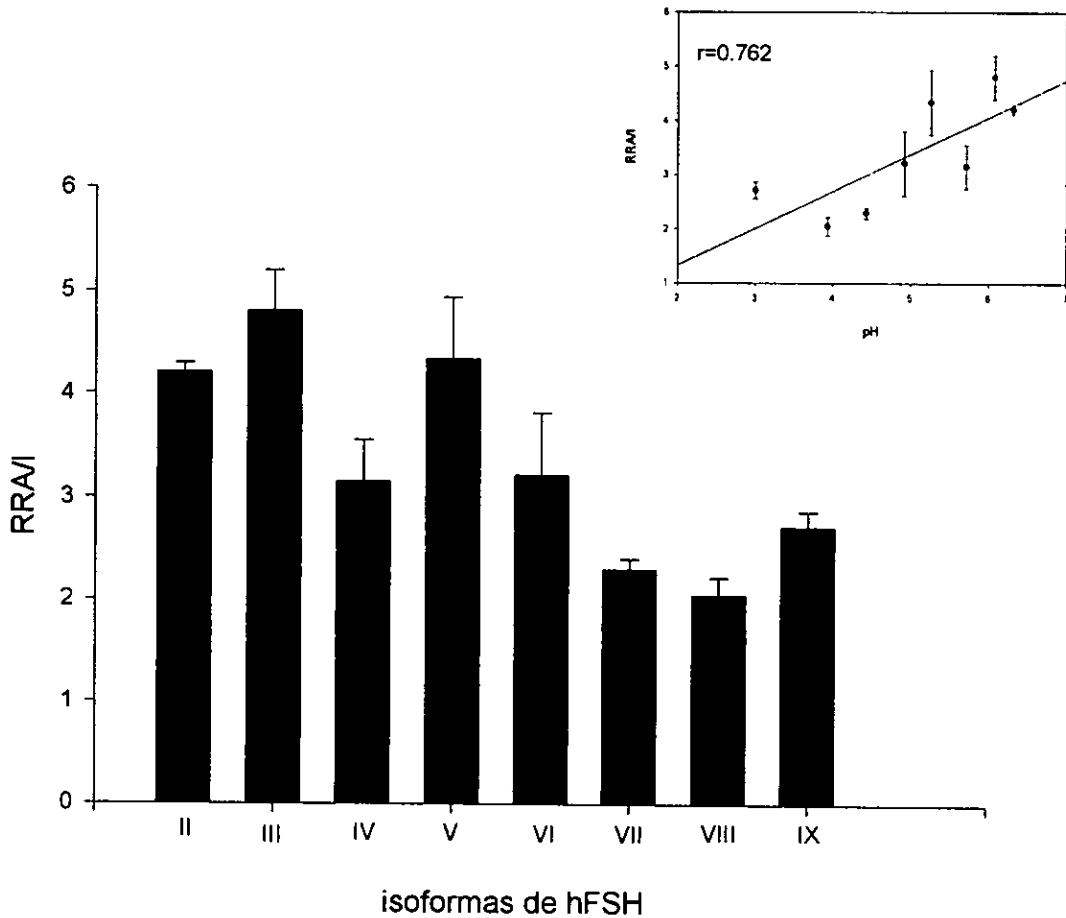


Figura 12. Razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisarias en membranas de testículo de rata y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I.

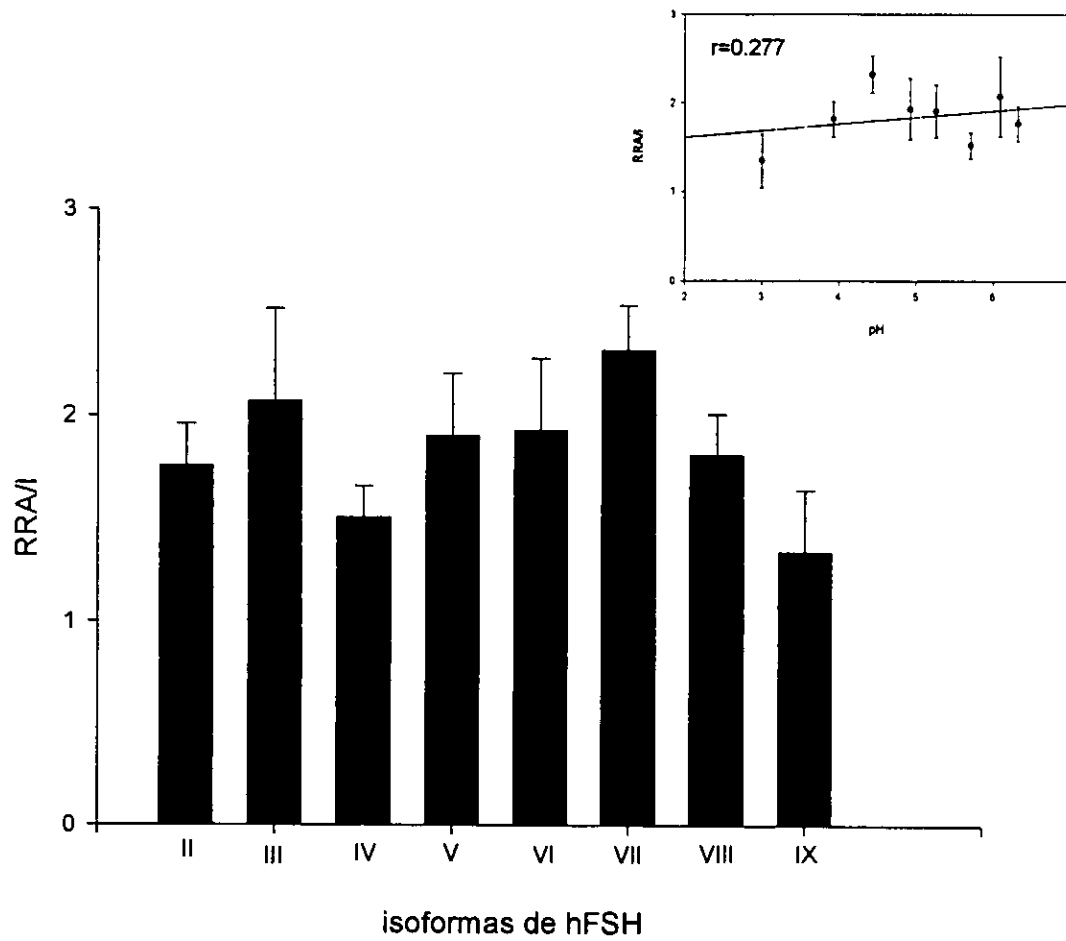


Figura 13. Razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisiarias en las células 293-hFSHR y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I.

Producción de IP.

Para la determinación de los inositoles de fosfato (IP), tanto en las células de la granulosa de rata hembra inmadura como en las células 293-hFSHR, se obtuvo una respuesta mínima en términos de producción de IP con diferentes dosis del estándar (LER-907) de FSH (datos no mostrados), por lo que no se realizó la prueba para las diferentes isoformas de FSH.

DISCUSION

La presente tesis examinó las diferencias entre las isoformas hipofisarias de la FSH en su unión al receptor así como en su capacidad para inducir la transducción de señal aralizada a través de la generación de AMPc y de una respuesta tardía como es la activación de la aromatasa. Los resultados mostraron que todas las isoformas de FSH obtenidas por diferencia de carga, fueron capaces de inducir una respuesta dosis dependiente en los dos bioensayos empleados. El primero de ellos se realizó con células de la granulosa y consistió en analizar la capacidad de la FSH para inducir la formación de AMPc, así como la aromatización de andrógenos en el cultivo celular; las células fueron obtenidas de ratas inmaduras pretratadas con DES y la hormona estudiada fue de naturaleza humana, por lo que el sistema fue heterólogo. El segundo bioensayo, fue homólogo y consistió en la cuantificación del AMPc producido después de la estimulación con las isoformas de FSH en las células 293-hFSHR. Para descartar las posibles interferencias en el análisis de los resultados como consecuencia de los diferentes reconocimientos de anticuerpos a la especificidad del epítotope, la concentración de las isoformas de FSH fue analizada por tres diferentes inmunoensayos, los cuales utilizaron distintos tipos de anticuerpos monoclonales y policlonales. La razón B/I se estableció como el índice de la relativa actividad biológica *in vitro* de cada isoforma, expresada en términos de cada uno de los inmunoensayos.

La isoforma menos ácida (con un valor de pH >7.1), aunque sí presentó una curva de desplazamiento dosis-dependiente paralela a la curva estándar y a las demás isoformas en los métodos de IRMA y RIA y por lo tanto pudo ser cuantificada por ambos inmunoensayos, fue detectada pobremente por el método de ELISA (figura 4). Con respecto a este grupo de isoformas con pH más básicos, se sabe por estudios de unión a diferentes lectinas que además de contener una baja cantidad de ácido siálico, tienen una mayor proporción de manosas y oligosacáridos de cadena híbrida, mientras que las formas más ácidas contienen oligosacáridos de estructura compleja⁽¹⁵⁰⁾. El hallazgo de que la isoforma menos ácida no haya podido ser reconocida adecuadamente por el ELISA, podría deberse a una disminución en la inmunogenicidad de la molécula hacia los anticuerpos monoclonales del sistema, dada su particular glicosilación. De hecho, se acepta en la actualidad que los oligosacáridos incorporados en las moléculas de estructura compleja, juegan un papel importante

como epítopes para anticuerpos de esta especificidad, como lo son los de tipo monoclonal.

A pesar de que todas las isoformas (a excepción de la isoforma I) mostraron curvas dosis-respuesta, paralelas entre sí y con la del estándar en los tres inmunoensayos, hubo variaciones significativas en la razón B/RIA, B/ELISA y B/IRMA dentro de la misma isoforma, lo que implica que los distintos inmunoensayos reconocieron en mayor o menor grado algunas de las isoformas. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en la cuantificación inmunológica de las isoformas, fue claro que para ambos bioensayos (tanto el GAB, como el realizado con las células 293-hFSHR) la mayor actividad biológica *in vitro* la presentaron las isoformas menos ácidas y la menor las más ácidas, independientemente del inmunoensayo empleado para analizarlas. Estos resultados concuerdan con lo informado para otras especies tales como el mono y algunos roedores^(48,65,66,85,151). Difieren, sin embargo, con los obtenidos por otros investigadores quienes afirman que no existe una correlación entre la potencia biológica *in vitro*, la unión al receptor y la carga relativa de las isoformas^(7,8,9). Las discrepancias entre estos estudios pudiera deberse a algunas variables en las metodologías empleadas como por ejemplo la técnica de fraccionamiento por carga de la FSH₍₈₎ o el método para calcular la potencia relativa de las isoformas⁽⁹⁾. Es importante mencionar que a pesar de que existe controversia con respecto a si hay o no correlación entre la actividad biológica de las isoformas de FSH y su carga relativa, uno de los objetivos de esta tesis fue precisamente analizar la respuesta de las isoformas de FSH en diferentes modelos biológicos, considerando varios parámetros de respuesta (unión al receptor, generación de AMPc, aromatización) y correlacionar estas respuestas con la inmunogenicidad de las mismas para poder de esta forma descartar posibles interferencias en la interpretación de los resultados dados por diferencias en la especificidad de los anticuerpos empleados en su cuantificación.

A pesar de que en los dos tipos de bioensayos realizados se estableció que a una mayor acidez de las isoformas de FSH había una menor actividad biológica *in vitro*, se lograron observar algunas diferencias aparentes entre los resultados generados por los dos sistemas celulares. En el caso del ensayo con las células humanas, la razón B/I obtenida por cada grupo de isoformas fue mayor (2 a 3 veces) que las dadas por el método de la células de rata, lo cual podría ser explicado por la mayor homología entre el ligando y el receptor⁽¹⁵²⁾. Por otro lado, la isoforma más básica (I) mostró una mayor

razón B/I en el ensayo humano que en el GAB. Este grupo de isoformas, pobremente sializadas, tienen una estructura de oligosacáridos marcadamente diferente a las formas más ácidas^(68,85), por lo que esta variación en la composición de oligosacáridos podría ocasionar diferencias en la afinidad de las isoformas por los 2 receptores o conferirle ciertas particularidades en su capacidad para activar diversas señales de transducción^(35,39,139).

Los resultados obtenidos en los dos bioensayos, en donde se observa una tendencia clara entre el pH de elución de la hormona y su potencia biológica relativa, expresada en términos del cociente B/I, siendo mayor en las formas menos ácidas y menor en las más ácidas, también coinciden con lo informado para las isoformas de FSH humana obtenidas de preparaciones de FSH recombinante y de FSH urinaria^(5,6,153-155). Inclusive en uno de estos estudios⁽⁶⁾, al analizar la potencia biológica *in vitro* de la FSH humana recombinante por medio del GAB, se encontró que la forma menos ácida presentaba un decremento en la actividad biológica, resultados similares a los presentados en esta tesis (figura 6, tabla 2).

Como ya se demostró previamente, la distribución por carga de la FSH varía dependiendo del ambiente endócrino presente en el donador al momento de la obtención de la muestra. Por ejemplo, la FSH circulante humana tiene una distribución por carga que varía dependiendo de la fase del ciclo menstrual^(10,13,67). Específicamente, la secreción de isoformas con pH mayor a 4.5 se incrementa significativamente durante la fase preovulatoria, momento en el cual el estradiol se incrementa y la hipófisis se encuentra más sensible al GnRH⁽¹⁰⁾. El hallazgo de que las isoformas intrahipofisarias menos ácidas muestren un incremento en su potencia biológica relativa *in vitro*, acompañado del hecho de que casi no sufren modificaciones una vez que son secretadas a la circulación, sugiere fuertemente que la producción y secreción de formas menos ácidas durante el ciclo menstrual podría ser un mecanismo importante para regular la intensidad del estímulo de la FSH durante las fases finales de la maduración folicular.

En relación a los ensayos por competencia de unión al receptor (RRA), se utilizaron 3 diferentes modelos: células de la granulosa de rata hembra pretratada con DES, membranas de testículo de rata macho adulta y células 293-hFSHR. Se encontró una correlación entre el pH de elución de las isoformas hipofisarias de FSH y la razón

RRAVI para los ensayos con las células de la granulosa y con las membranas de testículo, ambos provenientes de rata y no se obtuvo la misma correlación para las células 293-hFSHR, las cuales son de origen humano. Estos resultados sugieren que para la unión al receptor interviene tanto la naturaleza y la estructura química del receptor como el tipo de isoforma de FSH, en donde probablemente jueguen un papel relevante la composición de carbohidratos unidos a la molécula y la estructura peptídica. Si bien no se han detectado aún diferentes isoformas de receptor para la FSH en la rata, si se han informado distintos transcritos del receptor, y éstos parecen variar en su concentración dependiendo de la fase del ciclo estral en el que se encuentre el animal⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁹⁾. Los resultados sugieren que probablemente exista una población heterogénea de receptores con diferente afinidad para las distintas isoformas de FSH. Es factible que la ausencia de correlación entre el pH de la isoforma y la razón RRAVI en las células 293-hFSHR se deba a que en estas células únicamente existe una población homogénea de receptores, los cuales al parecer tienen igual afinidad por las distintas isoformas de FSH, independientemente de que cada una de ellas desencadene respuestas celulares de magnitud variable.

Con respecto a los estudios del análisis de producción de los inositoles en respuesta al estímulo de la hFSH en las células de la granulosa de rata inmadura y en las 293-hFSHR, los resultados mostraron que el incremento de este mensajero intracelular fue muy bajo en ambos tipos celulares. Los informes en la literatura afirman que el receptor de FSH humano, a diferencia del de la rata⁽¹²⁴⁾, tiene una muy débil respuesta en la vía de la PLC- β ⁽¹⁶⁰⁾. Los resultados obtenidos en esta tesis coinciden con lo informado por otro grupo de investigadores⁽¹⁶⁰⁾, los cuales demostraron que la producción de inositoles fue mínima en las células 293-hFSHR después del estímulo con FSH. La diferencia entre los resultados obtenidos en la presente tesis y el estudio mencionado consistió en que en nuestro caso las células 293-hFSHR mostraron una mayor respuesta en términos de producción de IP3 debido principalmente a las altas dosis de hFSH empleadas. En relación a los resultados obtenidos con las células de la granulosa de rata, después del estímulo con la FSH se obtuvo un mínimo incremento del IP3, datos que no concuerdan con los de la literatura⁽¹²⁴⁾ en donde se ha observado un incremento significativo en la acumulación de los inositoles después del estímulo con FSH. La diferencia de estos hallazgos con los informados en la presente tesis podría deberse a que la hormona con la cual se realizó este estudio fue de naturaleza

humana mientras que en los estudios previamente informados utilizaron un estímulo homólogo.

Estos resultados permiten concluir que en nuestro modelo, a diferencia de la vía de la adenilato ciclasa en la cual a bajas dosis de FSH se genera una respuesta elevada en la producción de AMPc, para activar la vía de la PLC- β se requiere de dosis altas de FSH, por lo que la naturaleza exacta del mensajero intracelular involucrado en la hidrólisis de los fosfoinositoles en respuesta a la activación del receptor de la FSH es aún desconocida. Cada una de las isoformas de FSH podría no solo tener una diferente afinidad por el mismo receptor, sino también inducir cambios conformacionales particulares en el receptor, de tal forma que se activan diversas cascadas de mensajeros culminando en una respuesta celular diferente.

La hipófisis anterior tiene la capacidad de modificar tanto la cantidad como la calidad de la FSH secretada, estos cambios son regulados a través de la interacción concertada entre la hipófisis, la gónada y el hipotálamo. El nivel más importante del control parece ser a nivel hipofisiario en donde dependiendo del estado endócrino, la hipófisis preferencialmente produce y secreta diferentes tipos de FSH: más potente pero con vida media más corta, o mayor vida media pero menos activa biológicamente. Desde esta perspectiva, la heterogeneidad de la FSH serviría como un mecanismo muy fino de regulación adicional para el control de la función gonadal. La distribución final de las gonadotropinas en la circulación es el resultado de la acción de varios factores de origen hipotalámico y gonadal por lo que su regulación es multifactorial y compleja. Si la heterogeneidad es importante biológicamente para la regulación de diversos procesos, es posible que las isoformas de FSH tengan diferentes funciones, por ejemplo, las isoformas de menor biopotencia pero mayor vida media podrían estar más involucradas en el crecimiento y mantenimiento de los órganos reproductores⁽¹⁶¹⁾; mientras que las isoformas de mayor potencia y menor vida media podrían estar implicadas en eventos agudos, como el inicio de la pubertad y la ovulación.

Aparentemente, la heterogeneidad de la FSH juega un papel crucial en los mecanismos reguladores de la función reproductiva. Solamente cuando se defina la importancia de la variabilidad en la estructura de las diversas isoformas de FSH será

posible entender con mayor precisión los mecanismos de regulación de diversos procesos fisiológicos.

CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* todas las isoformas intrahipofisarias de hFSH aisladas mediante CF, fueron capaces de inducir una respuesta biológica

La mayor actividad biológica *in vitro* fue dada por las isoformas de hFSH menos ácidas y la menor por las más ácidas tanto para el GAB como para el bioensayo con las células 293-hFSHR.

Las isoformas de hFSH menos ácidas tuvieron una mayor razón RRA/I con respecto a las formas más ácidas en los radiorreceptores realizados con células de la granulosa y membranas de testículo de rata.

Las distintas isoformas hipofisarias de hFSH presentaron igual razón RRA/I en los radiorreceptores realizados con las células de riñón fetal humano (293) transfectadas con el receptor recombinante de hFSH.

La naturaleza exacta del transductor involucrado en la hidrólisis de los fosfoinositoles en respuesta a la activación del receptor de la FSH es aún desconocida.

REFERENCIAS

1. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. 1983. Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 4:179-211.
2. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, Chappel SC. 1988. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod*, 3:491-501.
3. Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V. 1992. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Human Reprod*, 7:23-30.
4. Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura M, 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 Reprod*, 7:1371-1378.
5. Cerpa-Poljak A, Bishop La, Hort YJ, Chin CKH, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. 1993. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology*, 132:351-356.
6. Flack MR, Bennet AP, Froehlich J, Anasti JN, Nisula B. 1994. Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:756-760.
7. Stanton PG, Robertson DM, Burgon PG. 1992. Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*, 130:2820-2832.
8. Simoni M, Jockenhövel F, Nieschlag E. 1994. Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J Endocrinol*, 141:359-367.
9. Burgon PG, Robertson DM, Stanton PG, Hearn MTW. 1993. Immunological activities of highly purified isoforms of human FSH correlate with *in vitro* bioactivities. *J Endocrinol*, 139:511-518.
10. Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Diaz-cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. 1995. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoforms distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:1647-1656.
11. Wide L. 1982. Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*, 55:682-688.
12. Wide L, Naesspen T. 1994. 17 β -estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40:783-789.

13. Wide L, Bakos O. 1993. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:885-889.
14. Magner JA. 1990. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocr Rev*, 11:354-385.
15. Davies AG. 1981. Role of FSH in the control of testicular function. *Arch Androl*, 7:97-108.
16. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5:76-128.
17. Husa RO. 1980. Biosynthesis of human chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*, 1:268-294.
18. Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem*, 50:465-495.
19. Baenziger JU, Green ED. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim et Biophys Acta*, 947:287-306.
20. Fiddes JC, Goodman HM. 1979. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281:351-356.
21. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*, 11:177-199.
22. Combarnous I. 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 13:670-691.
23. Lustbader JW, Yarmush DL, Birken S, Puett D, Canfield RE. 1993. The application of chemical studies of human chorionic gonadotropin to visualize its three dimensional structure. *Endocr Rev*, 14:291-311.
24. Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. 1975. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil*, 45:559-566.
25. Greenwald GS, Terranova PF. 1988. Follicular selection and its control. In: Knobil E, Neill J (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd, New York, pp:387-445.
26. Richards JS. 1979. Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog Horm Res*, 35:343-373.
27. Yen SSC, Jaffe R. 1991. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. W B Saunders Co. 3a ed USA, pp:75-108, 115-133, 140-150, 273-308.
28. Jia XC, Hsueh AJW. 1986. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 119:1570-1577.
29. Spratt DI, O'Dea LSL, Schoenfeld D, Butler J, Rao PN, Crowley F. 1988. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol*, 254:E658-E666.

30. Robertson DM, Cahir N, Findaly JK, Burger HG, Groome N. 1997. The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:889-896.
31. Burger HG. 1992. Inhibin. *Reproductive medicine Review*, 1:1-20.
32. Moore A, Krummen LA, Mather JP. 1994. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol*, 100:81-86.
33. Baezinger JU, Green ED. 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and functions of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*, 947:287-306.
34. Stockell Hartree A, Renwich GCA. 1992. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J*, 287-306.
35. Sairam MR, Bhargavi GN. 1985. A role for glycosylation of the alpha subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, 229:65-67.
36. Calvo FO, Keutmann HT, Bergert ER, Ryan RJ. 1986. Deglycosylated human follitropin: characterization and effects of adenosine cyclic 3',5'-phosphate production in porcine granulosa cells. *Biochemistry*, 25:3938-3943.
37. Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, Brown MB, Ridings JW, Beitins IZ. 1991. Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, 79:119-128.
38. LaPolt PS, Nishimori K, Fares FA, Perlas E, Boime I, Hsueh AJW. 1992. Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides. *Endocrinology*, 131:2514-2520.
39. Bishop LA, robertson DM, Cahir N, Schofield PR. 1994. Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle-stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol Endocrinol*, 8:722-731.
40. Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50:465-495.
41. Fiddes JC, Goodman HM. 1979. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, 281:351-356.
42. Esch FS, Mason AJ, Cooksey K, Mercado M, Shimasaki S. 1986. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta chain of bovine follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:6618-6621.
43. Watkins PC, Eddy R, Beck AK, Vellucci V, Leverone B, Tanzi RE, Gusella JF, Shows TB. 1987. DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA*, 6:205-212.

44. Gharib SC, Roy A, Wierman ME, Chin WW. 1989. Isolation and characterization of the gene encoding the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA*, 8:339-349.
45. Hard K, Mekking A, Damm JB, Kamerling JP, De Boer W, Wijnands RA, Vliegenthart FG. 1990. Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*, 193:263-271.
46. Smith GM, Bishop LA, DeKroon R, Wright G, Cerpa-Poljak A, Schofield PR. 1992. Purification and characterization of recombinant human FSH. In: Hunzicker-Dunn M, Schwartz NB (eds) *Follicle Stimulating Hormone Regulation of Secretion and Molecular Mechanisms of Action*. Serono Symposia USA, Proceedings. Springer-Verlag, New York, pp:335-338.
47. Green ED, Baeenziger JU. 1988. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*, 263:36-44
48. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. 1995. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*, 16:765-787.
49. Wide L. 1987. Evidence for diverse structural variations of the forms of human FSH within and between pituitaries. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 115:7-15.
50. Papandreou MJ, Asteria C, Pettersson K, Ronin C, Beck-Peccoz P. 1993. Concanavalin an affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:1008-1013.
51. Ulloa-Aguirre A, Torra E, Dominguez R, Scherbier R, Larrea F. 1985. Effects of oestradiol-17 beta and LHRH upon the two fractions of pituitary follicle-stimulating hormone separated by concanavalin-A chromatography. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 110:475-482.
52. Foulds LM, Robertson DM. 1983. Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. *Mol Cell Endocrinol*, 31:117-130.
53. Shome B, Parlow AF, Liu WK, Nahm HS, Wen T, Ward DN. 1988. A reevaluation of the amino acid sequence of human follitropin beta-subunit. *J Protein Chem*, 7:325-339.
54. Sugino H, Takio K, Ward DN. 1989. Reevaluation of the amino acid sequence of porcine follitropin. *J Protein Chem*, 8:197-219.
55. 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.
56. Bum WFP, 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.

57. Chappel SC, Bethea CL, Spies HG. 1984. Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of Cynomolgus monkeys. *Endocrinology*, 115:452-461.
58. Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, Yamoto M, Fauser BCJM, Boime I. 1990. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology*, 127:93-100.
59. Wide L, Hobson BM. 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.
60. Tilly J, Aihara T, Nishimori K, Jia XC, Billing H, Kowalski KI, Perlman EA, Hsueh AJW. 1992. Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species specific ligand binding, signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology*, 131:799-806.
61. Dahl KD, Stone MP. 1992. FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl*, 13:11-22.
62. Menjívar M, Ortíz G, Cárdenas M, Garza-Flores J. 1993. Comparación de los métodos de DELFIA y RIA en la medición de las hormonas luteinizante y folículo estimulante en suero. *Rev Invest Clin*, 45:579-584.
63. Simoni M, Jockenhovel F, Nieschlag E. 1993. Biological and immunological properties of the international standard for FSH 83/575: isoelectrofocusing profile and comparison with other FSH preparations. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 128:281-288.
64. Simoni M, Nieschlag E. 1991. *In vitro* bioassays of follicle-stimulating hormone: methods and clinical applications. *J Endocrinol Invest*, 14:983-997.
65. Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, Chappel SC. 1983. Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil Steril*, 40:242-247.
66. Khan SA, Katzija G, Froysa B, Diczfalusy E. 1984. Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone in baboon pituitary preparations. *J Med Primatol*, 13:295-304.
67. Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins I Z. 1988. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 67:465-473.
68. Dahl KD, Bicsak T, Hsueh AJW. 1988. Naturally occurring antihormones secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science*, 239:22-74.
69. Blum WFP, 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.

70. Wide L. 1986. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 112:336-344.
71. Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT, Clarke I. 1991. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology*, 129:1805-1813.
72. Brown PS. 1955. The assay of gonadotrophin from urine of nonpregnant human subjects. *J Endocrinol*, 13:59-64.
73. Sluyterman LAE, Elgersma O. 1978. Chromatofocusing: isoelectrofocusing on ion exchange columns. *J Chromatogr*, 150:17-30.
74. Hjerten S. 1963. Zone electrophoresis in columns of agarose suspensions. *J Chromatogr*, 12:210-256.
75. Wide L. 1985. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 109:181-189.
76. Wide L. 1989. Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol*, 123:519-529.
77. Wide L, Albertsson-Wikland K. 1990. Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 70:271-276.
78. Cook AS, Webster BW, Terranova PF, Keel BA. 1988. Variation in the biologic and biochemical characteristic of human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril*, 49:704-712.
79. Simoni M, Winbauer GF, Nieschlag E. 1993. Molecular composition of two different batches of urofollitropin: analysis by immunofluorimetric assay, radioligand receptor assay and *in vitro* bioassay. *J Endocrinol Invest*, 16:21-27
80. Phillips DJ, Wide L. 1994. Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 79:814-819.
81. Booth RA, Wiltman JY, Yankov VI, Adams A, Garriott BA, Lynch A, Veldhuis JD, Rogol AD, Johnson ML, Evans WS. Characterization of FSH secretory burst activity in normal women during the menstrual cycle. Program of the 76th Annual Meeting of The Endocrine Society, Anaheim, CA, 1994, P:405 (Abstract 819).
82. Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damian-Matsumura P. 1992. Effects of gonadotropin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol*, 134:97-106.

83. Padmanabhan V, Miehler CD, Borondy M, I'Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins I. 1992. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology*, 131:213-220.
84. Bogdanove EM, Campbell GT, Peckham WD. 1974. FSH pleomorphism in the rat: regulation by gonadal steroids. *Endocr Res Commun*, 1:87-99.
85. Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz-Sánchez V, Larrea F. 1986. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol*, 110:539-549.
86. Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza P, Domínguez R, Morales L, Flores A. 1990. Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol*, 126:323-332.
87. Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima WN, Hejl K, Kittok RJ, Grotjan H E, Kinder JE. 1992. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biol Reprod*, 46:442-450.
88. Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. 1983. Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol*, 99:31-39.
89. Wide L, Naessén T, Phillips DJ. 1995. Effect of chronic oral administration of 17 β -oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 42:59-64.
90. Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK, Nieschlag E. 1992. Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic deprivation induced by castration or androgen blockade. *J Mol Endocrinol*, 9:175-182.
91. Keel BA, Schanbacher BD. 1987. Charge heterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in rams and steroid-treated wethers. *Biol Reprod*, 37:786-796.
92. Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. 1982. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol*, 95:257-266.
93. Khan SA, Syed V, Froyza B, Lindberg M, Diczfalusy E. 1985. Influence of gonadectomy on isoelectrofocusing profiles of pituitary gonadotropins in rhesus monkeys. *J Med Primatol*, 14:177-194.
94. Urbam RJ, Dahl KD, Lippert MC, Veldhuis JD. 1992. Modulation of immunoradiometric and bioactive follicle-stimulating hormone secretion and clearance in young and elderly men during treatment with tamoxifen or flutamide. *J Androl*, 13:579-586.

95. Harsch IA, Simoni M, Nieschlag E. 1993. Molecular heterogeneity of serum follicle-stimulating hormone in hypogonadal patients before and during androgen replacement therapy and in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 39:173-180.
96. Kennedy J, Chappel S. 1985. Direct pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno- and radioreceptor assay. *Endocrinology*, 116:741-748.
97. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. 1983. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, 28:196-205.
98. Foulds LM, Robertson DM. 1985. Electrofocusing fractionation of follicle-stimulating hormone in pituitary cell culture extracts from male and female rats. *Mol Cell Endocrinol*, 41:129-136.
99. Hassing JM, Kletter GB, l'Anson H, Woods RJ, Beitins I, Foster DL, Padmanabhan V. 1993. Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH) isoforms distribution pattern of pituitary of circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology*, 132:1527-1536.
100. González-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W. 1991. Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology*, 54:373-377.
101. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM. 1987. Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 65:954-961.
102. Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D, Bouchard P. 1993. Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*, 77:439-442.
103. Lei ZM, Rao ChV, Ackerman DM, Day TG. 1992. The expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors in human gestational trophoblastic neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 74:1236-1241.
104. Shi QJ, Lei ZM, Rao ChV, Lin J. 1993. Novel Role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, 132:1387-1395.
105. Lei ZM, Rao ChV, Komyei JL, Licht P, Hiatt ES. 1993. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology*, 132:2262-2270.
106. Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. 1995. receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*, 73:51-63,

107. Selvaraj N, Amsterdam A. 1997. Modulation of follicle stimulating receptor phosphorylation correlates with hormone-induced coupling to the adenylate cyclase system. *Endocrine*, 6:179-185.
108. Leung PCK, Stell GL. 1992. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev*, 13:476-498.
109. Dattatreymurty B, Figgs LW, Reichert Jr LE. 1987. Physical and functional association of follitropin receptors with cholera toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Biol Chem*, 262:11737-11745.
110. Baldwin JM. 1994. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Biol*, 6:180-190.
111. Braun T, Schofield PR, Sprengel R. 1991. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO*, 10:1885-1890.
112. Dattatreymurty B, Reichert LeJr. 1992. Carbohydrate moiety of follitropin receptor is not required for high affinity hormone-binding or for functional coupling between receptor and guanine nucleotide-binding protein in bovine calf testis membranes. *Endocrinology*, 131:2437-2445.
113. Eckery DC, Moeller CL, Nett TM, Sawyer HR. 1997. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, Growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biolog Reprod*, 57:507-513.
114. Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PM. 1990. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol*, 4:525-530.
115. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perrert J, Van Saude J, Dumont JE, Vassart G. 1989. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science*, 246:1620-1622.
116. Kobe B, Deisenhofer J. 1994. The leucine-rich repeats: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 19:415-421.
117. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Köhler M, Rosemblyt N, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. 1989. Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science*, 245:494-499.
118. Loosfelt H, Misrahi M, Atger M, Salesse R, Hai-Lun Thi MTV, Jolivet A, Guiochon-Mantel A, Sar S, Jallat B, Garnier J, Milgrom E. 1989. Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science*, 245:525-528.
119. Roth KE, Dias JA. 1996. Follitropin conformational stability mediated by loop 2 beta effects follitropin-receptor interaction. *Biochemistry*, 35:7928-7935.
120. Segaloff D, Ascoli M. 1993. The lutropin/choriogonadotropin receptor...4 years later. *Endocr Rev*, 14:324-347.
121. Oliveira L, Paiva ACM, Vriend G. 1993. A common motif in G-protein-coupled seven transmembrane helix receptors. *J Comp Aid Mol Des*, 7:649-658.

122. Monaco L, Adamo S, Conti M. 1988. Follicle-stimulating hormone modulation of phosphoinositide turnover in the immature rat Sertoli cell in culture. *Endocrinology*, 123:2032-2039.
123. Hipkin RW, Sánchez-Yagüe J, Ascoli M. 1993. Agonist induced phosphorylation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor expressed in a stable transfected cell line. *Mol Endocrinol*, 7:823-832.
124. Quintana J, Hipkin RW, Sánchez-Yagüe J, Ascoli M. 1994. Folitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *Biol Chem*, 269:8772-8779.
125. Richards JS. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*, 15:725-751.
126. Hsueh AJW, Bicsak TA, Jia XC, Dahl KD, Fauser BCJM, Galway AB, Czekala N, Pavlon SN, Popkoff H, Keene J, Boime I. 1989. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Horm Res*, 45:209-277.
127. Gudermandt T, Nicols C, Levy FO, Bimbaumer L. 1992. Ca⁺⁺ mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways. *Mol Endocrinol*, 6:272-278.
128. Kusaka M, Tohse N, Nakaya H, Tanaka T, Kanno M, Fujimoto S. 1993. Membrane currents of porcine granulosa cells in primary culture: characterization and effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 49:95-103.
129. Davis JS, West LA, Farese RV. 1984. Effects of luteinizing hormone of phosphoinositide metabolism in rat granulosa cells. *J Biol Chem*, 259:15028-15034.
130. Davis JS. 1992. Modulation of luteinizing hormone-stimulated inositol phosphate accumulation by phorbol esters in bovine luteal cells. *Endocrinology*, 131:749-757.
131. Gudermandt T, Bimbaumer M, Bimbaumer L. 1992. Evidence for dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylate cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca⁺⁺ mobilization. *J Biol Chem*, 267:4479-4488.
132. Clayton RN. 1996. Gonadotrophin receptors. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 10:1-8
133. Abayasekara DRE, Band AM, Cooke BA. 1990. Evidence for the involvement of phospholipase A₂ in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 70:147-153.
134. Hipkin RW, Liu X, Ascoli M. 1995. Truncation of the C-terminal tail of the follitropin receptor does not impair the agonist- or phorbol ester-induced receptor phosphorylation and uncoupling. *J Biol Chem*, 270:26683-26689.
135. Abe Y, Ibuki Y, Miyamoto K. 1997. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in human ovary. *Eur J Clin Invest*, 27:469-474.

136. Sharma OP, Flores JA, Leong DA, Veldhuis JD. 1994. Cellular basis for follicle-stimulating hormone-stimulated calcium signaling in single rat Sertoli cells: possible dissociation from effects of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*, 134:1915-1923.
137. Misrahi M, Vu Hai MT, Ghinea N, Loosfelt H, Meduri G, Atger M, Jolivet A, Gross B, Savouret JF, Dessen P, Milgrom E. 1993. Molecular and cellular biology of gonadotropin receptors. The Ovary. Raven Press Ltd, NY, 57-92.
138. Rousseaus-Merck MF, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. 1993. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene on 2p21-16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics*, 15:222-224.
139. Davis D, Liu X, Segaloff D. 1995. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol*, 9:150-170.
140. Sairam MR, Jiang LG, Yarney TA, Khan H. 1996. Follicle-stimulating hormone signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of receptor which inhibits hormone action. *Biochem Biophys Res Commun*, 226:717-722.
141. Valove FM, Finch C, Anasti JN, Froehlich J, Flack MR. 1994. Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 135:2657-2661.
142. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev*, 18(6):739-765.
143. Spiegel AM, Shenker AM, Weinstein LS. 1992. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr Rev*, 13:536-565.
144. Gromoll J, Dankbar B, Sharma RS, Nieschlag E. 1993. Molecular cloning of the testicular follicle-stimulating hormone receptor of the non human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. *Biochem Biophys Res Commun*, 196:1066-1072.
145. Jones LR, Benker G, Salaciniski PR. 1970. Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J Endocrinol*, 82:77-86.
146. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. 1963. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J*, 89:114-123.
147. Bex FJ, Corbin A. 1981. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology*, 108:273-280.
148. Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF. 1983. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J*, 212:473-482.

149. DeLean AP, Munson PJ, Rodbard D. 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 235:E97-E102.
150. Creus S, Chaia Z, Pellizzari E. 1996. Biological characterization of pituitary human FSH. *Presentado en el 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco CA, EUA*.
151. Hattori M, Ozawa K, Wakabayashi K. 1985. Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and the biological potency of rat lutropin. *Biochem Biophys Res Commun*, 127:501-508.
152. Mulder JE, Schneyer AL, Taylor AE. 1994. The species specificity of the recombinant human and rat follicle-stimulating hormone receptor are similar. *Endocr J*, 2:25-31.
153. Lambert A, Rodgers M, Mitchell R. 1995. In-vitro Biopotency and glycoforms distribution of recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489), Metrodin an metrodin-HP. *Human Reprod*, 10:1928-1935.
154. Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Timossi C. 1995. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of urofollitropin. *Arch Med Res*, 26:S219-S230.
155. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Zambrano E, Damián-Matsumura P, Quintanar A, Mussi N, Domínguez-González R. 1996. Physicochemical and biological attributes of recombinant human follicle-stimulating hormone. In Mastroianni, L. and Coutifaris, C. (eds), *Proceedings of the IXth World Congress on Human Reproduction*. Parthenon Publishing, Camforth, Lancaster, pp:153-163.
156. Camp TA, Rahal Jo, Mayor KE. 1991. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol ENDO*, 5:1405-1417
157. Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom M. 1996. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry*, 35:1358-1366
158. O'Shaughnessy, McLelland D, McBride MW. 1997. Regulation of luteinizing hormone- receptor and follicle stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biolog Reprod*, 57:602-608.
159. Maguire SM, Tribley WA, Griswold MD. 1997. Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biolog Reprod*, 56:1106-1111.

160. Hirsch B, Kudo M, Naro F, Conti M, Hsueh AJW. 1996. The C-terminal third of the human luteinizing hormone (LH) receptor is important for inositol phosphate release: analysis using chimeric human LH/follicle-stimulating hormone receptors. *Mol Endocrinol*, 10:1127-1137
161. LaPolit PS, Nishimori K, Fares FA, Perlas E, Boime I, Hsueh AJW. 1992. Enhanced stimulation of follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, 79:119-128

PUBLICACIONES ORIGINALES

Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone

E.Zambrano, J.Barrios-de-Tomasi, M.Cárdenas and A.Ulloa-Aguirre¹

Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

¹To whom correspondence should be addressed at: Oregon Regional Primate Research Center, 505 N.W. 185th Avenue, Beaverton, Oregon 97006-3499, USA

In the present study, we analysed and compared the relative in-vitro biological activity of the various intrapituitary human follicle stimulating hormone (FSH) isoforms employing two different bioassay systems. FSH was fractionated by chromatofocusing (pH range 7.10 to <3.80) and the several isoforms isolated were quantified at multiple dose levels by three highly specific immunoassay systems: radioimmunoassay (RIA), enzyme-immunoassay (EIA) and immunoradiometric assay (IRMA), as well as by two in-vitro bioassays, one that measures the amount of oestrogen produced by rat granulosa cells in culture and the other that determines the amount of cAMP produced by a human fetal cell line (293) expressing the recombinant human FSH receptor. The relative in-vitro biological activity of each FSH isoform, expressed as the bioassay/immunoassay (B/I) activity ratio (B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios) varied with its elution pH value. Regardless of the immunoassay or bioassay method employed, less acidic FSH isoforms exhibited higher B/I ratios than their more acidic counterparts [B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios for isoforms with elution pH values >4.5 = 1.05 ± 0.13 , 0.99 ± 0.10 and 1.15 ± 0.08 (rat oestrogen bioassay), and 2.75 ± 0.34 , 2.20 ± 0.25 and 2.96 ± 0.35 (human cAMP production bioassay) respectively. Ratios for isoforms with pH values <4.5 = 0.71 ± 0.06 , 0.47 ± 0.05 and 0.63 ± 0.06 (rat oestrogen assay), and 1.80 ± 0.26 , 1.10 ± 0.09 and 1.44 ± 0.13 (cAMP assay) respectively ($P < 0.05$ for isoforms with pH <4.5 compared with those isoforms with pH >4.5)]. Furthermore, statistically significant direct relationships between the B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios and the elution pH value of each isoform was identified by regression analysis [rat assay: $r = 0.844$, 0.800 and 0.780 ($P < 0.01$); human assay: $r = 0.730$, 0.845 and 0.821 ($P < 0.01$), for their corresponding B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios respectively]. The finding of significant differences in relative in-vitro biological potency among the various intrapituitary FSH isoforms strongly suggests that the shifts towards the production and secretion of more basic or acidic FSH molecules occurring in certain specific physiological conditions (e.g. puberty and menstrual cycle), may represent an important mechanism through which the anterior pituitary regulates gonadal function.

Key words: follicle stimulating hormone/FSH bioactivity/FSH glycoforms/granulosa cells/recombinant FSH receptor

Introduction

Follicle stimulating hormone (FSH) exists as a family of isohormones which have been identified within the anterior pituitary, serum and urine of several animal species, including man (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). The number and relative abundance of each FSH isoform will depend on the isolation technique employed for separation, the source of the sample and the physiological status of the donor at the time of tissue or sample collection (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988, 1995a; Dahl *et al.*, 1988; Wide, 1989). Since these isoforms have been separated principally on the basis of electrical charge, it seems that they differ from each other in their post-translationally determined carbohydrate composition, specifically their sialic acid content (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1984; Blum *et al.*, 1985; Wide, 1989).

As a consequence of their structural differences, FSH isoforms differ in their ability to bind to target cell receptors,

survive in the circulation and induce a biological response *in vivo* and *in vitro* (Chappel *et al.*, 1983; Blum and Gupta, 1985; Wide, 1986; Wide and Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a). More acidic FSH isoforms (possessing a greater sialic acid content) from rodents and humans have considerably longer plasma half-lives but lower receptor-binding activity than their less acidic counterparts; on the contrary, less acidic variants disappear rapidly from the circulation and exhibit a three-fold higher receptor-binding/immunoactivity relationship than the more acidic forms (Chappel *et al.*, 1983; Blum and Gupta, 1985; Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a). However, the overall net in-vivo effect of the different FSH isoforms on biopotency, which depends on the interplay of several factors including receptor-binding affinity, signal transduction and circulating half-life (Bishop *et al.*, 1994, 1995; Chappel, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a), is still unclear.

Several studies have attempted to analyse the in-vitro biological activity of human FSH isoforms with widely

differing results (Wide and Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a; Burgon *et al.*, 1993; Simoni *et al.*, 1994). Some of these studies have clearly shown that the in-vitro biological activity/immunoactivity ratio (as an index of the relative in-vitro biopotency of individual isoforms) of FSH is lower for the more acidic and higher for the least acidic isoforms (Wide and Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a). However, other studies have failed to demonstrate such a clear relationship between the apparent charge of the FSH molecule and its ability to bind its receptor and/or induce a biological response at the target cell level (Stanton *et al.*, 1992; Burgon *et al.*, 1993; Simoni *et al.*, 1994). Such discrepancies have been attributed to the use of receptor-binding assays, bioassays and immunoassays with different specificities, sensitivities, standard preparations of variable molecular composition and/or antibodies with different epitope specificity (Dahl and Stone, 1992; Burgon *et al.*, 1993; Simoni *et al.*, 1993, 1994). Recent studies have unequivocally documented the occurrence of significant changes in FSH heterogeneity during certain physiological conditions including puberty and the menstrual cycle (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide, 1989; Wide and Bakos, 1993; Phillips and Wide, 1994; Zambrano *et al.*, 1995). Thus, clarification of isoform bioactivity is of critical importance to assign a functional significance to the existence of such a variety of isoforms for a single hormone. We therefore decided to re-examine in more detail the in-vitro biological activity of the various human FSH isoforms present in anterior pituitary extracts employing two different bioassays. FSH was fractionated by chromatofocusing and the capacity of the different isoforms to induce oestrogen synthesis by rat granulosa cells in culture as well as adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) production by a human fetal kidney cell line expressing the recombinant human FSH receptor was studied.

Material and methods

Pituitary extracts

Adult human pituitaries, not selected by sex or age, were collected at autopsies performed after accidental deaths. The bodies were examined no later than 24 h post-mortem and were kept at 8°C within 3–4 h after death. The pituitary glands were stored frozen at –70°C until extracts were prepared. The anterior pituitary total glycoprotein extracts were obtained following the method of Jones *et al.* (1970). Extracts were kept at –70°C until the day of chromatofocusing. The study was approved by the human and animal research ethical committees of the Institute.

Chromatofocusing of pituitary glycoprotein extracts

Chromatofocusing of FSH present in pituitary glycoprotein extracts was performed according to the method described previously with some modifications (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990). To increase the resolution of the chromatofocusing separation, columns of polybuffer exchange resin (PBE-94; Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA) with larger dimensions (90×1.5 cm) than those previously used (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990, 1992a) were constructed and equilibrated with 15 bed volumes of starting buffer (0.025 M imidazole-HCl, pH 7.4). Subsequently, a highly concentrated pituitary glycoprotein extract (15–25 mg of immunoreactive FSH), which had

previously been equilibrated with the eluent buffer [1:8 dilution of Polybuffer-74 (Pharmacia) in deionized water, pH 4.0] by chromatography on Sephadex G-25 (Pharmacia) was applied to the top of the column. Eluent buffer (5 ml) was run before sample application to avoid exposure of the sample proteins to pH extremes. Between 550 and 600 fractions (3 ml each) were collected at a flow rate of 1 ml/4 min at 4°C. The pH of each fraction was measured and when the pH of the column eluent stabilized at its lowest value, the eluent buffer was then replaced by a solution of 1 M NaCl to recover those proteins bound at the lower limiting pH (salt peak). Each fraction was divided into several aliquots which were stored frozen at –20°C until further analysis.

The amount of FSH was determined in 5–15 µl aliquots of each fraction by radioimmunoassay. Recoveries of FSH by this method were 79 ± 4% of the total amount applied to the column. After three chromatofocusing separations, fractions containing the greatest concentration of each immunoreactive FSH isoform (Figure 1) were separately pooled, transferred to dialysis membrane tubings (molecular weight cut-off 12 000; Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA), dialysed at 4°C for 24 h against deionized water and thereafter against 0.01 M ammonium carbonate (pH 7.5) and freeze-dried. Each FSH isoform, or pool of neighbouring isoforms, was redissolved in phosphate (0.01 M)-buffered physiological (0.15 mol/l) saline (PBS; pH 7.4) and kept frozen at –70°C until measurement of FSH content.

Immunoassays of FSH

Radioimmunoassay

Purified human FSH [human FSH-13; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), Bethesda, MD, USA] was iodinated by the lactoperoxidase-glucose oxidase method (Bex and Corbin, 1981). Following separation of protein-bound and free [¹²⁵I] by Sephadex G-100 column chromatography, [¹²⁵I]-labelled FSH was further purified by Concanavalin A chromatography (Pharmacia) as described by Dufau *et al.* (1972). The FSH radioimmunoassay was performed using reagents provided by the NIDDK: the reference preparation LER-907 (1 mg LER-907 = 53 IU 2nd International Reference Preparation) was employed to construct the standard curve. This standard exhibits a similar degree of charge heterogeneity to crude pituitary extracts as disclosed by chromatofocusing (Chappel *et al.*, 1986). The polyclonal antihuman FSH-6 at a final dilution of 1:250 000 was used as antiserum; this antiserum exhibits <0.1% cross-reactivity with highly purified human luteinizing hormone (LH) and undetectable reactivity with free α-subunit. To minimize the effects of interassay variations as well as to determine the degree of parallelism between the unknown samples and the FSH standard, all isoform concentrates prepared were analysed at multiple dose levels in the same assay run. Inter- and intra-assay coefficients of variation were <12% and <8% respectively, and the sensitivity was 0.24 mIU/tube.

Enzyme immunoassay (EIA) and immunoradiometric assay (IRMA)

The EIA of FSH was performed employing reagents provided by the World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, London, UK. This assay employs two anti-FSH monoclonal antibodies directed against either the β- or the α-chain of the glycoprotein. The IRMA of FSH was performed using a commercial [¹²⁵I]-IRMA kit (Immunochem™; ICN Biomedicals, Inc. Costa Mesa CA, USA); this immunometric assay uses a monoclonal antibody directed against the α-subunit and a polyclonal/monoclonal antibody mix directed against the β-subunit. In both immunoassays, the standard curve was constructed using LER-907 as standard. Each sample was

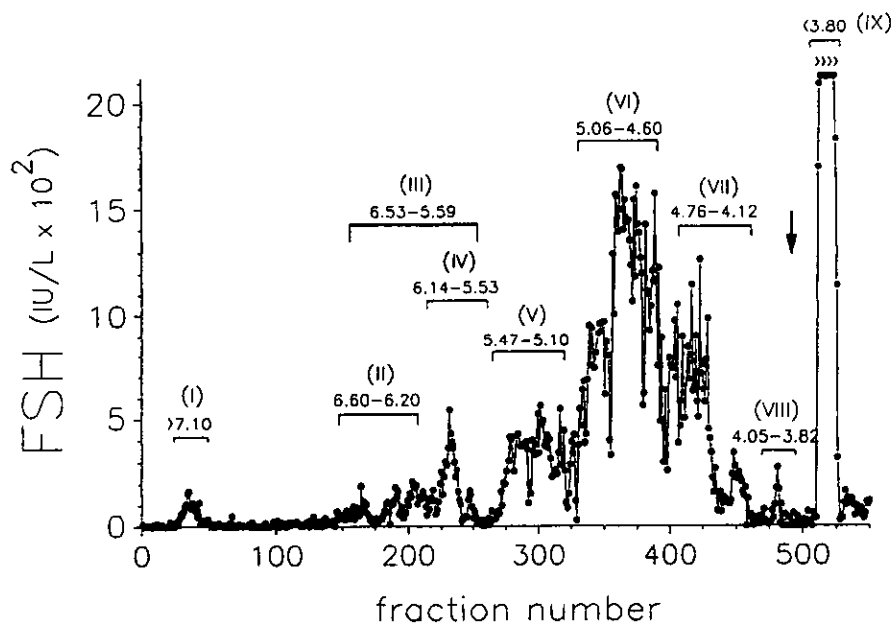


Figure 1. Representative profile of pH distribution of immunoreactive follicle stimulating hormone (FSH) after chromatofocusing of an anterior pituitary glycoprotein extract. The elution pH values of the various FSH isoforms (I to IX) are indicated. Isoform concentrate III comprised both concentrate II and isoform concentrate IV. The arrow marks the application of 1 M NaCl to the chromatofocusing column.

assayed at 6–8 different dilutions to determine the degree of parallelism with the LER-907 standard. Cross reactivity with free α -subunit, LH, thyroid-stimulating hormone (TSH) and human chorionic gonadotrophin (HCG) in these systems was <1.0%. To minimize the effects of interassay variations, all isoform concentrates were analysed in the same batch. Inter and intra-assay coefficients of variation for both assay systems were <8 and <5% respectively.

***In-vitro* bioassays of FSH**

Oestrogen production by rat granulosa cells: aromatization bioassay (GAB)

The capacity of each FSH isoform concentrate to induce aromatization of androgen *in vitro* was assessed following the method described by Jia and Hsueh (1985). Inter- and intra-assay coefficients of variation were <15 and <8% respectively. The amount of oestrogen produced *in vitro* was determined by radioimmunoassay using an antiserum against oestrone (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a). Because of the significant cross-reactivity of this antiserum with 17- β oestradiol (~22%), results are expressed as total oestrogens produced by the granulosa cells in culture. All samples from a single bioassay were analysed for oestradiol content in the same batch; the mean inter- and intra-assay coefficients of variation were <11 and <6% respectively.

cAMP production by human fetal cells expressing the FSH receptor

The human embryonic kidney-derived 293 cell line transfected with the human FSH receptor cDNA was a generous gift of Dr. Aaron J.W. Hsueh Stanford University, CA, USA. The origin, handling, ligand specificity and biochemical properties of the recombinant human FSH receptor expressed by this cell line have been described elsewhere (Tilly *et al.*, 1992). Transfected 293 cells (2×10^5 cells/culture dish) were exposed to increasing doses of each isoform concentrate in the presence of 0.125 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) for 24 h at 37°C. After incubation, total (intra- and extracellular) cAMP concentrations were determined by radioimmunoassay after acetylation of the samples and cAMP standards. The assay employed 2-O-monosuccinyl cAMP tyrosylmethyl ester (Sigma) iodinated by the chloramine-T method

as the labelling ligand and the CV-27 cAMP antiserum (NIDDK) at a final dilution of 1:150 000. After incubation at 4°C for 24 h, antibody-bound and free cAMP were separated by ethanolic precipitation followed by centrifugation at 1200 g at 4°C. The sensitivity of the assay was 4 fmol/tube and the inter- and intra-assay coefficients of variation were <12 and <6% respectively.

In both assays, the standard curve was constructed using LER-907 as the FSH standard. Each sample was tested for *in-vitro* bioactivity at 8–10 different doses ranging from 0.5–65 mIU/culture dish, in triplicate incubations. The relative *in-vitro* biological activity of FSH was calculated considering each dose analysed in four separate assays and it is expressed as the bioassay/immunoassay (B/I) activity ratio, the ratio of activity in the *in-vitro* bioassay relative to the activity in the radioimmunoassay (B/RIA), EIA (B/EIA) and IRMA (B/IRMA).

Statistical analysis

Tests for parallelism among the slopes generated by the different FSH preparations (LER-907 and isoform concentrates) in the immunoassays and bioassays of FSH were performed following the method of DeLean *et al.* (1978). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine differences between the apparent *in-vitro* biological activity of the FSH isoforms. When differences existed *t*-tests were used to determine their statistical significance. Linear regression analysis was performed to determine the degree and significance of the association between the elution pH value of the isoforms and their corresponding *in-vitro* B/I ratios. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Separation of pituitary glycoprotein extracts on high-resolution chromatofocusing columns revealed the presence of multiple distinct peaks of FSH immunoactivity with pH values ranging from >7.10 to <3.80. Two peaks of FSH immunoactivity were identified at each end of the pH window; the first appeared in fractions containing those proteins that passed

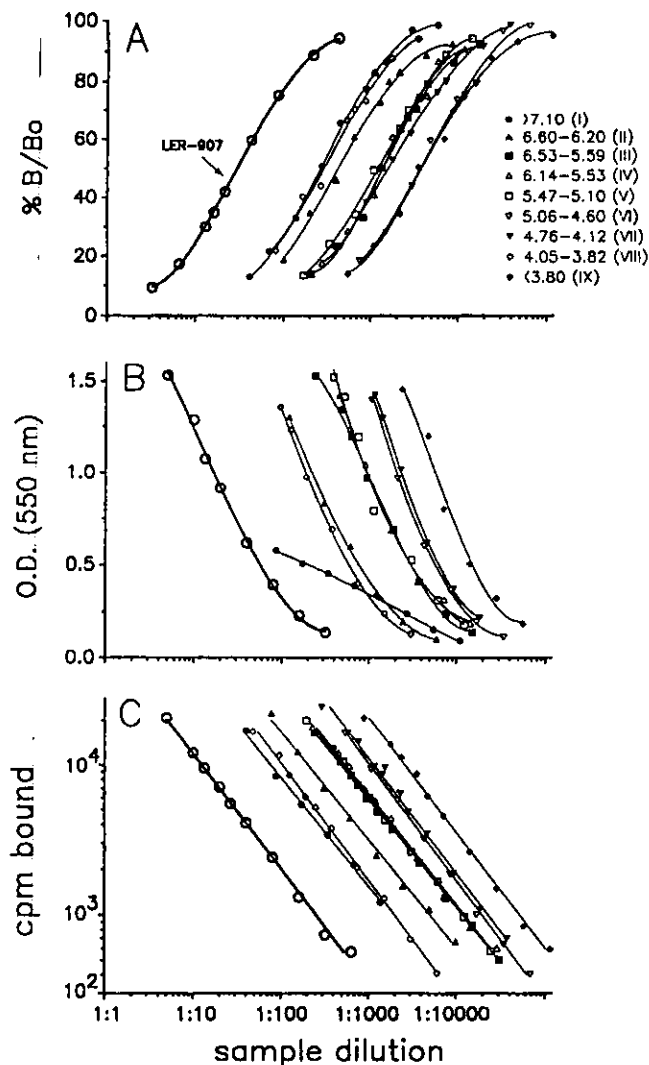


Figure 2. Representative dose-response curves of the different follicle stimulating hormone (FSH) isoform concentrates (I to IX) in the radioimmunoassay (A), enzyme immunoassay (B) and immunoradiometric assay (C) systems. Similar results were obtained from three separate assays.

through the column unrestricted (pH >7.10), whereas the second, with an elution pH value of <3.8-3.0, was identified at the end of chromatofocusing after the application of 1 M NaCl (Figure 1). Fractions containing the highest concentrations of immunoreactive FSH within a single peak or closely neighbouring peaks were pooled in nine groups as shown in Figure 1, concentrated as described previously and then utilized in the immuno- and bioassay studies.

All the pools displaced [¹²⁵I]-labelled FSH from the antibody in a parallel fashion when analysed by radioimmunoassay (Figure 2A); simultaneous curve fitting of the dose-response curves revealed no significant differences among the slopes generated by the FSH standard (LER-907) and the several pools of isoforms fractionated by chromatofocusing. Similar results were obtained when the amount of immunoreactive FSH present in each concentrate was determined by EIA (Figure 2B) and IRMA (Figure 2C), with the exception of the least acidic isoform (present in pool I) which was not accurately quantified in the EIA system due to significant non-concordance

between this preparation and the corresponding standard curve. When compared with the radioimmunoassay, EIA slightly overestimated the amount of FSH present in concentrates III, V, and VII to IX, whereas IRMA underestimated the amount of FSH present in pools I, IV, VI and VIII but overestimated those contained in concentrates VII and IX. EIA underestimated the amount of FSH present in isoform concentrates III to IX when compared with IRMA. These differences in antibody recognition led to slight variations in the calculated B/I ratio for the same isoform, reaching in some cases statistical significance (Table I).

In-vitro bioactivity of the FSH isoforms

All FSH concentrates were able to induce significant dose-dependent oestrogen production when analysed by the rat granulosa cell aromatization bioassay (Figure 3); their corresponding dose-response curves were parallel regardless of the method (radioimmunoassay, EIA or IRMA) employed to determine the FSH doses to be challenged [mean \pm SD of the slope factors: LER-907, 3.10 ± 0.20 ; isoform concentrates I to IX, 2.71 ± 0.22 (range 2.43 ± 0.30 to 3.01 ± 0.28 ; not significant)]. The results obtained with GAB showed that FSH isoforms in pools II to VI (elution pH value 6.60 to 4.60) exhibited higher in-vitro B/I ratios than the more acidic FSH isoforms (VII to IX; Table I and Figure 4). In fact, if those isoforms with elution pH values >7.10 (I) and <3.80 (IX) were excluded since their exact pH could not be determined by the chromatofocusing method employed, there was a statistically significant direct relationship between the B/I ratios of the isoforms and their corresponding mean elution pH value [$r = 0.844$, 0.800 and 0.780 for the B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios respectively ($P < 0.01$)]. The least acidic FSH isoforms (concentrated in pool I) exhibited a B/RIA ratio similar to that of isoforms with elution pH values ≤ 5.06 and a B/IRMA ratio similar to that of isoforms with pH values 5.47-4.60. Likewise, depending on the immunoassay method employed to quantitate the amount of the most acidic isoform (contained in pool IX), the B/I ratios of this variant were intermediate between those of isoforms VI and VII (elution pH value 5.06 to 4.12) or isoforms VII and VIII (pH 4.76 to 3.82) (Table I).

Human fetal 293 cells exposed to each isoform concentrate produced cAMP in an FSH dose-dependent manner (Figure 5). The slope values of the dose-response curves yielded by this assay were not significantly different [mean slope value for LER-907 = 1.46 ± 0.12 , isoforms I to IX, 1.30 ± 0.10 (range 1.02 ± 0.17 to 1.65 ± 0.10); not significant]. The relative in-vitro bioactivity of the less acidic FSH isoforms was significantly higher than that exhibited by the more acidic forms ($r = 0.730$, 0.845 and 0.821 for the B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratio of isoforms II to VIII and their corresponding mean elution pH value respectively; $P < 0.01$); all B/I ratios were higher in isoforms with a pH value >4.5 (Figure 4). In this assay, however, the least acidic FSH isoform consistently exhibited the highest in-vitro bioactivity (Table I). Other discrepancies between the two bioassay systems were also evident for isoform concentrates V to VII (Table I). In general,

Table I. Bioactivity/immunoactivity (B/I) ratio of the different isoforms of follicle stimulating hormone (FSH) isolated from anterior pituitary glycoprotein extracts. Values are means \pm SEM derived from four independent bioassays

| Isoform (pH) | FSH B/I ratio | | | | | |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Oestrogen production (rat assay) | | | cAMP production (human assay) | | |
| | B/RIA | B/EIA | B/IRMA | B/RIA | B/EIA | B/IRMA |
| I (>7.10) | 0.86 \pm 0.02 ^{ac} | — | 1.03 \pm 0.05 ^{ac¶} | 3.9 \pm 0.1 ^a | — | 4.7 \pm 0.2 ^{af} |
| II (6.60–6.20) | 1.32 \pm 0.1 ^b | 1.31 \pm 0.1 ^a | 1.31 \pm 0.1 ^b | 3.5 \pm 0.2 ^b | 3.4 \pm 0.2 ^a | 3.2 \pm 0.2 ^b |
| III (6.53–5.59) | 1.19 \pm 0.05 ^{bc†} | 0.90 \pm 0.04 ^{bs} | 1.18 \pm 0.05 ^{ab} | 2.7 \pm 0.2 ^{cf} | 2.1 \pm 0.1 ^{bs} | 2.7 \pm 0.2 ^c |
| IV (6.14–5.53) | 1.14 \pm 0.1 ^{cd} | 1.03 \pm 0.05 ^{bs} | 1.24 \pm 0.08 ^b | 2.2 \pm 0.1 ^{de} | 2.0 \pm 0.1 ^{bs} | 2.6 \pm 0.1 ^{cf} |
| V (5.47–5.10) | 1.01 \pm 0.02 ^{ad†} | 0.67 \pm 0.02 ^{ds} | 0.92 \pm 0.03 ^{cs} | 3.2 \pm 0.2 ^{bf} | 2.1 \pm 0.1 ^{bs} | 2.9 \pm 0.2 ^{cb} |
| VI (5.06–4.60) | 0.87 \pm 0.02 ^{ae†} | 0.97 \pm 0.02 ^{bs} | 1.14 \pm 0.01 ^{ab¶} | 1.4 \pm 0.1 ^f | 1.5 \pm 0.1 ^{cs} | 1.8 \pm 0.1 ^{ds} |
| VII (4.76–4.12) | 0.72 \pm 0.03 ^{ef†} | 0.35 \pm 0.01 ^{cs} | 0.48 \pm 0.02 ^{ds} | 2.5 \pm 0.05 ^{ce†} | 1.2 \pm 0.03 ^{cs} | 1.7 \pm 0.04 ^{ds} |
| VIII (4.05–3.82) | 0.64 \pm 0.01 ^{ff} | 0.56 \pm 0.01 ^{ds} | 0.72 \pm 0.02 ^{cf} | 0.89 \pm 0.02 ^{ef} | 0.77 \pm 0.02 ^{ds} | 1.0 \pm 0.02 ^{cf} |
| IX (<3.80) | 0.77 \pm 0.1 ^{ef} | 0.48 \pm 0.05 ^{ef} | 0.65 \pm 0.1 ^{de} | 2.1 \pm 0.02 ^{df} | 1.3 \pm 0.04 ^{cs} | 1.8 \pm 0.1 ^{ds} |

RIA = radioimmunoassay; EIA = enzyme immunoassay; IRMA = immunoradiometric assay.

Means identified by different superscript letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

[†] $P < 0.05$ B/RIA versus B/EIA; [‡] $P < 0.05$ B/EIA versus B/IRMA; [¶] $P < 0.05$ B/IRMA versus B/RIA.

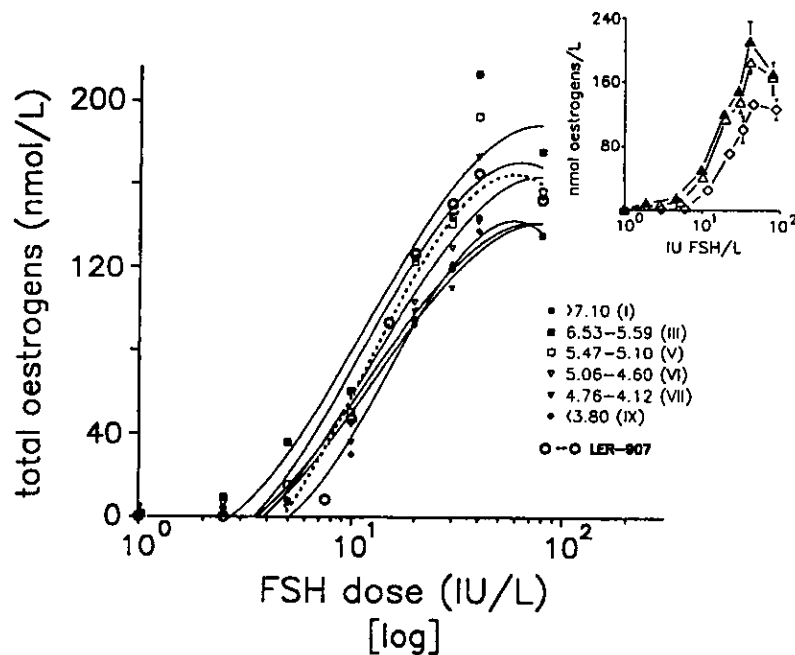


Figure 3. The ability of increasing doses of follicle stimulating hormone (FSH) isoform concentrates I, III, V, VI, VII and IX to induce oestrogen production by rat granulosa cells in culture. The dose is expressed in terms of the LER-907 standard (NIDDK) as measured by radioimmunoassay. The dispersion around each mean is omitted for clarity. *Inset:* The dose response curves of FSH isoform concentrates II (\blacktriangle), IV (\triangle) and VIII (\diamond).

the behaviour of the most acidic component in the human assay was similar to that observed in the GAB.

Discussion

In the present study, we have examined the capacity of intrapituitary FSH isoforms to induce a quantitatively measurable response at the post-receptor level. The results showed that all isoforms, after separation by a charge-based procedure, were able to induce significant dose-dependent responses in each of two separate bioassay systems. The first was a primary cell assay that assesses the ability of FSH to induce aromatization of androgen by cultured rat granulosa cells, and the second used a cell line transfected with the human FSH

receptor which had been optimized to produce cAMP as an end point. A B/I ratio was established as an index of the relative in-vitro biological activity of each FSH isoform. To properly interpret the results, the same pituitary standard, possessing a charge heterogeneity similar to that of crude pituitary extracts (Chappel *et al.*, 1986), was used to construct the standard curve in all assay systems employed. Likewise, to overcome some of the potential problems related to differences in antibody recognition or epitope specificity, the amount of isoform in each in-vitro bioassay was defined using three different immunoassay systems which used either polyclonal or monoclonal antibodies. Although all isoforms exhibited parallel dose-dependent curves in the radioimmunoassay, IRMA and EIA systems (with the exception of isoform I in

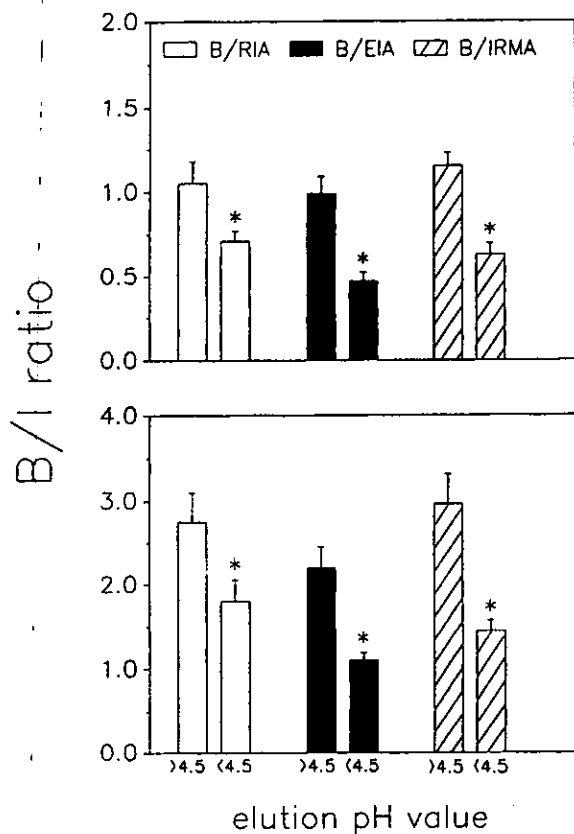


Figure 4. The ratio of biological to immunological (B/I) activity of follicle stimulating hormone (FSH) exhibited by isoforms with elution pH values >4.5 and <4.5 in the rat granulosa cell aromatization bioassay (top) and the cAMP production human assay (bottom). *Pairs in which there are statistically significant differences ($P < 0.05$). Data derived from four independent bioassays (mean \pm SEM).

the EIA), significant variations in B/I ratios within the same isoform pool were detected, implying that some of the immunoassay systems recognized certain isoforms more or less accurately than the others. However, in spite of these differences in antibody recognition towards certain FSH isoforms, a trend was apparent in which the less acidic isoforms exhibited higher B/I ratios than the more acidic forms. Whether this close relationship between FSH isoform charge and B/I ratio was the result of a general inability of each of the immunoassay systems employed to accurately identify the less acidic/sialylated isoforms or whether these isoforms are genuinely more bioactive cannot be determined by the present study. It is currently difficult to draw definitive conclusions concerning the intrinsic in-vitro biological activity of the human FSH isoforms. However, differences in oligosaccharide structures (which are essential for receptor binding and signal transduction) are the distinguishing characteristic of most gonadotrophin isoforms (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988, 1995a). A series of observations has shown that rodent, monkey, and human FSH as well as human choriogonadotrophin and rat and human luteinizing hormone share the same relationship between charge and the in-vitro biopotency of their corresponding isoforms (Miller *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 1984; Hattori *et al.*, 1985; Wide and Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988, 1990,

1992a; present study). This suggests that increased bioactivity may be the cause of the greater B/I ratios exhibited by the less acidic intrapituitary FSH isoforms.

The least acidic FSH isoform, although reliably quantified by radioimmunoassay and IRMA, was barely detected by the EIA. It has been previously shown that these particular FSH molecules are poorly sialylated (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1984), exhibit more basic pH values (Dahl *et al.*, 1988) and bear oligosaccharide structures markedly different to the more acidic isoforms (see below). Whether these variations in immunoactivity are dependent on the specific carbohydrate composition of these basic molecules or on the presence of a heterogeneous peptide component (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a) remains to be clarified.

In both the human and the rat bioassay systems, and regardless of the immunoassay method employed to quantify the isoforms, the highest in-vitro bioactivity was exhibited by the less acidic isoforms and the lowest by their more acidic/sialylated counterparts. However, some differences between the results generated by the two bioassays were apparent. In the human assay, the B/I ratios obtained for each isoform were higher (2 to 3 times) than those yielded by the rat assay, a finding which may be explained by the greater homology between the structurally heterogeneous human FSH ligands tested and their corresponding receptor in the 293 cell system (Mulder *et al.*, 1994). On the other hand, the least acidic FSH molecules (present in pool I) consistently exhibited the highest B/I ratios in the human assay whereas in the GAB they showed a lower activity than that observed for isoforms with pIs 6.60 to 5.53. This, and other similar discrepancies between the apparent *in vitro* bioactivities shown by the same isoforms in the two assays, may be secondary to the different abilities of the individual bioassay systems to identify subtle aspects of the molecular structure of FSH, mainly those related to the carbohydrate chains attached to the protein core. Recent lectin-binding studies have indicated that, in addition to their lower sialic acid content, less acidic FSH isoforms bear more high mannose- and hybrid-type oligosaccharides, whereas the more acidic variants contain greater amounts of more complex carbohydrate residues (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992b; Creus *et al.*, 1996). These variations in oligosaccharide composition may account for differences in the affinity of the isoforms for the human and the rat FSH receptor and/or their capability to activate it and establish signal transduction (Sairam and Bhargavi, 1985; Bishop *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1995). Alternatively, these apparent discrepancies may relate to the particular biological features of the rat granulosa cell and the receptor-transfected 293 cell systems employed in the present study. The human assay has been maximized for cAMP production and thus neither steps post-cAMP nor involvement of other second messenger systems which may eventually lead to agonistic or antagonistic outcomes are considered (Dahl *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 1990; Padmanabhan *et al.*, 1991; Minegishi *et al.*, 1995). In fact, dissociations between cAMP and end product relationships have been recently demonstrated in primary cell cultures utilizing deglycosylated FSH analogues (Padmanabhan *et al.*, 1991; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a).

These results are in accordance with other recent findings

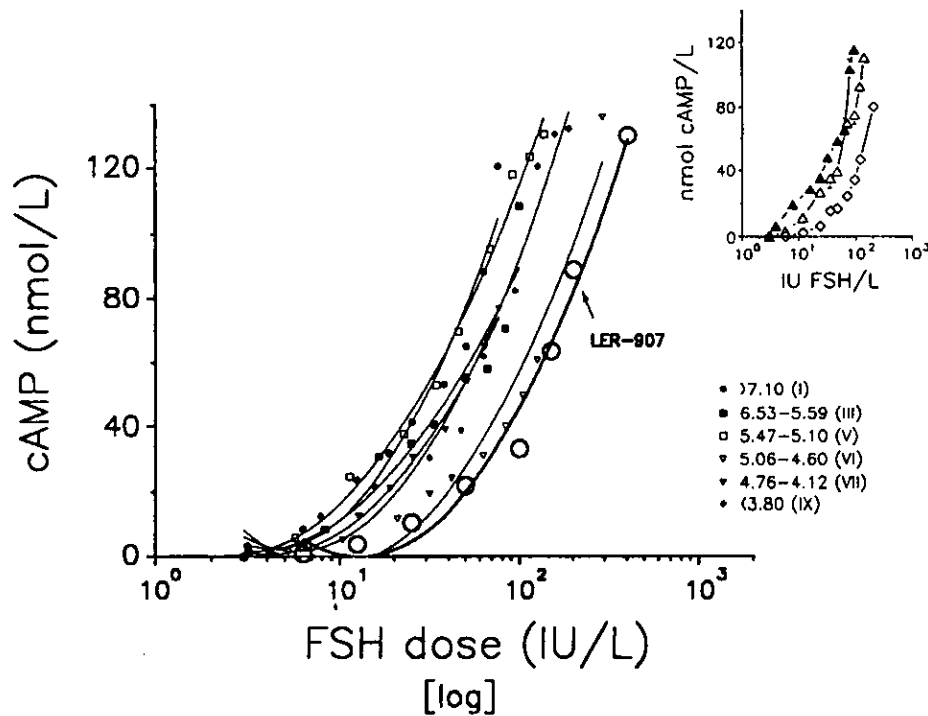


Figure 5. The ability of increasing doses of follicle stimulating hormone (FSH) isoform concentrates I, III, V, VI, VII and IX to induce cAMP production by 293 cells transfected with the recombinant human FSH receptor. The dose is expressed in terms of the LER-907 standard (NIDDK) as measured by radioimmunoassay. The dispersion around each mean is omitted for clarity. *Inset:* The dose response curves of FSH isoform concentrates II (▲), IV (△) and VIII (◇).

showing a clear association between the relative in-vitro B/I ratios and the charge borne by various recombinant human FSH preparations, urinary FSH compounds and their corresponding isoforms (Cerpa-Poljak *et al.*, 1993; Flack *et al.*, 1994, Lambert *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b, 1996). Interestingly, in one of these studies (Flack *et al.*, 1994) the least acidic recombinant variant also showed a significantly decreased biological activity as disclosed by GAB. The overall findings concurrently suggest that assays employing final products (e.g. oestrogen) as end points to assess the bioactivity of either natural or recombinant FSH isoforms, may be more suitable than the cAMP production-based human assays in establishing the clinical significance of changes in the relative distribution of secreted isoforms during specific physiological conditions (Padmarabhan *et al.*, 1988; Wide and Bakos, 1993; Phillips and Wide, 1994; Zambrano *et al.*, 1995) and in determining the potential effects of differing molecular structures in recombinant FSH on the various biological functions of the gonad.

The present findings are in contrast with those from other investigators who were unable to detect a clear relationship between the receptor-binding potency and/or *in vitro* bioactivity and the charge of the pituitary FSH isoforms (Stanton *et al.*, 1992; Burgon *et al.*, 1993; Simoni *et al.*, 1994). However, in one of those studies (Simoni *et al.*, 1994), chromatofocusing columns with much lower resolving capacity were employed to fractionate the various FSH isoforms, whereas in the study of Burgon *et al.*, (1993), only those isoforms recovered within a relatively narrow isoelectric point (pI) range (3.5–5.29) were considered. In addition, neither of these two studies accurately established parallelism between the dose-response curves

generated by the various isoforms and the particular standard preparations used in the bio- and immunoassays. Finally, Stanton *et al.*, (1992), whose study was also restricted to isoforms with pI values 3.5–5.29, observed that the dose-response curves of FSH isoforms with pI values 4.15–5.29 were not parallel to those of the more acidic isoforms or the FSH standard used in the heterologous assay employed to calculate the radioreceptor specific activity of the isoforms. It is well known that the establishment of parallelism between the dose-response curves of standards and unknowns is critical for a reliable estimation of relative potencies or B/I ratios (DeLean *et al.*, 1978; Chappel, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). In fact, Blum *et al.* (1985) observed that the dose-response relationships of the more acidic pituitary rat FSH isoforms differed considerably from both the less acidic forms and the reference preparation used to construct the standard curve; the less acidic isoforms exhibited B/I ratios equal to 1.0 over the entire concentration range analysed, whereas the more acidic variants showed a progressive increase in this ratio with values <1.0 and >3.0 at low and high concentrations respectively. Since in the foregoing studies the methods for determining the potencies or B/I ratios of FSH isoforms were not clearly validated, it is very difficult to draw definitive conclusions concerning the significance of their findings.

We and others have previously shown that almost all stored FSH isoforms may be released from the pituitary gland with few or no modifications in their number and pH values and that the charge distribution of the circulating isoforms changes according to the phase of the menstrual cycle (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide and Bakos, 1993; Zambrano *et al.*, 1995).

Specifically, the secretion of isoforms with pH values >4.5 is significantly increased at times of both high oestradiol output and enhanced pituitary sensitivity to GnRH (e.g. during the periovulatory phase) (Zambrano *et al.*, 1995). The finding that their intrapituitary counterparts display an increased relative *in vitro* biopotency (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a; present study) strongly suggests that the shift towards the production and secretion of less acidic/sialylated FSH molecules during this cycle phase may be an important mechanism to regulate the intensity of the FSH stimulus during the final steps of follicular maturation. The fact that the less acidic isoforms disappear rapidly from the circulation (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a,b) does not necessarily mean that under physiological conditions their presence may be biologically irrelevant. Less acidic isoforms possess *per se* considerable bioactivity and even if small quantities reach the target cell they still might be able to induce a significant biological response. Evidence for this possibility has been provided for desialylated human choriongonadotrophin, which has been shown to be a full agonist *in vivo* in the monkey, capable of stimulating a full testicular response over 6 h despite being cleared from the circulation within 15 min (Liu *et al.*, 1989). Therefore, the signal transduction system at the receptor level may be capable of achieving full biological effect despite low receptor occupancy or dramatically shortened exposure to the stimulus. Additional studies on the *in vivo* bioactivity of circulating FSH isoforms are still required to further support this hypothesis.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH), México D.F., Mexico. The authors are indebted to the NIDDK for the human FSH RIA reagents and to Dr. Deborah Alemán-Hoey for her kind revision of the manuscript. E. Zambrano is a postgraduate student supported by the CONACYT, México.

References

- Bex, F.J. and Corbin, A. (1981) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology*, **108**, 273–280.
- Bishop, L.A., Nguyen, T.V. and Schofield, P.R. (1995) Both of the β -subunit carbohydrate residues of follicle-stimulating hormone determine the metabolic clearance rate and *in vivo* potency. *Endocrinology*, **136**, 2635–2640.
- 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. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 722–731.
- Blum, W.F.P. and 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.
- Blum, W.F.P., Riegelbauer, G. and 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.
- Burgon, P.G., Robertson, D.M., Stanton, P.G. and Hearn, M.T.W. (1993) Immunological activities of highly purified isoforms of human FSH correlate with *in vitro* bioactivities. *J. Endocrinol.*, **139**, 511–518.
- Cerpa-Poljak, A., Bishop, L.A., Hort, Y.J. *et al.* (1993) Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology*, **132**, 351–356.
- Chappel, S.C. (1995) Heterogeneity of follicle-stimulating hormone: control and physiological function. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 479–487.
- Chappel, S.C., Bashey, H.M. and Snyder, P.J. (1986) Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol.*, **113**, 311–316.
- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A. and Ramaley, J. (1983) Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, **28**, 196–205.
- Creus, S., Chaia, Z., Pellizzari, E. *et al.* (1996) Biological characterization of pituitary human FSH. Presented at the 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco CA, USA.
- Dahl, K.D., Bicsak, T. and Hsueh, A.J.W. (1988) Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science*, **239**, 72–74.
- Dahl, K.D. and Stone, M.P. (1992) FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J. Androl.*, **13**, 11–22.
- Davis, D., Liu, X. and Segaloff, D.L. (1995) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in receptor function. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 159–170.
- DeLean, A.P., Munson, P.J. and Rodbard, D. (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.*, **235**, E97–E102.
- Dufau, M.L., Tsurahara, T. and Catt, K.J. (1972) Interaction of glycoprotein hormones with agarose-concanavalin A. *Biochem. Biophys. Acta*, **278**, 281–292.
- Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J. *et al.* (1994) Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 756–760.
- Flores, J.A., Veldhuis, J.D. and Leong, D.A. (1990) Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentrations in single ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology*, **127**, 3172–3179.
- Hattori, M., Ozawa, K. and Wakabayashi, K. (1985) Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and the biological potency of rat lutropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 501–508.
- Jia, X.C. and Hsueh, A.J.W. (1985) Sensitive *in vitro* bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinology*, **41**, 445–448.
- Jones, L.R., Benker, G., Salacinski, P.R. *et al.* (1970) Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J. Endocrinol.*, **82**, 77–86.
- Khan SA, Katzija, C., Froyssa, B. and Diczfaluzi, E. (1984) Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone in baboon pituitary preparations. *J. Med. Primatol.*, **13**, 295–304.
- Lambert, A., Rodgers, M., Mitchell, R. *et al.* (1995) *In vitro* biopotency and glycoform distribution of recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489), Metrodin and Metrodin-HP. *Hum. Reprod.*, **10**, 1928–1935.
- Liu, L., Southers, J.L., Banks, S.M. *et al.* (1989) Stimulation of testosterone production in the cynomolgus monkey *in vivo* by deglycosylated and desialylated human choriongonadotropin. *Endocrinology*, **124**, 175–180.
- Miller, C., Ulloa-Aguirre, A., Hyland, L. and Chappel, S.C. (1983) Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil. Steril.*, **40**, 242–247.
- Mulder, J.E., Schneyer, A.L., Taylor, A.E. *et al.* (1994) The species specificity of the recombinant human and rat follicle-stimulating hormone receptor are similar. *Endocr. J.*, **2**, 25–31.
- Minegishi, T., Tanc, M., Nakamura, K. *et al.* (1995) Regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **108**, 67–73.
- Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstein, J. *et al.* (1988) Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**, 465–473.
- Padmanabhan, V., Sairam, M.R., Hassing, J.M. *et al.* (1991) Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **79**, 119–128.
- Phillips, D.J. and Wide, L. (1994) Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 814–819.
- Sairam, M.R. and Bhargavi, G.N. (1985) A role for glycosylation of the alpha subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, **229**, 65–67.
- Simoni, M., Jockenovel, F. and Nieschlag, E. (1993) Biological and immunological properties of the international standard for FSH 83/575: isoelectrofocusing profile and comparison with other FSH preparations. *Acta Endocrinol.*, **128**, 281–288.

- Simoni, M., Jockenhövel, F. and Nieschlag, E. (1994) Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J. Endocrinol.*, **141**, 359–367.
- Stantor, P.G., Robertson, D.M., Burgon, P.G. *et al.* (1992) Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*, **130**, 2820–2832.
- Tilly, J.L., Aihara, T., Nishimori, K. *et al.* (1992) Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology*, **131**, 799–806.
- Ulloa-Aguirre, A., Miller, C., Hyland, L. and Chappel, S. (1984) Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.*, **30**, 382–387.
- Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P. and Chappel, S.C. (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.*, **3**, 491–501.
- Ulloa-Aguirre, A., Mendez, J.P., Cravioto, A. *et al.* (1990) Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotrophin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum. Reprod.*, **5**, 661–669.
- Ulloa-Aguirre, A., Damian-Matsumura, P., Espinoza, P. *et al.* (1990) Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.*, **126**, 323–332.
- Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damian-Matsumura, P. *et al.* (1992a) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, **7**, 23–30.
- Ulloa-Aguirre, A., Damian-Matsumura, P., Jiménez, M. *et al.* (1992b) Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum. Reprod.*, **7**, 1371–1378.
- Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A.R., Beitins, I. and Padmanabhan, V. (1995a) Follicle-stimulating isoforms: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.*, **16**, 765–787.
- Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C. *et al.* (1995b) On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of urofollitropin. *Arch. Med. Res.*, **26**, S219–S230.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Zambrano, E. *et al.* (1996) Physicochemical and biological attributes of recombinant human follicle-stimulating hormone. In Mastoianni, L. and Coutifaris, C. (eds), *Proceedings of the IXth World Congress on Human Reproduction*. Parthenon Publishing, Carnforth, Lancaster, in press.
- Wide, L. (1986) The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol.*, **112**, 336–344.
- Wide, L. (1989) Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J. Endocrinol.*, **123**, 519–529.
- Wide, L. and Bakos, O. (1993) More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885–889.
- Wide, L. and Hobson, B.M. (1986) Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. *Acta Endocrinol.*, **113**, 17–22.
- Zambrano, E., Olivares, A., Mendez, J.P. *et al.* (1995) Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 1647–1656.

Received on March 20, 1996; accepted on June 21, 1996

STUDIES IN FERTILITY SERIES

VOLUME 6

FSH Action and Intraovarian Regulation

The Proceedings of the IX Reinier de Graaf Symposium,
Noordwijk, The Netherlands, September 26-28, 1996

EDITED BY B. C. J. M. FAUSER

*The publication of this book has been made possible
by an educational grant from NV Organon*



The Parthenon Publishing Group
International Publishers in Medicine, Science & Technology

NEW YORK

LONDON

- containing the human common α and chorionic gonadotropin β subunits in tandem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2041-5
31. Maruyama, T., Iwata, C. and Fukui, O. (1985). Functional expression of yoked human chorionic gonadotropin in baculovirus-infected insect cells. *Mol. Endocrinol.*, **9**, 1720-6
 32. Faras, F. A., Suganuma, N., Nishimori, K., LaPolt, P. S., Hsueh, A. J. W. and Boime, J. (1992). Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin β subunit to follitropin β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4303-8
 33. Joshi, L., Murata, Y., Womelsdorf, F. E., Szkludlinski, M. W., Decal, R. and Weintraub, B. D. (1995). Recombinant thyrotropin containing a β -subunit chimera with the human chorionic gonadotropin- β carboxy-terminus is biologically active, with a prolonged plasma half-life: role of carbohydrate in bioactivity and metabolic clearance. *Endocrinology*, **136**, 3859-48
 34. Sugahara, T., Sato, A., Kudo, M., Ben-Menahem, D., Pixley, M. R., Hsueh, A. J. W. and Boime, J. (1996). Expression of biologically active fusion genes encoding the common α subunit and the FSH β subunit: role of a linker sequence. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10445-8
 35. Suganuma, N., Matzuk, M.M. and Boime, J. (1989). Elimination of disulfide bonds affects assembly and secretion of the human chorionic gonadotropin β subunit. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19302-7
 36. Furuhashi, M., Ando, H., Bicinska M., Pixley, M., Shikone, T., Hsueh, A. J. W. and Boime, J. (1994). Mutagenesis of cysteine residues in the human gonadotropin α subunit. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25543-8
 37. Cosovsky, L., Rao, V. S. N., Macdonald, G. J., Papkoff, H., Campbell, R. K. and Moyle, W. R. (1995). The groove between the α - and β -subunits of hormones with lutropin (LH) activity appears to contact the LH receptor, and its conformation is changed during hormone binding. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20011-19
 38. Moyle, W. R., Campbell, R. K., Rao, S. N., Ayral, N. G., Bernard, M. F., Han, Y. and Wang, Y. (1995). Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20020-31

Isoforms of circulating FSH

A. Ulloa-Aguirre, E. Zambrano, A. Olivares, C. Timossi,
J. Barrios-de-Tomas and J. P. Méndez

INTRODUCTION

Follicle stimulating hormone (FSH) is produced and secreted in multiple molecular forms by the anterior pituitary gland. The relative abundance of each isoform depends on the source of the sample and the physiological status of the donor at the time of collection'. Since post-translational oligosaccharide modifications distinguish most of the FSH isoforms, some changes in FSH isoform mixtures can be easily identified by their behavior on lectin affinity chromatography'. However, techniques that separate on the basis of charge (e.g. zone electrophoresis, isoelectric focusing and chromatofocusing) have yielded even higher resolution'. As a consequence of their structural differences, FSH isoforms differ in their ability to bind to target cell receptors, survive in the circulation and provoke a biological response *in vivo* and *in vitro*'.

Although the heterogeneity of FSH is well established, the functional significance of such a variety of isoforms for a single hormone remains unclear. However, the occurrence of significant changes in FSH charge isoform distribution at specific physiological times strongly suggests that FSH heterogeneity may have some important biological consequences. In this article we summarize and discuss some recent work assessing the biological activity and distribution of the intrapituitary and secreted human follicle stimulating isohormones.

PITUITARY FSH CHARGE ISOFORMS

In vivo and *in vitro* bioactivity

We and others have shown that the plasma kinetic behavior of intrapituitary FSH is highly dependent on the amount of sialic acid incorporated into its variants³⁻⁵. More acidic/sialylated isoforms have considerably longer plasma half-lives than their less acidic, poorly sialylated counterparts^{3,6}. Although these less acidic variants are cleared faster from the circulation, they exhibit

threefold higher receptor-binding/immunoactivity ratios than the more acidic forms⁹. However, the overall net *in vivo* effect of the different FSH glycoforms on biopotency, which depends on the interplay of several factors, including plasma half-life, receptor-binding affinity and signal transduction, is still unclear. Although charge differences among the FSH molecules, in particular due to variations in sialic acid content, is an important factor for the selective circulatory survival and *in vivo* bioactivity of the different forms of FSH⁹, this does not necessarily suggest that the effects of less acidic/sialylated analogs may be biologically weak *in vivo*. Less acidic isoforms may induce a potent, albeit shorter-lived, effect on the target cell. For example, recombinant human FSH (recFSH) expressed in Chinese hamster ovary cells is significantly less acidic than highly purified urinary FSH (uFSH)¹². Consequently, its *in vitro* biological activity, expressed as the biological to immunological (B/I) FSH ratio, is higher than that exhibited by urinary FSH (2.47 ± 0.21 vs. 1.99 ± 0.03 ; $p < 0.01$)¹², the less acidic FSH preparation, however, disappears faster from the circulation of rats (plasma half-life, 76 ± 12 min; clearance rate, 0.340 ± 0.09 ml/min) than the more acidic/sialylated urinary FSH compound (plasma half-life, 116 ± 11 min; clearance rate, 0.141 ± 0.01 ml/min)¹². Recent observations from our laboratory have indicated that in the phenobarbitone-blocked proestrus rat model, the less acidic FSH preparation (i.e. recFSH) induces maximal ovarian tissue-type plasminogen activator (tPA) enzyme activity earlier than uFSH. When phenobarbitone-treated rats were injected at 15.00 h of the proestrus day with a single intracardiac dose of recFSH, maximal levels of tPA mRNA and tPA enzyme activity were detected 1 and 2 h after the FSH injection, respectively, whereas in those animals treated with the same dose of the more acidic/sialylated FSH compound (uFSH) maximal levels of tPA mRNA and tPA enzyme activity were achieved 2 and 5 h after the injection, respectively. Despite this time-related difference, 100% of the animals in each FSH-treated group ovulated. These findings suggest that, despite markedly accelerated plasma disappearance rates, less sialylated FSH isoforms may function as full agonists, capable of stimulating full gonadal responses.

Several studies have attempted to analyze the *in vitro* biological activity of the different intrapituitary FSH isoforms^{13,14,15}. Since the majority of these studies have employed the B/I ratio as an index of the relative *in vitro* biological activity, their results have been controversial. Such discrepancies have been attributed to the use of receptor-binding assays, bioassays and immunoassays with different specificities and sensitivities, standard preparations of variable molecular composition and sensitivities, standard different epitope specificity¹⁶⁻¹⁸. We have recently re-examined this issue employing both a heterologous bioassay that tests the ability of FSH to induce aromatization of androgen by cultured rat granulosa cells and a homologous assay that employs the embryonic kidney-derived 293 cell line expressing the human FSH receptor which has been optimized to produce adenosine

3',5'-monophosphate (cAMP) as end measure^{14,15}. To minimize some of the potential problems related with differences in antibody recognition or epitope specificity, we determined the amount of isoforms to be analyzed in these *in vitro* bioassays by using three different immunoassay systems: a radioimmunoassay (RIA), an enzyme-linked immunoassay (EIA) and an immunoradiometric assay (IRMA). In all studies, the molecularly heterogeneous LER-907 pituitary luteinizing hormone (LH)/FSH preparation was employed to construct the standard curves¹⁶. Glycoprotein-enriched human anterior pituitary extracts were separated by high-resolving chromatofocusing columns (column dimensions, 90×1.5 cm). Approximately 20 immunoreactive FSH isoforms were obtained by this procedure; each isoform or pool of neighbouring isoforms (elution pH values of > 7.10 - 3.80 and < 3.8 - 3.0) were concentrated by dialysis and freeze-drying and then analyzed for immunoactivity and bioactivity at multiple dose levels, by means of the methods described above.

All isoforms exhibited parallel dose-response curves in the immunoassay and bioassay systems employed, with the exception of the more basic FSH isoform, which was barely detected by the EIA. The relative *in vitro* biological activity of FSH, expressed as the B/I ratio (B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios), varied with the elution pH value of the particular FSH isoform tested. Regardless of the immunoassay or bioassay method employed, less acidic FSH isoforms exhibited higher B/I ratios than their more acidic counterparts: B/I ratios for isoforms with elution pH values of $> 4.5 = 1.15 \pm 0.08$ to 0.99 ± 0.10 (rat aromatization bioassay), and 2.96 ± 0.95 to 2.20 ± 0.25 (human cAMP production bioassay); ratios for isoforms with pH values of $< 4.5 = 0.71 \pm 0.06$ to 0.47 ± 0.05 (rat assay), and 1.80 ± 0.26 to 1.10 ± 0.09 (human assay) ($p < 0.05$ vs. their corresponding ratios for isoforms with pH > 4.5)¹⁶. Furthermore, significant direct relationships between the B/RIA, B/EIA and B/IRMA ratios and the elution pH value of the isoforms were identified by regression analysis¹⁶. However, a major discrepancy between the two bioassays was observed. The more basic isoform (pH > 7.10) consistently exhibited the highest B/I ratios (B/RIA and B/IRMA) in the human assay, whereas in the rat aromatization assay it showed a lower activity than that observed for isoforms with pH values of 6.60 to 5.53. This and other minor discrepancies between the results yielded by the heterologous and homologous FSH assays may be secondary to the different abilities of the individual bioassays to identify subtle aspects of the molecular structure of FSH, mainly those related to its carbohydrate chains; variations in oligosaccharide composition may account for differences in the affinity of the isoforms for the human and the rat FSH receptor or their ability to activate it and establish signal transduction. On the other hand, these discrepancies may be related to the particular features of the rat granulosa cell and the human FSH receptor-transfected 293 cell systems. Whereas the former may yield both intermediate (e.g. cAMP) and end products (17 β -

estradiol, inhibin, etc.) in response to the FSH stimulus, the latter has been maximized for cAMP production. Therefore, neither steps post-cAMP nor involvement of other second messenger systems or even variant FSH receptor populations, which may eventually lead to agonistic or antagonistic outcomes, are considered^{14,15,16}. In fact, dissociations between cAMP and end product relationships have been recently demonstrated in primary cell cultures employing deglycosylated FSH analogs¹⁷. Using rat granulosa cell cultures, we have also found that differences in *in vitro* biopotency between two distinct FSH variants may be identified more clearly and earlier by determining the amount of end products (e.g. estrogens) rather than just the production of a second messenger (Figure 1). These results confirm and extend previous observations regarding the existence of a significant relationship between the relative *in vitro* B/1 ratios and the charge borne by FSH and its corresponding isoforms^{14,15,16}.

CIRCULATING FSH ISOFORMS

Almost all intrapituitary human FSH isoforms may be found in circulation¹. Their number and relative abundance, however, will depend on the sex, age and endocrine status of the donor (Figures 2 and 3)^{2,3,18}. In serum, the full spectrum of FSH variants includes isoforms with basic and strongly acidic pH values; the major proportion of FSH isoforms or the bulk of FSH immunoreactivity are detected at pH values of < 5.5¹. Serum isoforms may be even more acidic than the intrapituitary analogs, particularly when they are isolated from serum specimens of adult men (Figure 3) or from samples of women during the early follicular and mid-luteal phases of the menstrual cycle (Figure 2)^{2,3,18}. This apparent discrepancy in the proportions between stored and secreted isoforms may be attributed to selective survival in the circulation of the more acidic analogs¹⁴. However, in some physiological conditions (e.g. during the precovulatory phase of the menstrual cycle) and pharmacological conditions (e.g. after administration of exogenous gonadotropin releasing hormone (GnRH)), the distribution of circulating isoforms may be very similar to that present in the pituitary^{2,3,18,19}.

Changes in FSH charge isoform distribution during the menstrual cycle and their impact on the duration and intensity of the blood FSH signal delivered to the gonad

In cycling women, a selective increase in the relative abundance of less acidic circulating FSH isoforms during the late follicular phase and mid-cycle of the menstrual cycle has been consistently detected (Figure 2)^{2,3,18,19}. Employing zone electrophoresis to fractionate serum FSH, Wide and Bakos²⁴ found a significant release of less acidic FSH isoforms at the time of the mid-cycle surge, confirming early studies performed with a small subset of

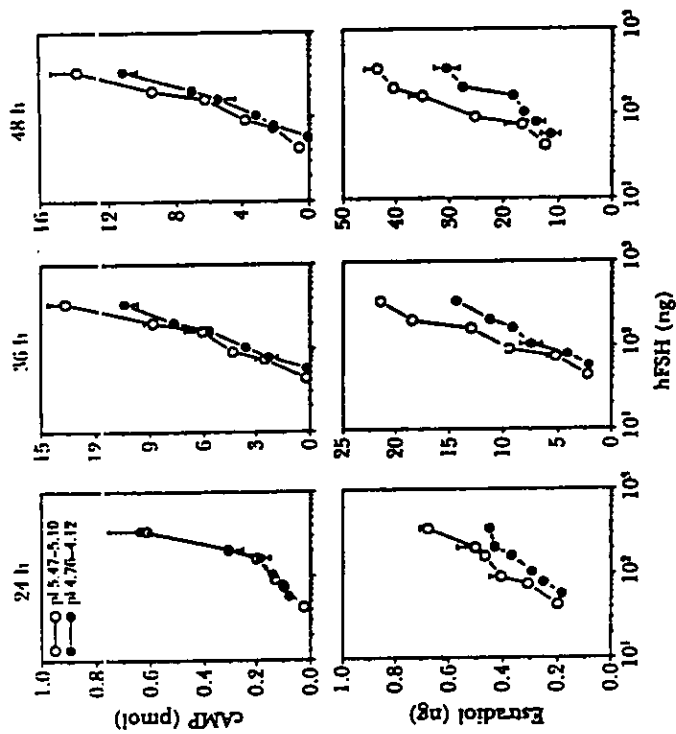


Figure 1 The ability of human follicle stimulating hormone (hFSH) isoforms with isoelectric points of 5.47-5.10 (open circles) and 4.76-4.12 (filled circles) to induce adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) and estradiol production by rat granulosa cells in culture. The dose is expressed in terms of the LER-907 standard (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), Bethesda, MD, USA) as measured by radioimmunoassay. Granulosa cells from 21-day old rats were cultured as described by Jia and Isaac²⁰. Cell monolayers were exposed to increasing concentrations of the isoforms for 48 h. After 24, 36 and 48 h of incubation, an aliquot of medium was removed and the amount of cAMP and estradiol produced *in vitro* were determined by radioimmunoassay²¹. Note that the differences in biological activity between the two FSH isoforms are more clearly and earlier defined when estradiol production was measured as the end point

subjects, with chromatofocusing used as the separation technique²⁵. Therefore, under conditions characterized by both a high estrogen milieu and increased GnRH pituitary exposure (i.e. the precovulatory phase of the menstrual cycle), a selective increase in the release of less acidic FSH isoforms occurs.

To study in more detail the relationship between increased estrogen levels and GnRH-stimulated pituitary FSH release and the secretion of less acidic/sialylated isoforms, we analyzed physiological changes in the relative

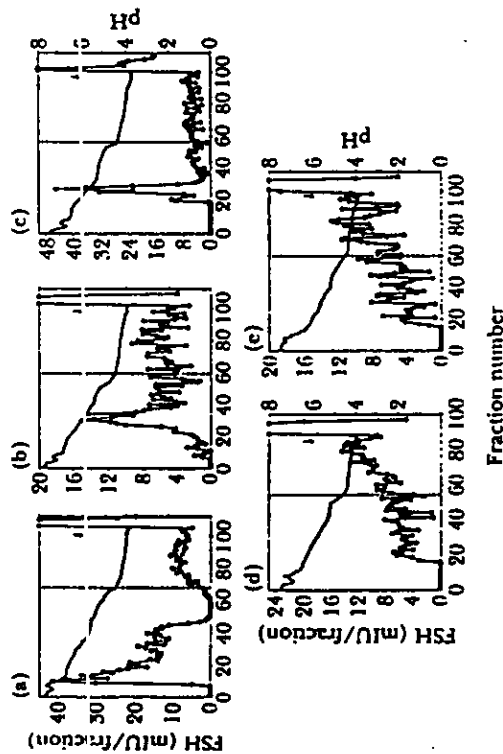


Figure 2 (Top) Distribution of serum FSH isoforms after chromatofocusing of serum samples collected from a normal woman studied at mid-cycle (presumptive day of ovulation) of her menstrual cycle. The profiles of samples obtained in baseline conditions (a) as well as after 10 µg (b) and 90 µg (c) of GnRH administration are shown (see text for details). (Bottom) Chromatofocusing profiles of serum FSH present in baseline samples collected from the same woman during the mid-follicular (d) and mid-luteal (c) phases of the same cycle. In each profile, the vertical broken line separates isoforms eluted at pH values below 4.5 from those recovered at a pH above 4.5. Arrows indicate the addition of 1 mol/l NaCl to the chromatofocusing columns. Note the increasing amounts of FSH recovered at pH values > 4.5 in samples from the mid-cycle. From reference 26, with permission from The Endocrine Society

Table 1 The ratios (mean ± SEM) of serum FSH isoforms with eluent pH values of < 4.5/> 4.5 in normal women and men

| Subjects | FSH isoforms ratio | | |
|------------------|--------------------|------------|------------|
| | Basal | 10 µg | 90 µg |
| Women | | | |
| follicular phase | 7.3 ± 0.8* | 7.5 ± 1.0* | 4.7 ± 0.9* |
| mid-cycle phase | 3.2 ± 0.4† | 2.9 ± 0.3† | 2.6 ± 0.9† |
| luteal phase | 6.1 ± 0.8† | 4.9 ± 0.6* | 5.7 ± 0.7* |
| Men | 6.2 ± 0.9† | 5.0 ± 0.6* | 4.7 ± 0.2* |

Means identified by different superscript symbols in the same column are statistically different (*p* < 0.05)

distribution of FSH isoforms circulating under baseline conditions throughout the ovarian cycle as well as the forms discharged by GnRH stimulation from putative acutely releasable and reserve pituitary pools²⁶. Normally menstruating women underwent frequent blood sampling during the early or mid-follicular phase, late follicular phase to mid-cycle and mid-luteal phase of an ovulatory cycle. Blood samples were withdrawn before and after the intravenous administration of 10 and 90 µg GnRH and the serum FSH isoforms were separated by preparative chromatofocusing. In addition, GnRH-stimulated FSH pulses were analyzed for secretory burst mass, secretory burst amplitude, integrated FSH concentrations and endogenous FSH half-life by deconvolution techniques. In all cycle phases studied, but particularly during the follicular and luteal phases, serum FSH isoforms were predominantly acidic. However, the relative abundance of more acidic isoforms, particularly those with pH values below 4.5, present under baseline conditions and released in response to exogenous GnRH, decreased dramatically during the mid-cycle phase compared to that in the follicular and luteal phases, such that the release of more basic isoforms predominated (Figure 2 and Table 1). As previously reported²⁶, the magnitude of the pituitary FSH response to exogenous GnRH was significantly higher during the mid-cycle phase. Significant inverse relationships among key secretory parameters (FSH secretory burst mass and amplitude), serum FSH peak area of the exogenous GnRH-induced FSH pulses and the changes in serum FSH isoform distribution were identified (Figure 4). Thus, with higher pituitary FSH responsiveness to exogenous GnRH, the shift to less acidic serum isoforms was more pronounced. The observation that the administration of GnRH during the follicular and luteal phases induced only minor changes in the distribution of the serum isoforms (Table 1) suggests that, at least during these phases of relatively reduced pituitary FSH sensitivity to GnRH,

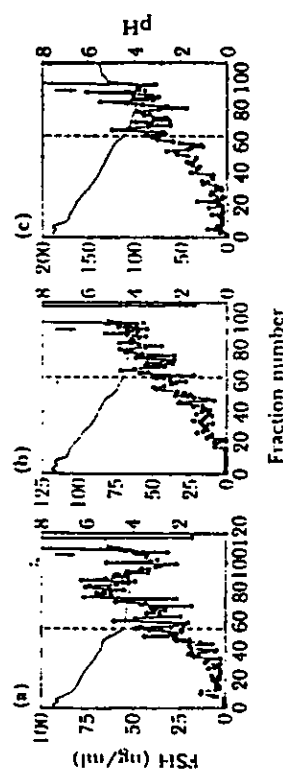


Figure 3 Distribution of serum FSH isoforms after chromatofocusing of serum samples collected from an adult man. The profiles of samples obtained in baseline conditions (a) and after 10 µg (b) and 90 µg (c) GnRH administration are shown. In each profile, the vertical broken line separates isoforms eluted at pH values below 4.5 from those recovered at a pH above 4.5. Arrows indicate the addition of 1 mol/l NaCl to the chromatofocusing columns

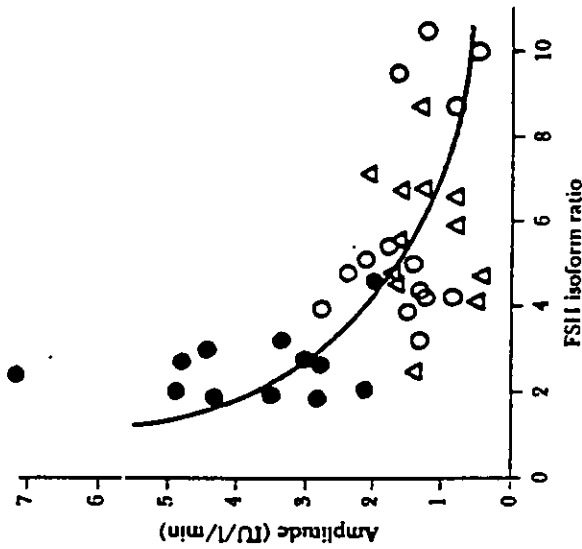


Figure 4 Relationship between calculated FSH secretory amplitude of exogenous GnRH-induced FSH concentration pulses and relative serum FSH charge isoform distribution ($\text{pH} < 4.5 / > 4.5$ ratios) during the follicular (open circles), preovulatory (filled circles) and luteal (triangles) phases of the menstrual cycle ($r = -0.650$; $p < 0.001$). Each point represents an individual FSH pulse induced by a low (10 μg) or high (90 μg) GnRH dose. Data derived from seven women studied, as described in the text. From reference 25, with permission from The Endocrine Society

gonadotrophs preferentially synthesize and secrete sialic acid-enriched FSH molecules. On the other hand, the finding that the magnitude of the selective increase in the relative abundance of less acidic/sialylated FSH isoforms present in baseline conditions at the mid-cycle phase was not modified by the low and high-dose GnRH challenges (Table 1) indicates that the presence of an increased abundance of less acidic isoforms during this cycle phase is not apparently the result of structural changes in the more acidic isoforms occurring after secretion. The data collectively indicate that under conditions characterized by both a high estrogenic milieu and increased GnRH-stimulated pituitary FSH release, a selective increase in the release of less acidic FSH isoforms occurs.

As previously mentioned, less acidic intracellular FSH isoforms exhibit considerably shorter plasma half-lives and higher *in vitro* biological potencies than their more acidic, heavily sialylated counterparts^{25,27}. If significant changes in the molecular structure of FSH unequivocally occur during the menstrual cycle^{25,27,31}; and if it is assumed that the biological features of

individual inrapituitary FSH isoforms are preserved after being released from the pituitary gland (an issue still to be documented), then variations in the duration and intensity of the blood FSH signal delivered to the ovary throughout the menstrual cycle is to be expected. In the study described above²⁶, we found by deconvolution analysis of endogenous FSH pulses released by both low (10 μg) and high (90 μg) GnRH doses administered during the early follicular and mid-luteal phases (both phases associated with the release of predominantly acidic FSH isoforms), that the estimated half-life of circulating FSH was similar to values previously found in hypopituitary men (mean half-life, approximately 4.6 h²⁶) after the injection of urinary FSH from postmenopausal women (which contains predominantly acidic FSH isoforms^{2,4}). In contrast, the increased concentrations of less acidic FSH isoforms observed at mid-cycle were temporarily associated with a marked decrease in the calculated plasma half-life of FSH released in response to exogenous GnRH (Figure 5). This finding is in accordance with data showing that the half-life of human FSH secreted 2-3 days prior to ovulation is considerably shorter than that secreted during the early follicular phase, when this is assessed *in vivo* by deconvolution analysis of spontaneous FSH release profiles²⁶. Based on the observation that estrogen treatment of postmenopausal women shifts the distribution of serum FSH molecules from relatively more acidic to relatively less acidic³¹ as well as on the demonstration that estrogen infusion leads to a shortening of the endogenous FSH plasma half-life in men²⁷, the results described above are consistent with the presence of altered post-translational processing of FSH molecules during the periovulatory period. Failure to observe similar changes in the molecular structure and plasma kinetic behavior of serum FSH during the mid-luteal phase (a time of high estradiol output) might be due to the co-existence of increased progesterone and/or inhibin levels, which in turn may counterbalance the effects of both endogenous estrogens and GnRH on the molecular structure of FSH^{25,27}.

Data are rather contradictory on the impact of such a sequence of changes in FSH heterogeneity during the human menstrual cycle on the intrinsic biological activity of circulating FSH as assessed *in vitro* through heterologous bioassays (aromatization of androgen by cultured rat granulosa or Sertoli cells^{25,27}) and more recently by homologous assays (cells expressing the human FSH receptor)²⁸. Results from granulosa cell bioassays are highly variable, with B/1 ratios in serum reported as constant throughout the cycle²⁷ or high during the early follicular phase²⁸. On the other hand, the use of the Sertoli cell assay has unmasked the presence of higher B/1 ratios during the late follicular and mid-cycle phases than during the early follicular and luteal phases of the menstrual cycle²⁸. This finding correlates well with the significant increase in the secretion of less acidic isoforms occurring during the preovulatory period^{25,26} and after estrogen administration to hypogonadal women²⁵. Moreover, similar increases in serum FSH B/1 ratios

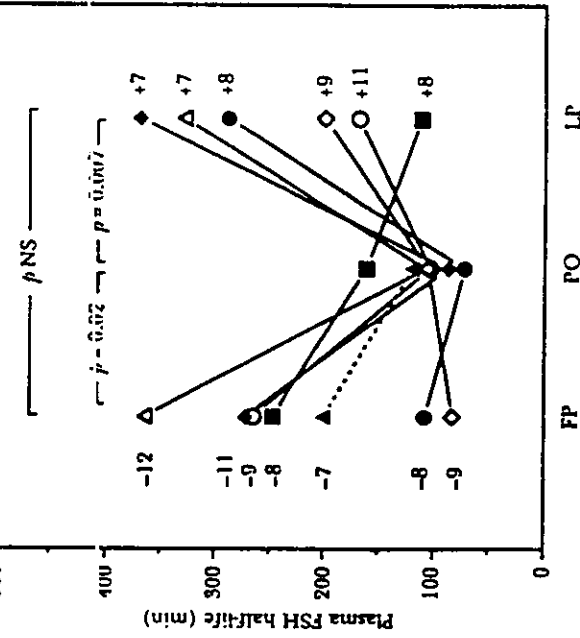


Figure 5 Changes in calculated plasma half-life of FSH released in response to 10 μ g GnRH administration in six women studied during the follicular (FP), preovulatory (PO) and luteal (LP) phases of their menstrual cycle and in one subject in whom this kinetic parameter was able to be determined only during the FP and PO (filled triangles). Numbers adjacent to symbols indicate the presumptive cycle day of the subject, with the probable day of ovulation considered as the reference point (day 0). For PO: open circle and open triangle, day -2; filled circle and filled diamond, day -1; open diamond, filled square and filled triangle, day 0. The levels of significance for comparisons among the three cycle phases are shown at the top. From reference 25, with permission from The Endocrine Society

during the preovulatory period have been reported for monkeys³⁹ and ewes⁴⁰. In contrast to all these findings, an increase in FSH B/1 ratio during the mid- to late luteal phase of the cycle was recently reported from the use of a homologous human FSH bioassay that employed cAMP generation as the end point⁴¹. All these discrepancies do not allow, at the present time, the drawing of definitive conclusions regarding the relationship between variations in serum FSH heterogeneity and changes in the FSH biological signal during the menstrual cycle. In fact, available studies do not yet distinguish between increased secretion of more basic isoforms and decreased immunogenicity of FSH epitopes retained in the circulation as the relevant mechanism for relatively increased FSH B/1 ratios in blood during a specific stage of follicular development. Other possible explanations

for these contradictory observations have been extensively discussed elsewhere¹.

In conclusion, the molecular structure of serum FSH varies significantly throughout the human menstrual cycle. At times of increased estradiol output and enhanced pituitary sensitivity to GnRH (i.e. during the preovulatory phase), the anterior pituitary gland produces and releases more basic FSH isoforms. The resultant shift towards less acidic/sialylated isoforms during this particular phase alters the survival time of this gonadotropin in the circulation. Further studies are required to determine the impact of these temporal changes in the molecular structure of FSH on the overall net *in vivo* biological effects of the hormone.

Serum FSH charge isoform distribution in men

The median charge of intrapituitary human FSH in both prepubertal and adult males is more negative than in females of the corresponding ages⁴². In serum, FSH is also more acidic in pubertal boys than in pubertal girls⁴³. The charge distribution of serum FSH isoforms in adult men is predominantly acidic and very similar to that found in women during the early follicular and mid-luteal phases of the menstrual cycle (Figure 3 and Table 1)^{25,38}. Consecutive administration of low and high GnRH doses to adult men did not induce detectable effects on serum FSH charge isoform distribution as disclosed by chromatofocusing fractionation (Figure 3). In pubertal boys, however, a significant shift to more basic FSH isoforms has been observed after exogenous GnRH administration⁴³, thus suggesting that the effects of GnRH upon serum FSH charge isoform distribution in males may be age-dependent. Additional evidence indicating that GnRH exposure does not alter the molecular composition of FSH in men comes from a recent study performed on sexually mature male individuals. Five adult subjects aged 23-32 years as well as four boys at Tanner stage 4, with serum testosterone levels within the adult normal range, were blood sampled every 10 min for a total of 10 h. At the beginning of the third hour, subjects received a rapid intravenous bolus of 10 μ g GnRH and, 4 h later, a second GnRH bolus containing 90 μ g of the decapeptide. Serum samples corresponding to each 2-h period were pooled and analyzed for FSH content by RIA and by the homologous *in vitro* bioassay described above^{44,45}. As shown in Figure 6a, the dose-response curves elicited by the different serum pools were very similar and the resultant B/1 FSH ratios did not differ significantly from each other (Figure 6b).

These and other previous observations in experimental animals^{21,46} indicate that, in contrast to a 'cyclic' type of hypothalamic-pituitary-gonadal activity, such as that present in normally ovulating women, a 'tonic' or male type of activity is more associated with the secretion of highly acidic/sialylated

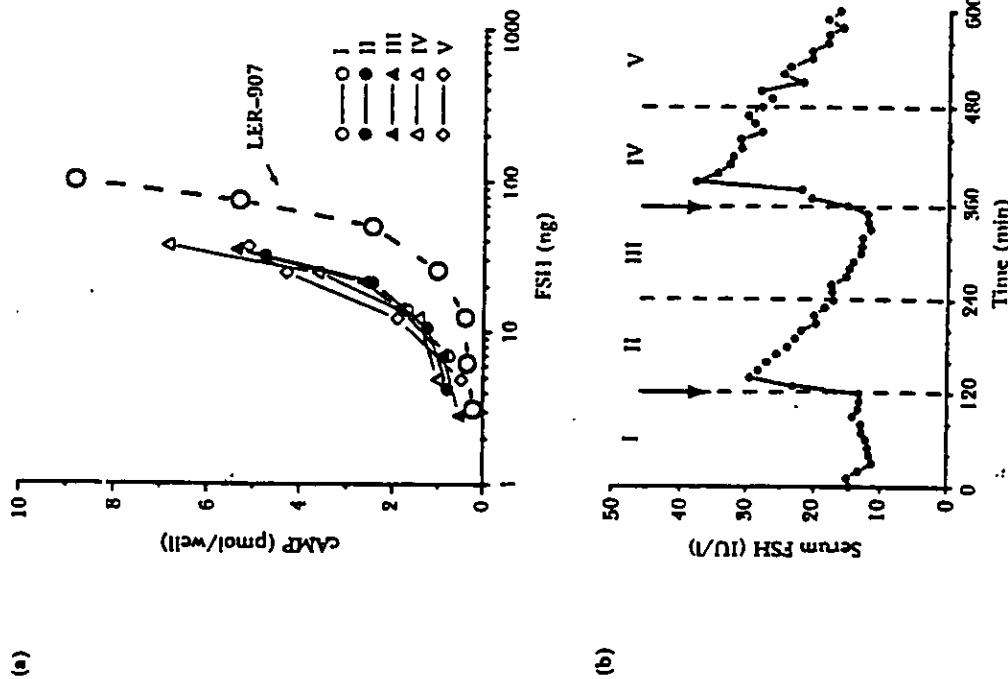


Figure 6 (a) The ability of increasing doses of FSH present in the circulation of an adult man (Tanner stage 5; testosterone level 21.2 nmol/l), blood sampled every 10 min for 10 h, to induce cAMP production by 293 cells expressing the recombinant human FSH receptor. Pool of samples collected at baseline (I); samples collected during the first (II) and the last (III) 120 min following the intravenous administration of 10 µg GnRH (first arrow from left to right in (b)); samples collected during the first (IV) and last (V) 120 min following 90 µg GnRH administration (second arrow in (b)). The dose is expressed in terms of the LER-907 standard (NIDDK) as measured by radioimmunoassay. The dispersion around each mean is omitted for clarity. *Continued*

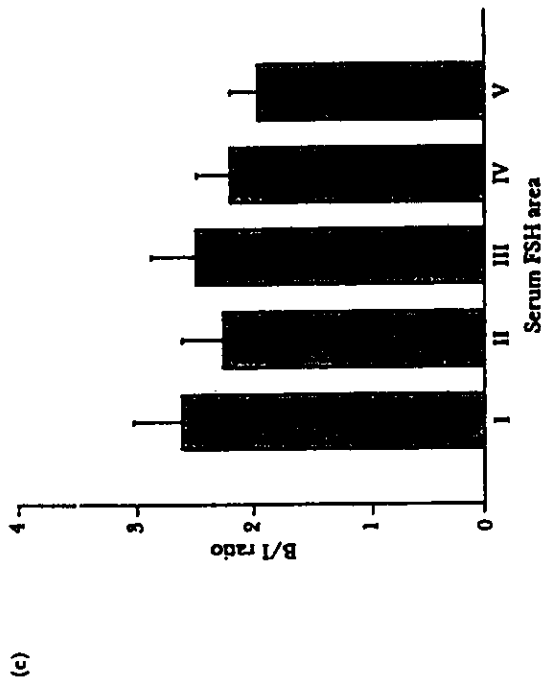


Figure 6 *Continued*

(b) Serum FSH response to consecutive administration of low (10 µg) and high (90 µg) GnRH doses (arrows) in the same subject. Serum FSH levels were determined by a time-resolved immunofluorometric assay. Aliquots of samples from each 120-min study period (I-V, delineated by the vertical broken lines) were pooled and assayed at increasing dose levels by the *in vitro* cAMP production assay. (c) The biological to immunological (B/I) ratio (mean ± SD) of serum FSH from nine sexually mature male individuals. Each bar represents the B/I ratio of a set of pooled samples collected during the different study periods shown in (b)

FSH isoforms. Whether the production and secretion of predominantly acidic FSH isoforms in men are due to the androgen-enriched milieu or to the coexistence of a relatively low estrogenic environment still remains to be clarified.

PHYSIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF FSH HETEROGENEITY

From this discussion, based mostly on limited studies addressing changes in the charge distribution of circulating FSH isoforms and their correlation with changes in FSH plasma kinetics and *in vitro* bioassay estimates, it is clear that FSH circulates as a mixture of several heterogeneous forms and that the type (and probably the intensity) of the gonadotropic stimulus is regulated by the prevailing endocrine milieu. The data derived from studies in ovulating women^{23,24} are compatible with the hypothesis that less sialylated,

shorter-lived FSH isoforms are preferentially secreted during the preovulatory period, thus suggesting the existence of regulatory mechanisms that control both the intensity and the duration of the FSH signal during the course of regulated follicular growth and maturation. The increased release of less acidic FSH isoforms during the late follicular period may provide the necessary drive for the growth and development of the preovulatory follicle. These isoforms may also participate in periovulatory events such as the induction of plasminogen activator, which, through activating plasmin, leads to the breakdown of collagen in the ovulating follicle⁶⁵. Alternatively, these less acidic isoforms may be involved in other functions related to the meiotic and developmental capacity of the oocyte⁶⁶. On the other hand, the release of predominantly acidic isoforms may be more necessary during critical times in the FSH-dependent recruitment and maturation of the cohort of follicles that includes the follicle destined to ovulate. A 'tonic' release of these acidic, long-lived isoforms may also be more suitable to maintain spermatogenesis and reproductive competence in men.

Some pharmacological studies and pathophysiological findings support a functional role for FSH pleomorphism. Qualitative changes in FSH appear to be the inevitable outcome of treatment with GnRH antagonists during contraceptive studies. GnRH antagonist treatment suppresses biologically active FSH more than immunoreactive FSH, leading to decreased B/I ratios in both men and women^{67,68}. This is particularly important, because Dahl and colleagues⁶⁹ have demonstrated that GnRH antagonists induce the production and secretion of basic FSH isoforms with antagonistic activity in hypogonadal women. In fact, we have recently confirmed the existence of such a particular basic FSH isoform that behaves as a natural anti-hormone¹⁹. This FSH-like molecule (which is present in low quantities in glycoprotein-enriched pituitary extracts¹⁹), was recovered from eluates containing those FSH components that flowed unrestricted through large (90 x 1.5 cm) chromatofocusing columns (elution pH value > 7.3). After LH removal by affinity chromatography, the fractions containing this basic FSH variant (FSH₁) completely lost their ability to induce aromatization of androgens by cultured rat granulosa cells (Figure 7), thus indicating that the activity previously detected¹⁹ was probably triggered by the extremely high amounts of LH that co-eluted with FSH₁ during the chromatofocusing procedure. However, co-incubation of this basic FSH₁ variant with highly purified FSH resulted in a complete inhibition of FSH-mediated estrogen production (Figure 7). Similar results were found when rPA enzyme activity was measured as the end point. The inhibitory effects of this naturally occurring antagonist are apparently exerted at steps following cAMP activation, since in terms of this second messenger production FSH₁ behaved as an agonist of highly purified FSH¹⁹. Further, these inhibitory properties of FSH₁ do not involve protein kinase C activation, since induction of both estrogen production and rPA enzyme activity was not restored by staurosporine, a protein kinase

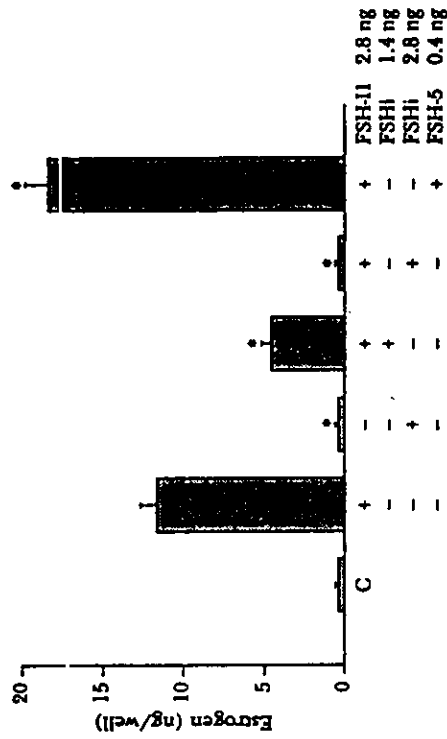


Figure 7 Estrogen production by cultured rat granulosa cells incubated for 48 h in the presence (+) or absence (-) of a highly purified FSH standard (FSH-I, NIDDK), a basic FSH isoform (pH > 7.3) with FSH inhibitory properties (FSH₁) or an acidic FSH isoform (pH < 3.8, coded as FSH-5). Note the inhibition of FSH-I induced estrogen production by the low and high doses of FSH₁. FSH-5 behaved as agonist for FSH-II. C, unstimulated cells. **p* < 0.01 vs. FSH-II alone

C inhibitor. In contrast to FSH₁, the agonistic effects, in terms of both aromatization and rPA enzyme activity induction, of the other more acidic isoforms (those recovered within the pH window of the chromatofocusing procedure (pH 6.5-3.8) as well as that bound at the lower limiting pH (pH < 3.8)) were unaffected by LH removal. Although the significance of this finding is at present unclear, it is tempting to speculate that in some physiological conditions (e.g. the preovulatory phase of the menstrual cycle) this natural anti-hormone may function as a fine-tuning, regulator of the intensity of the gonadotropic signal to avoid overstimulation of the growing follicle. Conversely, abnormally elevated levels of this FSH₁ may counteract in excess the physiological gonadotropic stimulus and eventually lead to a hypogonadotropic state. In fact, a case of a young woman with normal ovulatory menstrual cycles, infertility and low B/I FSH ratios was recently reported⁷⁰. Of her serum FSH, 65% eluted in a pH range above 6.0 and, in terms of estradiol production *in vitro*, had compromised bioactivity. What this abnormal production of basic FSH isoforms means in terms of FSH-induced *in vivo* functions, and whether it was the cause or the consequence of her infertility, is a matter of speculation at this time.

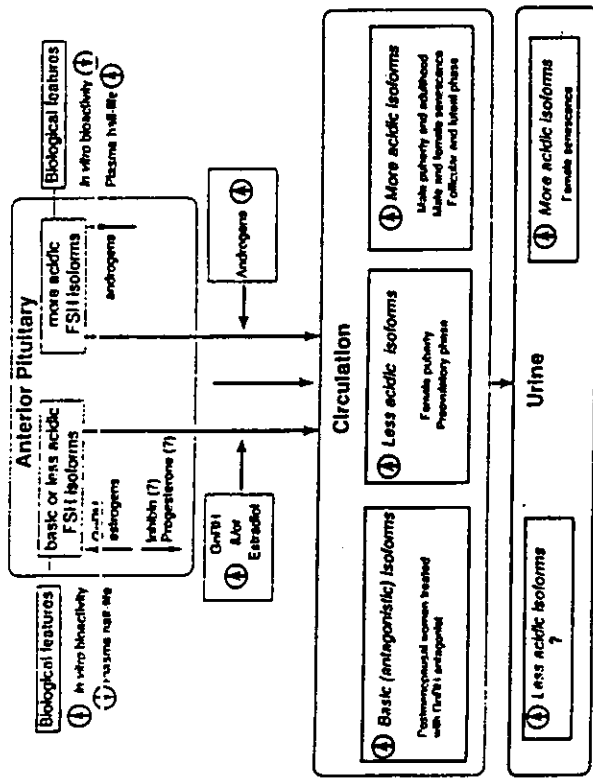


Figure 8 Schematic summary of the biological attributes and distribution of FSH isoforms in the pituitary, circulation and urine as dictated by various neuroendocrine factors and the physiological states. From reference 1, with permission from The Endocrine Society

CONCLUSIONS

A schematic summary of the distribution, biological features and endocrine regulation of FSH isoforms is presented in Figure 8. It is clear that the anterior pituitary gland possesses the capacity to modify not only the quantity but also the quality of the FSH stimulus, and that these changes in type of gonadotropic signal are regulated through a concerted action between the pituitary gland, the gonad and the hypothalamus. From this perspective, FSH pleomorphism may be representing an additional fine-tuning mechanism through which the anterior pituitary gland controls several gonadal functions.

Many aspects of FSH multiplicity require further investigation. It is still necessary to elucidate the relationship between changes in isoform distribution and modifications in the biological attributes of circulating FSH during different physiological and pathological conditions. Special emphasis must be given to those cases with unexplained infertility, since the analysis of serum FSH isoform distribution may unmask the cause of their hypogonadism¹¹. Extraction of serum FSH from subjects in different states

and subsequent testing in different immunoassays and bioassays with multiple end points¹⁰ would be a useful approach for a full understanding of the functional significance of FSH heterogeneity. If the structure of the main natural FSH isoforms is fully determined and if the phenomenon of FSH multiplicity eventually proves to be biologically important from a regulatory point of view, it should be possible to design different FSH analogs for desired functions: for example, more potent and short-lived forms for acute dynamic events, such as ovulation, or antagonistic FSH variants, potentially of use in fertility regulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work described from the authors' laboratory was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) (to Alfredo Ulloa-Aguirre and Juan Pablo Méndez), and by grants from the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH, Mexico) and the Rockefeller Foundation (New York, NY) (to Alfredo Ulloa-Aguirre). Juan Pablo Méndez and Aleida Olivares are investigators at the Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI, IMSS, México D.F.; Carlos Timossi is associate investigator at the Department of Pharmacology, Universidad Nacional Autónoma de México School of Medicine, México. Alfredo Ulloa-Aguirre is currently recipient of a Fogarty International Center-National Institutes of Health Fellowship Award (TW/HD 00668) at the Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oregon, USA.

REFERENCES

1. Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A. R., Deltins, I. Z. and Padmanabhan, V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.*, **16**, 765-87
2. Papandreou, M.-J., Asteria, C., Peterson, K., Ronin, C. and Beck-Peccoz, P. (1993). Concavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 1008-13
3. Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P., Jiménez, M., Zambrano, E. and Díaz-Sánchez, V. (1992). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, **7**, 23-30
4. Ulloa-Aguirre, A., Damián-Matsumura, M., Jiménez, M., Zambrano, E. and Díaz-Sánchez, V. (1992). Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum. Reprod.*, **7**, 1371-8
5. Wide, L. and Hobson, B. M. (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

6. Wide, L. (1986). The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **112**, 336-44
7. Lambert, A., Rodgers, M., Mitchell, R., Wood, A. M., Warde, C., Fritton, D. and Robertson, W. R. (1995). *In-vitro* biopotency, and glycoform distribution of recombinant human follicle-stimulating hormone (Org 32489), Metrodin and Metrodin-HP. *Hum. Reprod.*, **10**, 1928-35
8. Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C., Olivares, A., Quintanar, A., Aguinaga, M., Diaz-Cueto, L. and Méndez, J.P. (1995). On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of urofollitropin. *Arch. Med. Res.*, **26**, S219-30
9. Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Zambrano, E., Danián-Matsumura, M., Quintanar, A., Musti, N. and Domínguez-González, R. (1996). Physicochemical and biological attributes of recombinant follicle-stimulating hormone. In Coutifaris, C. and Mastroianni, L. Jr (eds.) *New Horizons in Reproductive Medicine, Proceedings of the IX World Congress on Human Reproduction*. (Carnforth, UK: Parthenon Publishing) in press
10. Burgon, P. G., Robertson, D. M., Stanton, P. G. and Iearn, M. T. W. (1993). Immunological activities of highly purified isoforms of human FSH correlate with *in vitro* bioactivities. *J. Endocrinol.*, **139**, 511-18
11. Simoni, M., Jockenhövel, F. and Nieschlag, E. (1994). Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J. Endocrinol.*, **141**, 359-67
12. Dahl, K. D. and Stone, M. P. (1992). FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J. Androl.*, **13**, 11-22
13. Simoni, M., Jockenhövel, F. and Nieschlag, E. (1993). Biological and immunological properties of the international standard for FSH 83/575: isoelectrofocusing profile and comparison with other FSH preparations. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **138**, 281-8
14. Tilly, J. L., Aihara, T., Nishimori, K., Jia, X.-C., Billing, H., Kowalski, K. I., Perlaz, E. A. and Hsueh, A. J. W. (1992). Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology*, **31**, 799-806
15. Zambrano, E., Barrios-de-Tomás, J., Cárdenas, M. and Ulloa-Aguirre, A. (1996). Studies on the relative *in-vitro* biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Mol. Hum. Reprod.*, **21**, 563-71
16. Chappell, S. C., Bashley, H. M. and Snyder P. J. (1986). Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **113**, 311-16
17. Grinnell, J., Dankbar, B., Sharma, R. S. and Nieschlag, E. (1993). Molecular cloning of the testicular follicle-stimulating hormone receptor of the non human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1066-72
18. Dahl, K. D., Bicsak, T. and Hsueh, A. J. W. (1988). Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Society*, **239**, 72-4
19. Timossi, C., Barrios-de-Tomás, J., Zambrano, E., González, R. and Ulloa-Aguirre, A. (1996). The least acidic isoform of human follicle-stimulating hormone (FSH) behaves as an antagonist of FSH action *in vitro*. Presented at the 4th International Pituitary Congress, San Diego, June
20. Padmanabhan, V., Kersey, K. A., Sairam, M. R., Cole, L. A., Ireland, J. J. and Beitins, I. Z. (1993). A multiple endpoint bioassay to assess physiological relevance of FSH heterogeneity. Presented at the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society, Las Vegas, June
21. Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Danián-Matsumura, P. and Chappel, S. C. (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum. Reprod.*, **3**, 491-501
22. Wide, L. (1982). Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **55**, 682-8
23. Padmanabhan, V., Lang, L. L., Sonstein, J., Kelch, R. P. and Beitins, I. Z. (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**, 465-73
24. Wide, L. and Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 885-9
25. Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Olivares, A., Diaz-Cueto, L., Méndez, J. P. and Veldhuis, J. D. (1994). Dynamics of serum FSH isoform distribution during the menstrual cycle. Presented at the 76th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim, June
26. Zambrano, E., Olivares, A., Méndez, J. P., Guerrero, L., Díaz-Cueto, L., Veldhuis, J. D. and Ulloa-Aguirre, A. (1995). Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 1647-56
27. Wide, L. and Albertson-Wikland, K. (1990). Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 271-6
28. Wang, C. F., Lashley, B. L., Lein, A. and Yen, S. S. C. (1976). The functional changes of the pituitary gonadotropes during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **42**, 718-25
29. Urban, R. J., Padmanabhan, V., Beitins, I. Z. and Veldhuis, J. D. (1991). Metabolic clearance of human follicle-stimulating hormone assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay, and *in vitro* Sertoli cell bioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 818-23
30. Booth, R. A., Weltman, J. V., Yankov, V. I., Adams, A., Garriott, B. A., Lynch, A., Veldhuis, J. D., Rogol, A. D., Johnson, M. L. and Evans, W. S. (1994). Characterization of FSH secretory burst activity in normal women during the menstrual cycle. Presented at the 76th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim, June
31. Wide, L. and Naessén, T. (1994). 17 β -estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, **40**, 783-9
32. Urban, R. J., Dahl, K. D., Padmanabhan, V., Beitins, I. and Veldhuis, J. D. (1991). Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in man. *J. Androl.*, **12**, 27-35
33. Galle, P. C., Ulloa-Aguirre, A. and Chappel, S. C. (1983). Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J. Endocrinol.*, **99**, 31-9
34. Ulloa-Aguirre, A., Schwall, R., Cravioto, A., Zambrano, E. and Danián-Matsumura, P. (1992). Effects of gonadotropin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-

- stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J. Endocrinol.*, **134**, 97-106
35. Jia, X. C. and Hsueh, A. J. W. (1989). Sensitive *in vitro* bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinology*, **41**, 449-8
36. Albanese, C., Christian-Maitre, S., Sliuss, P. M., Crowley, W. F. Jr and Jameson, J. L. (1994). Development of a bioassay for FSH using the recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **101**, 211-19
37. Jia, X. C., Kessel, B., Yen, S. S. C., Tucker, E. M. and Hsueh, A. J. W. (1986) 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.*, **62**, 1243-9
38. Reddi, K., Wickings, E. J., McNeilly, A. S., Baird, D. T. and Hillier, S. G. (1990). Circulating bioactive follicle stimulating hormone and immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **33**, 547-57
39. Maiteri, R. L., Britson, W. E., Dierchke, D. J., Wegner, F. H. and Durnning, M. (1992). The secretion of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) throughout the menstrual cycle of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Am. J. Primatol.*, **26**, 243-57
40. Phillips, D. J., Hudson, N. L., Gentile, L. R. and McNatty, K. P. (1994). Bioactive follicle-stimulating hormone concentrations in plasma during the estrous cycle of the ewe. *Biol. Reprod.*, **51**, 1292-8
41. Christian-Maitre, S., Taylor, A. E., Khoury, R. H., Hall, J. E., Martin, K. A., Smith, P. C., Albanese, C., Jameson, J. L., Crowley, W. F. and Sliuss, P. M. (1996). Homologous *in vitro* bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) reveals increased FSH biological signal during the mid- to late luteal phase of the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 2080-8
42. Wide, L. (1989). Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J. Endocrinol.*, **123**, 519-29
43. Phillips, D. J. and Wide, L. (1994). Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 614-19
44. Ulloa-Aguirre, A., Damián-Matsumura, F., Espinoza, F., Dominguez, R., Morales, L. and Flores, A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.*, **126**, 523-32
45. Hsueh, A. J. W., Biczak, T. M., Jia, X.-C., Dahl, K. D., Fauser, B. C. J. M., Galway, A. B., Czeckala, N., Pavlou, S. N., Papkoff, H., Keene, J. and Bolme, I. (1989). Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.*, **45**, 209-77
46. Schramm, R. D. and Bavister, R. D. (1994). Follicle-stimulating hormone priming of rhesus monkeys enhances meiotic and developmental competence of oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, **51**, 904-12
47. Dahl, K. D., Pavlou, S. N., Kovacs, W. J. and Hsueh, A. J. W. (1986). The changing ratio of serum bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men following treatment with a potent gonadotropin releasing hormone antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **63**, 792-4
48. Kessel, B., Dahl, K. D., Karer, R. R., Liu, C. H., Rivier, J., Vale, W., Hsueh, A. J. W. and Yen, S. S. C. (1988). The dependency of bioactive follicle-stimulating hormone secretion on gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal and cycling women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**, 361-6
49. Mortola, J. F., Sathanandan, M., Pavlou, S., Dahl, K. D., Hsueh, A. J. W., Rivier, J., Vale, W. and 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**, 957-63
50. Matikainen, T., Ding, Y. Q., Vergara, M., Huhizantemi, I., Cousinet, B. and Schaison, G. (1992). Differing responses of plasma bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone to gonadotropin-releasing hormone antagonist and agonist treatments in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **75**, 890-5
51. Dumesic, D. A., Padmanabhan, V., Bellini, I. Z., Sonstein, J. S. and Shapiro, S. S. (1993). Elevated serum levels of immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) with partial bioactivity mimics hypergonadotropic hypogonadism in women with infertility. Presented at the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society, Las Vegas, June

En perseguirme, Mundo, ¿qué interesas?
¿En qué te ofendo, cuando sólo intento
poner bellezas en mi entendimiento
y no mi entendimiento en las bellezas?

Yo no estimo tesoros ni riquezas;
y así, siempre me causa más contento
poner riquezas en mi entendimiento
que no mi entendimiento en las riquezas.

Y no estimo hermosura que, vencida,
es despojo civil de las edades,
ni riqueza me agrada fementida,
teniendo por mejor, en mis verdades,
consumir vanidades de la vida
que consumir la vida en vanidades.

SOR JUANA INES DE LA CRUZ