

1128 |

14  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LOS PRODUCTOS DE  
SINTESIS Y SECRECION DE LA CELULA DE LA GRANULOSA  
POR LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA FOLICULO  
ESTIMULANTE

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

p r e s e n t a

Bioq. Carlos M. <sup>arcelo</sup> Timossi Baldi



México, D.F. Febrero de 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271829



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

PAGINACION

DISCINTINCA

**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LOS PRODUCTOS DE  
SINTESIS Y SECRECION DE LA CELULA DE LA GRANULOSA POR  
LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE**

**Alumno:** Bioq. Carlos M. Timossi Baldi

**Tutor:** Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre

**Cotutores:** Dr. Fernando Larrea Gallo  
Dr. Enrique Pedernera Astegiano

### Agradecimientos:

Al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre por su asesoría durante esta etapa de mi carrera, por brindarme su confianza y apoyo. Asimismo, agradezco a los Dres. Fernando Larrea y Enrique Pedernera por sus sugerencias durante el transcurso de mi trabajo de tesis.

Agradezco de manera especial a todo el personal del Departamento Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, el cual me brindo la oportunidad de realizar mi tesis aceptándome como un miembro más en el.

También quiero expresar mi gratitud a los miembros de mi Comité de Evaluación, Dres Gerardo Gamba Ayala, Moisés Mercado Atri, María Mercedes Perusquia Nava, Felipe Vadillo Ortega y Luis Alberto Zarco Quintero, por sus excelentes sugerencias que ayudaron a pulir mi documento de Tesis.

A Daniela y a Georgina a quienes todo se lo debo y por quienes todo lo hago.

A mis padres y a mi hermana por enseñarme a ser independiente en la vida

## INDICE

	Página
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I INTRODUCCIÓN.....	5
La hormona estimulante del folículo	
Estructura de la FSH	
La subunidad $\alpha$ común	
La subunidad $\beta$	
El receptor de FSH, estructura y función	
Los carbohidratos de FSH como determinantes estructurales para el ensamblaje de subunidades, interacción con su receptor y transducción de señales intracelulares	
Isoformas, bioactividad y significado fisiológico del polimorfismo de FSH	
II OBJETIVO.....	21
III HIPÓTESIS.....	21
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Especímenes	
Cromatoenfoque preparativo y cromatografía por afinidad	
Radioinmunoanálisis de FSH y LH	
Bioensayo de aromatización en células de la granulosa en cultivo	
Radioinmunoanálisis de estradiol y AMPc	
Zimografía	
Análisis de hibridación por Northern blots	
Transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(RT-PCR)	

V RESULTADOS.....	28
Estandarización temporal de los productos finales	
Estudio de la actividad biológica de las isoformas de FSH	
Estrógenos totales	
Producción de AMPc	
Inducción de la actividad enzimática del activador tisular del plasminógeno (tPA)	
Análisis de la inducción del ARNm de P450 aromatasasa	
Análisis de la inducción del ARNm de tPA	
Análisis de la inducción del ARNm de $\alpha$ -inhibina ( $\alpha$ -INH)	
Estudio del mecanismo de acción de la isoforma I (FSHi)	
VI DISCUSIÓN.....	49
VII CONCLUSIONES.....	55
VII BIBLIOGRAFIA.....	56



## RESUMEN

La hormona estimulante del folículo es sintetizada y secretada por la hipófisis anterior en múltiples formas moleculares. En el presente estudio, analizamos la posibilidad de que algunas de estas isoformas por carga de FSH pudiesen ejercer efectos diferenciales sobre su célula blanco. Siete isoformas de FSH fueron aisladas de extractos de hipófisis anterior por cromatoenfoco de alta resolución, seguido de cromatografía de afinidad para remover cerca del 90% de la LH que coeluye con las isoformas de FSH durante el cromatoenfoco. Las isoformas así aisladas [isoforma I, pH > 7.10; II, rango de pH 6.60-6.20; III pH 5.47-5.10; IV pH 5.06-4.60; V pH 4.76-4.12; VI pH 4.05-3.82 y VII pH < 3.8] fueron probadas en su capacidad para inducir la producción de AMPc, la aromatización de andrógenos y la actividad enzimática de activador de plasminógeno tipo tisular (tPA) así como de la producción del ARNm de P450 aromatasa, tPA y subunidad alfa de inhibina (INH- $\alpha$ ) por células de la granulosa de rata en cultivo. La producción tanto de AMPc como de estradiol (E) se determinó por radioinmunoensayo, la actividad enzimática de tPA por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y zimografía y todos los ARNm por análisis de hibridación por Northern blots y RT-PCR cuantitativa. Todas las isoformas, con la excepción de la isoforma I, fueron capaces de inducir la síntesis y producción de AMPc y E así como la actividad enzimática de tPA de manera dosis dependiente; la potencia de las isoformas menos ácidas (pH 6.60 a 4.60) fueron mayores que las exhibidas por los análogos más ácidos/sializados (pH 4.76 a <3.80) (potencia relativa: I>II>III>IV>V $\approx$ VII>VI). Los efectos de las isoformas menos ácidas sobre la actividad enzimática de tPA fueron más pronunciadas que sobre la producción de E. Una tendencia similar se observó en términos de la producción de los ARNm de P450 aromatasa y tPA. Por el contrario, cuando fué analizada la producción de  $\alpha$ -INH inducida por FSH, las isoformas V a VII fueron más potentes (dos a tres veces) que sus contrapartes menos ácidas/sializadas (II a IV). En contraste de las isoformas II a VII (que se comportaron como agonistas de la FSH recombinante humana), la isoforma I (pH de elución > 7.10) bloqueo completamente todos los efectos inducidos por la preparación recombinante, incluyendo la producción de los ARNm de P450 aromatasa y tPA. Estos resultados sugieren fuertemente que las isoformas de FSH, con la excepción de la variante menos ácida difieren solamente en su potencia para inducir el mismo efecto final. Sin embargo, su potencia relativa para inducir diferentes efectos puede ser dispar cuando se comparan las isoformas menos ácidas (pH > 4.5) con las más ácidas (pH < 4.5).

## ABSTRACT

Regulation by follicle-stimulating hormone isoforms of the products of synthesis and secretion of granulosa cells

Follicle-stimulating hormone is synthesized and secreted by the anterior pituitary gland in several molecular forms. The pattern of release of the isoforms varies depending on the endocrine status of the donor at the time of the sample collection. In the present study, we analyzed the possibility that the several charge isoforms may exert differential effects at the target cell level. Seven intrapituitary FSH isoforms were isolated from the anterior pituitary glycoprotein extracts by high resolution chromatofocusing, followed by affinity chromatography to remove nearly 90% of the LH material that coeluted with the FSH isoforms during the chromatofocusing procedure. The isoforms so isolated [isoform I, pH > 7.10; II, pH range 6.60-6.20; III pH 5.47-5.10; IV pH 5.06-4.60; V pH 4.76-4.12; VI pH 4.05-3.82 and VII pH < 3.8] were then tested for their capacity to induce cAMP production, androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator (tPA) enzyme activity as well as P450 aromatase, tPA and inhibin  $\alpha$ -subunit (INH- $\alpha$ ) mRNA production by rat granulosa cells in culture. cAMP and estradiol (E) production were measured by radioimmunoassay, tPA enzyme activity by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and zymography and all mRNAs by Northern Blot hybridization analysis and quantitative RT-PCR. All isoforms, with the exception of the isoform I, were able to induce synthesis and production of cAMP and E as well as tPA enzyme activity in a dose-dependent manner; the potency of the less acidic isoforms (pH 6.60 to 4.60) was higher than that exhibited by the more acidic/sialylated analogs (pH 4.76 to <3.80) (potency: I>II>III>IV>V $\approx$ VII>VI). The effects of the less acidic isoforms on tPA enzyme activity were more pronounced than on E production. A similar trend was observed in terms of P450 aromatase and tPA mRNA production. On the contrary, when the FSH-induced production on INH- $\alpha$  mRNA was analyzed isoforms V to VII were significantly more potent (two to three-fold) than their less acidic/sialylated counterparts (II to IV). In contrast to isoforms II-VII (which behaved as agonists of recombinant human FSH), isoform I (elution pH > 7.10) completely blocked all effects inducible by the recombinant preparation, including P450 aromatase and tPA mRNA production. Our results demonstrate that this antagonistic isoforms may exert its effect at post-receptor level. These results strongly suggest that the FSH isoforms, with the exception of their most basic variant, differ only in their potency to induce the same final effect. However, the relative potency to induce different effects could be disparate when compare less acidic isoforms (pH > 4.5) with more acidic isoforms (pH < 4.5).

## I. INTRODUCCIÓN

### La hormona estimulante del folículo

La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son producidas y secretadas por los gonadotropos en la hipófisis anterior en respuesta a estímulos hormonales provenientes del cerebro y de las gónadas (Chappel *et al.*, 1983a). En conjunto se denominan gonadotropinas, y sirven de intermediarios entre el sistema neuroendócrino y el sistema reproductivo. Estas gonadotropinas pertenecen a una familia de glicoproteínas estrechamente relacionadas, compuestas por FSH, LH, gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) (Bousfield *et al.*, 1996). Todas estas glicoproteínas son heterodímeros compuestos por dos subunidades no unidas covalentemente denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Para una especie animal dada, la subunidad  $\alpha$  de las cuatro glicoproteínas es codificada por el mismo gene y por lo tanto su secuencia de aminoácidos es idéntica, mientras que las subunidades  $\beta$ , que son codificadas por genes distintos, son las que le otorgan la especificidad biológica a cada miembro de la familia. (Pierce and Parsons, 1981; Godine *et al.*, 1982; Fiddes and Talmadge, 1984; Gordon *et al.*, 1988; Gharib *et al.*, 1990b). La actividad biológica de las glicoproteínas hipofisarias solo se obtiene si ambas subunidades se encuentran unidas (Tsatsoulis *et al.*, 1991). Cada subunidad  $\beta$  se puede combinar con la subunidad  $\alpha$  común (Pierce *et al.*, 1981), lo que sugiere que algunas porciones de la estructura tridimensional de las subunidades  $\beta$  de las distintas glicoproteínas deben ser muy similares. Las regiones que no lo son probablemente sean las que le otorgan la especificidad inmunológica y biológica a la hormona.

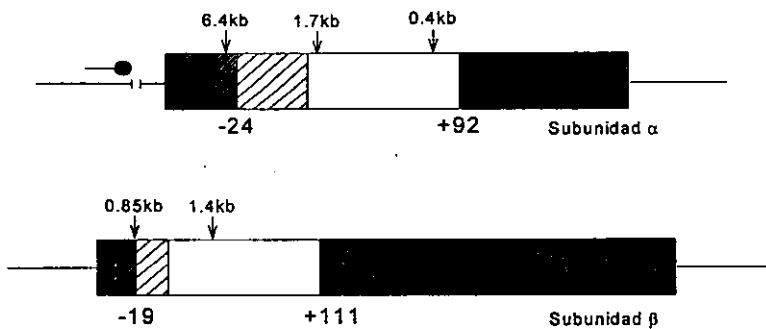
### Estructura de la FSH

El gene de la subunidad  $\alpha$  común de las glicoproteínas hipofisarias (Boothby *et al.*, 1981) es capaz de expresarse coordinadamente con los genes de las distintas subunidades  $\beta$ , a pesar de que su control hormonal varía en los distintos tipos celulares (Kay and Jameson, 1992; Schoderbeck *et al.*, 1992, 1993; Pennathur *et al.*, 1993; Kim

*et al.*, 1994; Ben-Menahem *et al.*, 1995). Por el contrario, los genes de la subunidad  $\beta$  se expresan en un solo tipo celular y exhiben una regulación hormonal más limitada y específica (Papavasiliou *et al.*, 1986; Dalkin *et al.*, 1989; Nakamura y Nakao, 1993; Steger *et al.*, 1993; Steinfelder and Wondisford, 1997).

### La subunidad $\alpha$ común

El gene que codifica para la subunidad  $\alpha$  consiste en 4 exones separados por 3 intrones (Gharib *et al.*, 1990). En el humano, este gene está localizado en el cromosoma 6 (Naylor *et al.*, 1983).



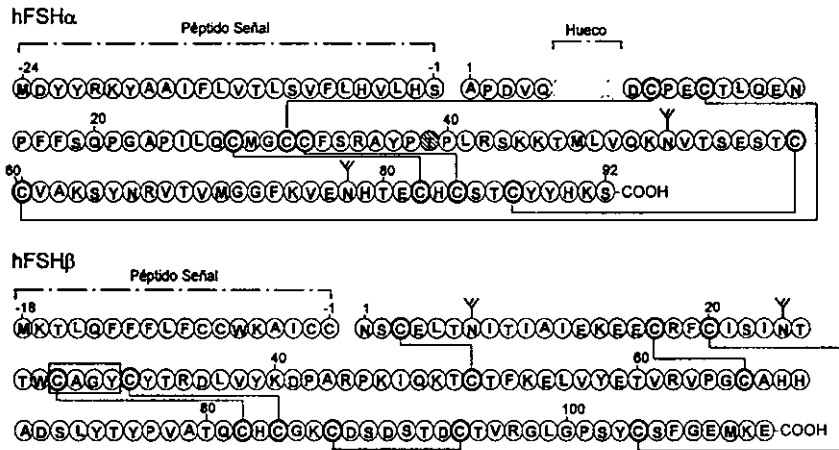
**Figura 1:** Estructura de los genes de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la hormona estimulante del folículo humana. Regiones traducidas □; regiones no traducidas ■; péptido señal ▨; región 5' extendida no traducida ■; posición de los intrones ↓; elementos reguladores dependientes de AMPc ●.

A pesar del alto grado de conservación en la posición de los intrones y la homología en las secuencias de nucleótidos que se observa entre distintas especies, particularmente entre mamíferos, el tamaño del gene presenta considerable variación en tamaño atribuible fundamentalmente a la longitud del primer intrón (Gharib *et al.*, 1990).

En general, el ARNm de la subunidad  $\alpha$  tiene un tamaño que varía entre 730 y 800 nucleótidos. Este codifica una secuencia líder de 24 aminoácidos seguida de una proteína madura de 92 ó 96 aminoácidos (Gharib *et al.*, 1990) (Figura 1). En el humano, la ausencia de 4 aminoácidos, correspondientes a los residuos 6 a 9 en otras especies

de mamíferos tales como roedores y equinos, produce un "hueco" cuando se compara las secuencias proteicas alineando las cisteinas de las subunidades  $\alpha$  (Chin *et al.*, 1983). Sin embargo, este hueco no altera la extensión de ningún puente disulfuro (Bousfield *et al.*, 1994).

Los puentes disulfuro de FSH $\alpha$  producen una estructura tridimensional estrechamente plegada que es esencial para mantener la actividad biológica del dímero  $\alpha/\beta$  (Fujiki *et al.*, 1980). La FSH $\alpha$  contiene 10 residuos de cisteína que forman 5 puentes disulfuro intracatenarios (Laphorn *et al.*, 1994). La posición de estas cisteínas esta muy conservada entre las subunidades  $\alpha$  de todos los mamíferos estudiados, lo que sugiere que su estructura terciaria es muy similar (Bousfield *et al.*, 1994), sin embargo se han detectado diferencias sutiles en esta estructura dependiendo de la subunidad  $\beta$  que se encuentra unida a ella (Dighe *et al.*, 1990).



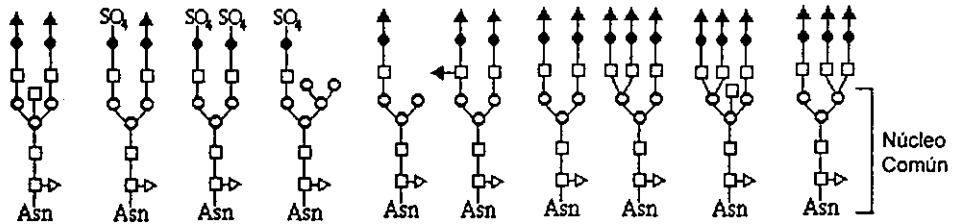
**Figura 2:** Secuencia de la subunidad  $\alpha$  común (hFSH $\alpha$ , panel superior) y hFSH $\beta$  (panel inferior). Las líneas sólidas indican la posición de los puentes disulfuro (de acuerdo con Pierce y Parsons, 1981; Ryan *et al.*, 1987; Bousfield *et al.*, 1994; Laphorn *et al.*, 1994). Las estructuras en forma de ramas indican la posición de los sitios de N-glicosilación (Esquema obtenido de Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

Los puentes disulfuro que unen las cisteínas en posición  $\alpha$ 10-60,  $\alpha$ 28-82 y  $\alpha$ 32-84 (Figura 2) están involucrados en el llamado "nudo" de cisteínas (Laphorn *et al.*, 1994). La presencia de este "nudo" ha sido confirmada en hCG y presumiblemente se presente en otras hormonas glicoproteicas. Su estructura esta compuesta por dos puentes

disulfuro formando un anillo, mientras que el tercero los atraviesa (Mc Donald and Hendrickson, 1993; Laphorn *et al.*, 1994). La integridad de los otros dos puentes disulfuro en posición  $\alpha 7-31$  y  $\alpha 59-87$  es esencial para correcta formación del heterodímero LH $\alpha/\beta$ , sin embargo, su ruptura no afecta la formación de los dímeros de FSH ni de hCG (Furuhashi *et al.*, 1996) (Figura 2). Esta observación sugiere que, como se mencionó anteriormente, ciertas regiones de la subunidad  $\alpha$  puedan adquirir una estructura terciaria sensiblemente diferente dependiendo de la subunidad  $\beta$  que se encuentre unida a ella.

Los oligosacáridos ligados a asparagina (N-ligados) de la subunidad  $\alpha$  tienen un papel importante en el plegamiento de los diferentes dominios funcionales de la misma. Estos influyen sobre la flexibilidad de la molécula, lo cual es crítico para el ensamblaje y la formación de sus puentes disulfuro (Matzuk and Boime, 1988a; 1989a). La glicosilación de la subunidad  $\alpha$  comienza en el retículo endoplasmático rugoso (RER), con la transferencia co-traduccional de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ligado a dolicol a un sitio de consenso de glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) (Baenzinger and Green, 1988). Este oligosacárido es modificado por las exoglucosidasas (exoglucosidasas I y II) y por la manosidasa, ambas generan un "núcleo" común compuesto por dos N-acetilglucosaminas unidas a tres manosas (Baenzinger and Green, 1988) (Figura 3). Posteriormente, la adición de otros carbohidratos, principalmente ácido siálico (N-Acetil-Neuramínico), por glicosiltransferasas, genera las diversas variantes de oligosacáridos, que le confiere la gran heterogeneidad por carga a estas moléculas (Baenzinger and Green, 1988; Stockell and Renwich, 1992; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a).

La FSH tiene una gran proporción de oligosacáridos ricos en ácido siálico y galactosa en estructuras mono, di o triantenarias, que le otorgan una carga negativa neta a esta molécula (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Cuando se encuentra unida a FSH $\beta$ , la FSH $\alpha$  contiene dos oligosacáridos, en posición 52 y 78. Sin embargo, la subunidad  $\alpha$  libre posee uno adicional unido a la Thr<sub>39/43</sub> (Parsons *et al.*, 1983). Aunque este último oligosacárido impide que la subunidad  $\alpha$  se una a las subunidades  $\beta$  libres (Parsons and Pierce, 1984) no interfiere con la secreción regulada de FSH $\alpha$  por el gonadotropo (Boime *et al.*, 1982).



**Figura 3:** Estructuras representativas de los oligosacáridos unidos a FSH. Asn, asparagina; SO<sub>4</sub> sulfato; □ GlicNAc; ▷ fucosa; ○ manosa; ● galactosa; ▲ ácido siálico.

El mecanismo mejor caracterizado de activación transcripcional del gene de la subunidad  $\alpha$  es a través de la vía de la cinasa de proteína A (PKA) (Jameson *et al.*, 1986a). En el humano, el promotor de la subunidad  $\alpha$  contiene varias secuencias de elementos de respuesta a AMPc/ PKA (CRE) colocadas en tándem, localizadas entre las posiciones -146 a -111 respecto al sitio de iniciación de la transcripción (Jameson *et al.*, 1986a). Estos CRE consisten en secuencias palindrómicas TGACGTCA, altamente conservadas en muchos genes activados por AMPc. A estas secuencias se unen las proteínas denominadas CREB, las cuales son modificadas por el AMPc/PKA de forma que activan la transcripción de este gene (Deutsch *et al.*, 1988a,b). La cinasa de proteína C y las cinasas de proteínas ligadas a calcio-calmodulina también tienen la capacidad de modificar a los CREB (Deutsch *et al.*, 1988a,b). Por otro lado, los estrógenos inhiben la transcripción del gene de FSH $\alpha$  por un mecanismo independiente de su receptor (Keri *et al.*, 1991).

### La subunidad $\beta$

En el humano, la subunidad  $\beta$  es codificada por un solo gene, localizado en el cromosoma 11 (Watkins *et al.*, 1987). El gene de la FSH $\beta$  contiene tres exones y dos intrones (Kim *et al.*, 1988; Gharib *et al.*, 1989). El primer intrón esta localizado 6 pares de bases *corriente arriba* del sitio de iniciación de la transcripción (Jameson *et al.*, 1988) (Figura 1). El primer exón contiene la región 5' no traducida mientras que el segundo y tercer exón contienen toda la secuencia codificante de la proteína. El segundo intrón está localizado entre la secuencia codificante para el aminoácido 35 y 36, esta posición se encuentra muy conservada entre todas las subunidades  $\beta$  de las glicoproteínas

(Jameson *et al.*, 1988) (Figura 1). El gene de FSH $\beta$  difiere del de las otras hormonas glicoproteicas en que posee un extremo 3' terminal muy largo, codificado por el tercer exón (Jameson *et al.*, 1988, Kim *et al.*, 1988). Aunque el significado fisiológico de esta larga región 3' no traducida es incierto, en otras proteínas como la  $\beta$ -globina ésta secuencia desestabiliza al ARNm, lo que incrementa su recambio (Shaw y Kammen, 1986; Weiss *et al.*, 1995). FSH $\beta$  expresa al menos 4 ARNm en células hipofisarias normales y dos transcritos en células neoplásicas (Jameson *et al.*, 1986b; 1988). La secuencia de nucleótidos de FSH $\beta$  predice un péptido señal de 18 aminoácidos (Jameson *et al.*, 1988), seguido de la proteína madura de 111 aminoácidos (Figura 2).

FSH $\beta$  está ligada internamente por 6 puentes disulfuro. La posición exacta de estos ha sido muy difícil de determinar. En el humano las posiciones mejor establecidas son las  $\beta$ 87-94,  $\beta$ 20-104, y  $\beta$ 17-66 (Pierce and Parsons, 1981; Ryan *et al.*, 1987). Esta posiciones se corresponden con aquellas deducidas en la estructura cristalina de hCG $\beta$  (Lapthorn *et al.*, 1994). La posición de los tres restantes puentes disulfuro no se conoce exactamente. Los más probables son los que se formarían entre los aminoácidos  $\beta$ 3-51,  $\beta$ 28-82 y  $\beta$ 32-84 como se deduce de la estructura cristalina de hCG y la secuencia alineada de FSH $\beta$  y hCG $\beta$  a través de sus residuos de cisteinas (Lapthorn *et al.*, 1994). Estos tres últimos a su vez formarían un nudo de manera similar a lo que ocurre en FSH $\alpha$ . Recientemente, han sido artificialmente introducidos pares de residuos de cisteinas en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de FSH, LH y hCG, en posiciones tales que tengan una geometría óptima de formación de puentes disulfuro intercatenarios (Heikoop *et al.*, 1997). Estos mutantes formaron dichos puentes, lo que provocó un aumento en la termoestabilidad del dímero, sin reducción de la actividad biológica o afinidad por su receptor, lo que los hace potencialmente útiles como gonadotropinas con alta estabilidad farmacológica (Heikoop *et al.*, 1997).

Los sitios de consenso de glicosilación en FSH $\beta$  humana se encuentran en las asparaginas 7 y 24 (Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Al igual que para FSH $\alpha$  los carbohidratos de FSH $\beta$  tienen un papel preponderante en el ensamble entre ambas subunidades y en la tasa de depuración de la proteína entera (Matzuk y Boime, 1988b; Bishop *et al.*, 1995). Como se mencionó anteriormente, las variaciones



en la estructura y distribución de los oligosacáridos sializados y en menor medida de los sulfatados son la base química principal para la diferencia entre las isoformas de FSH y su extensa heterogeneidad por carga. Pero la heterogeneidad no está solamente restringida a variaciones en la carga neta de la molécula, sino también a la composición de los carbohidratos internos de la FSH (Figura 3) (Wide, 1987; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988; Papandreou *et al.*, 1993). Más adelante se analizará con mayor detalle el papel de cada oligosacárido en ambas subunidades.

La regulación del gene de FSH $\beta$  es un mecanismo complejo dirigido tanto por proteínas como por esteroides. Se ha encontrado que los principales esteroides sexuales (estradiol y testosterona) regulan la producción y secreción de FSH en una gran variedad de animales experimentales (Winters *et al.*, 1979; 1992; Winters and Troen, 1985; Gharib *et al.*, 1987). Sin embargo, sus efectos específicos sobre la producción de ARNm varía dependiendo de la especie animal estudiada o de las condiciones experimentales (Rhea *et al.*, 1986; Wierman y Wang, 1990). Por ejemplo, en la oveja ovariectomizada, el estradiol disminuye los niveles de ARNm de FSH $\beta$  (Mercer *et al.*, 1989), mientras que en la rata este esteroide no tiene ningún efecto sobre la transcripción de FSH $\beta$  al menos *in vitro* (Shupnik *et al.*, 1989a). En gonadotropos en cultivo, la testosterona incrementa los niveles de FSH $\beta$  en ausencia de GnRH (Gharib *et al.*, 1990a), mientras que en presencia de este péptido inhibe la síntesis de ambas subunidades (Jakubowiak *et al.*, 1991; Winters *et al.*, 1992). Por el otro lado, tanto la síntesis de FSH $\beta$  como la de su ARNm permanecen inalteradas en ratas macho tratadas con testosterona (Gharib *et al.*, 1987; Wierman *et al.*, 1989). El gene de FSH $\beta$  contiene una secuencia que puede operar como un elemento de respuesta a estrógenos (GGTCANNNTGACC), sin embargo, esta difiere de la secuencia homóloga encontrada en LH $\beta$  (GGACACCATCTGTCC) (Shupnik *et al.*, 1989b).

El otro mecanismo de regulación de la transcripción del gene de FSH $\beta$  está dado por dos proteínas diméricas, la inhibina y la activina y por una monomérica, la folistatina. Todas son producidas por las gónadas además de por una amplia variedad de tejidos como la hipófisis y el hígado (inhibina, activina y folistatina), la placenta y la médula osea (inhibina y activina), la glándula suprarrenal y cerebro (inhibina) (Mason *et al.*, 1985; Petraglia *et al.*, 1987; Meunier *et al.*, 1988; Sawcheko *et al.*, 1988; Ying, 1988;

Shimasaki *et al.*, 1989). La inhibina es considerada un supresor selectivo de la síntesis y secreción de FSH tanto *in vivo* como *in vitro* (Rivier *et al.*, 1986); sin embargo, en condiciones fisiológicas, los efectos de la inhibina son aparentemente enmascarados por la presencia de testosterona (Culler, 1990; Culler y Negro-Vilar, 1990). La activina incrementa la síntesis y secreción de FSH, mientras que la follistatina actúa indirectamente a través de su unión a la activina y a su bionutralización (Krummen *et al.*, 1993), así como a través de su asociación en cadenas de heparán sulfato de la membrana plasmática, favoreciendo la unión de activina a su receptor y eventualmente su captación dentro de las células y su degradación por enzimas lisosomales (Sugino *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1997). Otro regulador peptídico de FSH $\beta$  es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Ying, 1988; Albanese *et al.*, 1996; Besecke *et al.*, 1996). Es necesario el estímulo pulsátil de GnRH para inducir la expresión del gene de FSH $\beta$ . El patrón de síntesis y secreción de esta gonadotropina difiere del de la LH, la cual también se encuentra bajo el control de GnRH. Mientras que pulsos de frecuencias cortas (pulsos rápidos) favorecen la síntesis y secreción de LH, frecuencias largas (pulsos lentos) favorecen la secreción de FSH (Turgeon y Waring, 1982; Dalkin *et al.*, 1989). Este mecanismo puede ser el responsable de los distintos patrones de secreción observadas para estas dos gonadotropinas (Muyan *et al.*, 1994). Estudios recientes han sugerido que la acción de GnRH para estimular la expresión del gene de FSH puede ejercerse indirectamente a través del cambio en el tono de activina y follistatina (Besecke *et al.*, 1996).

### **El receptor de FSH, estructura y función**

El evento inicial en la acción de las gonadotropinas es unirse a receptores altamente específicos localizados en la membrana de la célula blanco (Reichert *et al.*, 1991; Ji *et al.*, 1995). El receptor de FSH es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Simoni *et al.*, 1997; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). El receptor de FSH consiste en una cadena única de aminoácidos que posee un gran dominio extracelular para la unión del ligando, siete regiones transmembranales conectadas entre sí por asas intra y

extracelulares y un dominio intracelular asociado con la activación de una o más proteínas transductoras de señal que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (Minegishi *et al.*, 1991; Kelton *et al.*, 1992). En conjunto, las siete regiones transmembranales forman una estructura tridimensional semejante a un barril, el cual se encuentra orientado perpendicularmente al plano de la membrana celular. El gene del receptor de FSH codifica para una proteína de 678-695 aminoácidos (Minegishi *et al.*, 1991; Kelton *et al.*, 1992). La homología entre la secuencia de nucleótidos del receptor humano y el de rata es de aproximadamente 88%, mientras que la homología en la secuencia de aminoácidos es de alrededor del 90% (87% en el dominio extracelular, 96% en el dominio transmembranal y 79% en el extremo carboxilo terminal) (Sprengel *et al.*, 1990; Minegishi *et al.*, 1991; Heckert *et al.*, 1992; Kelton *et al.*, 1992). Tanto en la rata como en el humano, el gene contiene 10 exones separados por 9 intrones. Los primeros 9 exones codifican para el dominio extracelular, mientras que el último codifica para las regiones transmembranales y la porción carboxilo terminal (Minegishi *et al.*, 1991; Kelton *et al.*, 1992). El dominio extracelular del receptor de FSH presenta entre nueve y once regiones ricas en leucina, las cuales favorecen la formación de péptidos anfipáticos óptimos para la interacción proteína-proteína. Estas regiones están involucradas en la unión altamente específica con FSH. La estructura particular de esta región y los cambios que ocurren durante el reconocimiento de FSH permiten, luego de un apropiado posicionamiento y orientación de regiones específicas localizadas en ambas subunidades del dímero, la estimulación del receptor induciendo su activación a través de un cambio conformacional traducido por las regiones transmembranales del mismo (Braun *et al.*, 1991; Ji *et al.*, 1995). De acuerdo con este modelo la propagación de la traducción de señal debe involucrar cambios conformacionales en la región transmembranal inducidos por el dímero de FSH al interactuar con las asas extracelulares que conectan las hélices transmembranales. De hecho Ji y Ji (1995) han identificado varios aminoácidos localizados en el asa extracelular 1 del receptor de FSH que pueden formar una extensión de la  $\alpha$ -hélice desde la región transmembranal 2 y que están involucrados en la unión de la hormona (histidina 407) y la activación del receptor (aspartato 405, treonina 408 y lisina 409). De esta manera la unión hormona-receptor, la activación de este último y la subsecuente producción de segundos

mensajeros, son el resultado final de una serie de interacciones complejas y dinámicas entre la hormona y varias regiones del receptor.

Las proteínas G son heterotrimeros denominados individualmente subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , las dos últimas subunidades están estrechamente unidas unas con otras para formar el complejo  $\beta/\gamma$  (Sprang, 1997). Estas son moléculas transductoras de señales reguladas por nucleótidos de guanina que transfieren información recibida por el receptor a efectores celulares específicos tales como enzimas o canales iónicos. El receptor de FSH está preferentemente acoplado a la proteína Gs la cual activa la enzima adenilato ciclasa para estimular la síntesis del segundo mensajero AMPc, el cual a su vez activa la cinasa A de proteínas (PKA) (Reichert y Dattatreymurty, 1989). El receptor de FSH de rata también se encuentra acoplado a la proteína  $G_{q/11}$ , asociada con la activación de la fosfolipasa  $C\beta$ , que cataliza la hidrólisis del lípido fosfatidilinositol 4,5 difosfato para formar los segundos mensajeros inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol. Este último es un activador de la cinasa C de proteínas. Recientemente ha sido demostrado que el receptor de FSH es capaz de activar proteínas Gi cuando es estimulado con FSH humana con muy bajo contenido de carbohidratos (Arey *et al.*, 1997). Se ha descrito en el ovino un receptor de FSH idéntico al receptor silvestre, salvo por un acortamiento en la región carboxilterminal producida por un empalme alternativo del ARNm, que se comporta como un receptor negativo dominante posiblemente acoplado a la proteína Gi (Sairam *et al.*, 1996).

Estudios empleando péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxilo terminal de la tercera asa intracelular (lisina 551 - arginina 555) del receptor de FSH de rata, han demostrado que esta región es particularmente crítica para el acoplamiento de proteínas Gs, activación de PKA y estimulación de la síntesis de  $17\beta$  estradiol (Grasso *et al.*, 1995 a,b). Esta región del receptor contiene la secuencia de consenso B-X-X-B-B, donde B representa un residuo básico y X un residuo no básico. Esta secuencia determina la activación de proteínas G en otros receptores (Wong *et al.*, 1990; Okamoto y Nishimoto, 1992).

En la hembra, el receptor de FSH se localiza únicamente en las células de la granulosa del ovario. (Richards, 1994). En respuesta a su estímulo, estas células producen una amplia gama de productos de secreción, principalmente estrógenos a

partir de precursores androgénicos (Fortune and Armstrong, 1977; Tsang *et al.*, 1980), inhibina (Erickson y Hsueh, 1978a; Rivier *et al.*, 1986), activina (Weiss *et al.*, 1995), folistatina (Ling *et al.*, 1990; Sugino *et al.*, 1993), el factor de crecimiento insulinoide (IGF-1) (Adashi *et al.*, 1988; Rappaport *et al.*, 1996), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Hsueh *et al.*, 1989), el activador de plasminógeno tipo tisular (tPA) (Bicsak *et al.*, 1989; Tsafirri *et al.*, 1989), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Oikawa *et al.*, 1990), así como receptores para LH (Hsueh *et al.*, 1989), para prolactina (Navickis *et al.*, 1982) y para estrógenos (Hsueh *et al.*, 1989).

**Los carbohidratos de FSH como determinantes estructurales para el ensamblaje de subunidades, interacción con su receptor y transducción de señales intracelulares.**

Se sabe que los oligosacáridos incorporados a las hormonas glicoproteicas son importantes en muchos aspectos funcionales de éstas. Estos juegan un papel importante en el plegamiento y ensamblaje de subunidades, en la secreción de la molécula, además de determinar la tasa de depuración metabólica, así como la correcta interacción de la hormona con su receptor (Sairam, 1989; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b).

Existe basta información de que los residuos de ácido siálico y sulfato presentes en los oligosacáridos de las gonadotropinas determinan su tasa de depuración metabólica y la potencia biológica *in vivo* de la molécula (Morell *et al.*, 1971; Wide *et al.*, 1986; Wide y Hobson, 1986; Fiete *et al.*, 1991; Timossi *et al.*, 1998b). Los sulfatos terminales, al unirse a un receptor hepático específico, favorecen la remoción de la circulación de las gonadotropinas en su paso a través de las células reticuloendoteliales (Fiete *et al.*, 1991); por el contrario, el ácido siálico disminuye la captación y eliminación hepática (Morell *et al.*, 1971). Galway y cols. (1990), empleando variantes de FSH recombinante carentes de residuos de ácido siálico terminal, corroboraron que éstas, al igual que las glicoproteínas deglicosiladas por métodos químicos o enzimáticos (Vaitukaitis y Ross, 1971; Yang y Papkoff, 1973), son rápidamente depuradas de la circulación y prácticamente inactivas *in vivo* comparadas con la estructura natural de FSH.

Más recientemente, Bishop y cols. (1995), demostraron que ambos residuos de carbohidratos tiene un papel importante en la determinación de la tasa de depuración y la potencia *in vitro* de esta gonadotropina. Las moléculas mutantes carentes de la secuencia de consenso de glicosilación en uno o ambos sitios de la subunidad  $\beta$  desaparecieron más rápidamente del plasma que las variantes similares de la subunidad  $\alpha$  (Bishop *et al.*, 1995). En algunos estudios se han empleado variantes parcial o totalmente deglicosiladas por procedimientos químicos o por delección específica de los sitios de N-glicosilación lo que ha permitido determinar el papel de cada oligosacárido para la unión con su receptor y la transducción de señales intracelulares. Los primeros estudios, usando ácido fluorhídrico, que removía un 70-90% de todos los carbohidratos sin afectar la estructura primaria de la proteína, mostraron que los residuos ligados a la subunidad  $\alpha$  jugaban un papel dominante en la capacidad de la hormona para activar a su receptor e inducir la transducción de señales intracelulares (Sairam y Bhargavi, 1985). En estos estudios la unión de FSH ovina o humana a su receptor fue significativamente mayor o bien permaneció inalterada luego de la deglicosilación, pero la transducción de señales, medida como la capacidad de estas variantes para inducir la acumulación de AMPc, fue prácticamente eliminada.

Por otra parte, la subunidad  $\alpha$  deglicosilada retiene su capacidad para unirse con la subunidad  $\beta$  intacta, sin embargo el dímero es incapaz de inducir la activación de la adenilato ciclasa (Sairam y Bhargavi, 1985; Sairam 1989). Más recientemente, con la mutación de los sitios de consenso de glicosilación se corroboró el papel fundamental de los carbohidratos de la subunidad  $\alpha$  en la transducción de señal, particularmente el presente en la posición asparagina 52 (Bishop *et al.*, 1994; Flack *et al.*, 1994b; Valove *et al.*, 1994). Cuando el consenso de este sitio de glicosilación es mutado se observa una reducción en la capacidad de transducir las señales intracelulares al unirse a su receptor (Valove *et al.*, 1994).

El papel de los carbohidratos ligados a la subunidad  $\beta$  humana es contradictorio. En un estudio (Flack *et al.*, 1994b) la delección del oligosacárido situado en la asparagina 7 resultó en un incremento en la unión al receptor pero una disminución en su capacidad de transducir señales intracelulares, mientras que en otro estudio (Bishop *et al.*, 1994), la actividad biológica de estas variantes no fue afectada por la delección de

este sitio de glicosilación. Estudios posteriores confirmaron la observación de que los oligosacáridos de la subunidad  $\beta$  tienen un papel menor tanto en la unión a su receptor como en la transducción de la señal intracelular, y que el oligosacárido de la subunidad  $\alpha$  situado en la posición asparagina 52 es esencial para inducir la respuesta biológica en su célula blanco (Valove *et al.*, 1994).

### **Isoformas, bioactividad y significado fisiológico del polimorfismo de FSH**

Los residuos terminales de ácido siálico y en menor medida los de sulfato determinan la distribución por carga de las isoformas de la FSH (Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992; 1995a,b). Se han aislado múltiples isoformas por carga en extractos de hipófisis anterior de varias especies animales, incluyendo el hombre (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988; Chappel, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Existen aproximadamente 20 o más isoformas por carga en estos extractos (Wide, 1989; Stanton *et al.*, 1996; Zambrano *et al.*, 1996). Las variantes más ácidas/sializadas exhiben una vida media plasmática prolongada y una bioactividad mayor *in vivo* cuando se determina su actividad por el ensayo de aumento de peso ovárico en ratones inmaduros (Wide, 1986; Wide y Hobson, 1986). Por el contrario, las isoformas menos ácidas exhiben una capacidad de unión al receptor y una actividad biológica *in vitro* mayor que sus contrapartes más ácidas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Los cambios en la actividad biológica de FSH a consecuencia de su glico-heterogeneidad, se expresan según la relación o el cociente actividad biológica / actividad inmunológica (B/I). Este cociente varía según el estándar utilizado para valorar ambas actividades (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a,b; Zambrano *et al.*, 1995; 1996; Timossi *et al.*, 1998a).

El conocimiento de los niveles circulantes de FSH durante distintos estados fisiológicos, se basó en un principio en los datos derivados del radioinmunoanálisis (RIA). El RIA o los distintos métodos inmunológicos de medición basados en anticuerpos policlonales o monoclonales, detectan las hormonas según sus características antigénicas. Sin embargo, estos métodos son incapaces de distinguir entre formas más o menos bioactivas de FSH.

Los bioensayos de FSH *in vivo* se basan en el aumento del peso ovárico en ratas prepúberes inyectadas con esta hormona. Estos son laboriosos y muy poco sensibles. En la actualidad se han desarrollado bioensayos *in vitro*, que permiten medir la actividad biológica de FSH de manera casi rutinaria. Los bioensayos más usados son los basados en la aromatización de un andrógeno precursor ya sea en células de la granulosa (GAB) (Erickson y Hsueh, 1978b; Jia y Hsueh, 1986; Dahl *et al.*, 1989) o células de Sertoli (Van Damme *et al.*, 1979), ambas en ratas prepúberes. Recientemente se han desarrollado ensayos de actividad biológica basados en la producción de AMPc por receptores homólogos ligados a proteína G expresados en líneas celulares humanas (Albanese *et al.*, 1994; Gudermann *et al.*, 1994). Estos ensayos miden la producción de AMPc al ser estimulado el receptor de FSH por su ligando. La sensibilidad de estos bioensayos es excelente y tienen la gran ventaja de que se puede trabajar directamente con muestras de suero. La desventaja de este tipo de bioensayos es que solo valoran la unión al receptor y la producción de AMPc. Hasta el momento, no se ha desarrollado el bioensayo ideal para determinar la actividad biológica de la hormona estimulante del folículo, ya que los bioensayos disponibles solo miden uno de los productos de secreción de la célula blanco. Una mejor aproximación a la fisiología es el reciente ensayo de productos finales múltiples (Padmanabhan *et al.*, 1993). Basado en el bioensayo de células de Sertoli, se miden distintos productos de secreción de esta célula (AMPc, inhibina y estradiol), a fin de estudiar integralmente la actividad biológica (Padmanabhan *et al.*, 1993).

Se desconoce con precisión el significado fisiológico del polimorfismo de la FSH, y para poder otorgárselo es necesario primero demostrar los siguientes criterios: a) Que las isoformas sean secretadas hacia la circulación, a través de la cual pueden alcanzar el tejido blanco; b) Que la producción de las isoformas esté regulada hormonalmente y c) Que la potencia neta de la hormona se altere *in vivo* paralelamente con los cambios en la distribución de isoformas, o que los isotipos secretados difieran funcionalmente entre sí.

Existe suficiente evidencia experimental relacionada con el primer punto. Como mencionamos anteriormente, se han aislado múltiples variantes de la FSH a partir de



extractos hipofisarios en varias especies animales, desde aves (Sakai e Ishii, 1980), anfibios (Takahashi y Hanaoka, 1981), roedores (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982; Robertson *et al.*, 1982), bovinos (Stumpf *et al.*, 1992; Kojima *et al.*, 1995) y equinos (Matteri *et al.*, 1987; Matteri y Papkoff, 1988) hasta el humano (Zaidi *et al.*, 1981; 1982; Stanton *et al.*, 1992; Simoni *et al.*, 1994). La caracterización de estas variantes moleculares ha demostrado que las isoformas almacenadas en los gonadotropos hipofisarios puede ser secretada con muy pocas o ninguna modificación. Sin embargo en la circulación periférica, se encuentra una mayor proporción de variantes moleculares un poco más ácidas, en comparación con las presentes en la hipófisis en el mismo estado fisiológico. Esto se debe a que las glicofomas con mayor contenido de ácido siálico son capaces de sobrevivir más tiempo en circulación (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992). Tanto en extractos hipofisarios como en la circulación, se han encontrado isoformas dentro de un amplio espectro de pH, desde el más básicos al extremadamente ácido (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995a); sin embargo, el grueso de las isoformas posee un pH de alrededor de 5.5.

El segundo elemento ha sido demostrado hasta el momento en base a asociaciones entre los cambios en el perfil de distribución de las isoformas hipofisarias y/o circulantes y el estado endócrino del donador al momento del estudio, y de hecho podrían elaborarse algunas hipótesis basadas en los diferentes perfiles de distribución por carga característicos de estas isoformas. Por ejemplo, la distribución y secreción de isoformas de FSH durante condiciones fisiológicas específicas tales como la pubertad (Chappel *et al.*, 1983; Chappel y Ramaley, 1985; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990; 1995a; Phillips *et al.*, 1997) indica que el polimorfismo de FSH es un fenómeno regulado hormonalmente. Existen muchas evidencias experimentales que indican que tanto estímulos hipotalámicos como gonadales (GnRH y estrógenos) están involucrados no sólo en la regulación de la síntesis y secreción de FSH, sino también en la modulación de la naturaleza molecular de la hormona, y por tanto de sus atributos biológicos (Wide y Naessen, 1994; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a; Wide *et al.*, 1995). Así, el incremento en la abundancia de las isoformas básicas durante la mitad ciclo menstrual de la mujer (Padmanabhan *et al.*, 1988; Zambrano *et al.*, 1995) podría estar relacionado con la mayor capacidad de estas isoformas para potenciar los efectos de la LH en la ruptura

folicular (Timossi *et al.*, 1998b); por el contrario, la mayor abundancia de isoformas más ácidas durante la fase folicular temprana y fase lútea (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide y Hobson, 1993; Zambrano *et al.*, 1995), podría estar relacionada con fenómenos que requieren de un estímulo más prolongado, como la proliferación celular, y menos intenso en factores inhibitorios de la síntesis y secreción de la propia FSH. Por el contrario, luego de la menopausia, un estado hipoestrogénico natural, se observa un predominio de isoformas más ácidas (Wide y Hobson, 1983; Wide, 1989), que se revierte con la administración de estrógenos (Wide y Naessen, 1994). A este respecto, se ha informado que la actividad de algunas glicosiltransferasas, como las sialiltransferasas, N-Acetylgalactosamina transferasa y galactosa-N-acetiltransferasa pueden ser moduladas a nivel hipofisario por estrógenos (Smith y Baenziger, 1988; Dharmesh y Baenziger, 1993; Damián-Matsumura *et al.*, 1998), lo que podría influir sobre el grado de sialización y sulfatación de las diferentes hormonas glicoproteicas.

Finalmente, el último de los elementos descritos no ha sido satisfecho por completo, ya que la medición de los cambios de la actividad biológica de la FSH durante diferentes estados fisiológicos (pubertad, ciclo menstrual) ha dado resultados contradictorios (Padmanabhan *et al.*, 1988, Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a) . Por otro lado, la posibilidad de efectos diferenciales de sus isoformas no ha sido estudiado con los análogos naturales de la hormona debido principalmente a la dificultad de aislar y purificar en cantidades suficientes las isoformas humanas de FSH. El presente proyecto estuvo dirigido a responder este último aspecto.

## **II. OBJETIVO**

El objetivo del presente proyecto fue estudiar la posibilidad de que las isoformas de la hormona estimulante del foliculo sean capaces de ejercer efectos diferenciales (únicos) o dispares (distinta potencia sobre un mismo efecto) en la célula blanco.

## **III. HIPÓTESIS**

Teniendo en cuenta que cada isoforma de FSH se une a su receptor en la célula de la granulosa del ovario, pudiendo producir una respuesta biológica única, o bien cuantitativamente diferente, respecto a otra u otras glicofomas, se espera que la potencia biológica relativa de cada isoforma dependerá de su distribución por carga así como del producto final estudiado.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### *Especímenes*

Se colectaron hipófisis de adultos no seleccionadas por edad ni sexo, provenientes de autopsias realizadas luego de muerte accidental. Los cadáveres se conservaron a 4 - 8°C dentro de las 3 - 4 h del fallecimiento. Las hipófisis se extrajeron antes de las 24 h de ocurrido el deceso. Las glándulas se conservaron congeladas a -70°C hasta la preparación de los extractos. Éstos se prepararon de acuerdo al método de Jones *et al.* (1970). Los extractos se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento por cromatofoco.

##### *Cromatofoco preparativo y cromatografía por afinidad*

El cromatofoco (CF) de los extractos hipofisarios se realizó siguiendo el método descrito por Ulloa-Aguirre y cols. (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). Este método se basa en la producción de un gradiente lineal de pH a través de una columna de intercambio iónico. Si el gradiente es usado para separar proteínas con diferente carga, éstas eluyen progresivamente de la columna al alcanzar su punto isoeléctrico. Para construir el gradiente de pH con límites de 7.4 a 4.0 se utilizaron el poliamortiguador 74 (Pharmacia Fine Chemicals, EUA) y un amortiguador de imidazol 0.025 M. La resina empleada como fase estacionaria fue la PBE 94 (Pharmacia).

A dos lotes diferentes de extractos hipofisarios, provenientes de cinco hipófisis cada uno, se les realizaron 5 cromatofocos preparativos en columnas de 90 cm. de largo y 1.5 cm. de diámetro (Zambrano *et al.*, 1996), equilibradas con 15 volúmenes de imidazol (Sigma, St Louis, MO, EUA) 0.025 M, pH 7.4. Previo al CF, el solvente de los extractos hipofisarios fue cambiado a poliamortiguador 74 por medio de cromatografía en Sephadex G-25 (Pharmacia). Durante el CF se colectaron aproximadamente 550 fracciones de 2 ml cada una, a una velocidad de 1 ml / 4 min a 4°C, midiéndose simultáneamente el pH de cada fracción. Cuando éste se estabilizó en un pH de 4.0 el amortiguador de elución fue reemplazado por una solución 1 M de NaCl (Sigma) para recuperar las proteínas retenidas a ese pH (pico de sal). Las fracciones así obtenidas se dividieron en diferentes alícuotas que fueron almacenadas a -20°C. Después del

análisis de su contenido de FSH por radioinmunoensayo, las fracciones fueron agrupadas en diferentes pozas de acuerdo a su pH de elución. Cada poza fue dializada separadamente contra H<sub>2</sub>O desionizada durante 24 horas, y posteriormente contra NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>H (Sigma) 0.1 M, pH 7.4 y finalmente liofilizadas. Después de su resuspensión, cada concentrado fue transferido a columnas de 10 x 1 cm que contenían anti-LH IgG BG7 inmovilizado en Sepharosa 4B (Pharmacia) para remover la LH que hubiera co-eluido con las isoformas de FSH durante el CF. Este procedimiento eliminó más del 90% de la LH inactivo presente en la muestra original. Las isoformas I y VII se sometieron a cromatografía de afinidad dos veces debido a que su alto contenido de LH no se pudo remover satisfactoriamente con una sola elución cromatográfica. Las muestras con mayor FSH inactivo (pozas o isoformas I a VII), libres de LH, fueron nuevamente dializadas, liofilizadas, resuspendidas en medio de cultivo de Mc Coy (Gibco, Santa Clara, CA, EUA) y mantenidas a -70°C hasta su uso.

#### *Radioinmunoanálisis de FSH y LH*

FSH y LH humanas purificadas (FSH-I1, LH-I1, NIADDK, Bethesda, MD, EUA), se radiomarcaron por el método de la lactoperoxidasa - glucosa oxidasa (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992). Las hormonas radiomarcadas fueron separadas del <sup>125</sup>I no incorporado mediante cromatografía en Sephadex G-100 (Pharmacia) y posteriormente purificadas en Concanavalina-A conjugada a Sepharosa 4B (Pharmacia). Los RIAs se llevaron a cabo empleando reactivos donados por el Instituto Nacional de Artritis, Diabetes y Enfermedades Renales (NIADDK) de la Unión Americana, utilizando como preparación de referencia al LER-907. Este estándar exhibe una heterogeneidad por carga similar a los extractos hipofisarios crudos. Los anticuerpos policlonales empleados fueron el anti-hFSH-I6 y anti-hLH-I6 que tienen una reactividad cruzada nula con la subunidad  $\alpha$  libre y menor de 0.1% con la LH y FSH respectivamente. La dilución final utilizada fue 1:250,000 para FSH y 1:125,000 para LH. Para evitar variaciones interensayo todas las muestras de un cromatoenfoco o de un bioensayo fueron procesadas en un mismo RIA. La variación intraensayo fue menor del 8% para ambas hormonas y la sensibilidad de 4.0 ng/tubo para FSH y de 0.31 ng/tubo para LH (Zambrano *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). Las concentraciones de las isoformas, de LER-907 y de FSH

recombinante (recFSH) (ORG32489, Organon, Oss, Holanda) utilizada para estimular células de la granulosa en algunos bioensayos (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1997), se encuentran expresadas en términos del estándar FSH-I1 a menos que se indique lo contrario.

#### *Bioensayo de aromatización en células de la granulosa en cultivo*

Este bioensayo se realizó siguiendo el método de Jia y Hsueh (Erikson y Hsueh, 1978; Jia y Hsueh, 1986; Dahl *et al.*, 1989), empleando células de la granulosa de ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol (DES) (Sigma). Las células fueron dispersadas en placas de cultivo de polipropileno de 24 o 6 pozos (Falcon, CA, EUA) conteniendo 0.5 o 2.2 ml de medio de cultivo de Mc Coy (Gibco), suplementado con androstenediona (Sigma) 1.5  $\mu$ M, DES (sigma) 0.125 $\mu$ M, penicilina 1UI/ml y estreptomycin (Gibco) 0.1mg/ml, a una densidad de 240,000 células totales por mililitro de cultivo (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). Después de 24 h de incubación se cambió el medio de cultivo por el mismo medio suplementado con un inhibidor de fosfodiesterasa, la metil-isobutilxantina (MIX) (Sigma) 0.125 mM y se agregaron el estándar e isoformas de FSH a distintas dosis, cada una por triplicado. Se incubó a 37°C en condiciones de 5% CO<sub>2</sub>-95% aire. Después del tiempo óptimo de incubación se colectaron los medios de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. La concentración final de FSH en cada pozo se determinó por RIA a partir de una dilución concentrada de la cual se prepararon las diferentes dosis. Las concentraciones / pozo de FSH referida en las figuras se calcularon en 0.5 ml.

#### *Radioinmunoanálisis de estradiol y AMPc*

*Estradiol (1,3,5[10]-Estratriene-3,17beta-diol)*. Se utilizaron reactivos del programa Cuba-México de la Organización Mundial de la Salud (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). El anticuerpo usado fue provisto por el Primate Research Center, Sukhomi, Georgia, EUA. La dilución final fue 1:210,000. La reactividad cruzada fue menor de 0.02% con cortisol, progesterona y testosterona, de 0.8% con estriol y de 22% con estrona. Debido a esto último los resultados son expresados en términos de estrógenos totales. El estradiol tritiado (Amersham, Reino Unido) fue purificado mediante columnas de Sephadex LH-

20 (Pharmacia) de 30 cm de altura x 1.5 cm de diámetro. Todas las muestras de un mismo experimento se analizaron en el mismo lote para evitar variaciones interensayo. La variación intraensayo fue <4%.

*AMPc extracelular (3'-5' adenosina monofosfato cíclico)*. Se utilizaron reactivos del National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD, EUA). El anticuerpo utilizado fue el CV-27, el cual se empleó a una dilución final de 1:70,000. El trazador del RIA fue 2-O-monosuccinil AMPc tirosil-metil-éster (Sigma) radiomarcado con  $^{125}\text{I}$  por el método de la cloramina T. El RIA de AMPc se realizó siguiendo el método previamente descrito (Zambrano *et al.*, 1996). El límite de detección del ensayo fue de 3.0 pg/tubo. Todas las muestras de un mismo experimento se analizaron en el mismo lote para evitar variaciones interensayo. La variación intraensayo fue menor al 6%.

### Zimografía

Se realizó por el método de Granelli-Piperno, modificado por Heussen-Dowdle (Granelli-Piperno y Reich, 1978; Heussen y Dowdle, 1980) y optimizado para medio de cultivo en nuestro laboratorio (Timossi *et al.*, 1998a). Se colectaron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo de cada pozo del bioensayo e inmediatamente después se evaporaron hasta 1/10 de su volumen original mediante centrifugación al vacío (Beckman, Speed-Vac). A cada muestra se le adicionó amortiguador de carga de Laemmli (2X) y la muestra se depositó en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% copolimerizado con plasminógeno (American Diagnostica, New York, NY, EUA) y gelatina (Sigma). Terminada la separación electroforética (4°C, 25 mA, 90 min), se removió el SDS (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) del gel por medio de lavado con Tris HCl (Sigma) 0.5 M pH 8.0-Triton X-100 (Sigma) 2.5% durante 1 hora. Finalmente, se incubó en amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 durante 16-18 h a 37 °C. El gel fue revelado, fijado y teñido con azul brillante de Coomassie R-250 (Bio-Rad) 0.1% disuelto en 40% metanol-10% ácido acético. La ausencia de proteólisis inespecífica fue verificada realizando una electroforesis paralela en un gel sin plasminógeno. En el primer carril de cada gel se cargó una mezcla de activador de plasminógeno tisular (tPA  $\approx$ 70 KD) y urinario (uPA  $\approx$ 50 KD), altamente purificados los cuales fueron usados como indicadores. El gel se fotografió y digitalizó en un analizador de imágenes (Eagleeye II, Stratagene, EUA). En este sistema, las

áreas líticas son proporcionales a la cantidad de tPA y uPA presentes en la muestra. La normalización se realizó dividiendo la absorbancia relativa del área lítica del tPA entre la del uPA, cuya producción no es modificada por la FSH.

#### *Análisis de hibridación por Northern blots*

Se realizaron por técnicas convencionales de biología molecular (Sambrook *et al.*, 1989). Aproximadamente 20 µg de ARN total previamente aislado de tres pozos de cultivo por el método del isotiocianato de guanidinio/fenol cloroformo (Trizol™, Gibco) (Chomczynski y Sacchi, 1987) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes de formaldehído. Posteriormente el ARN fue transferido por capilaridad durante toda la noche a membranas de nylon (Z-probe, Bio-Rad) durante 16-18 h utilizando 10X SSC. Luego de provocar el entrecruzamiento covalente entre la membrana y el ARN por medio de luz ultravioleta (UV crosslinker, Stratagene), las membranas se hibridaron con una sonda de cDNA correspondiente al tPA (Ny *et al.*, 1988), a la P<sub>450</sub> aromatasa (Hickey *et al.*, 1988), o a la α-inhibina (donada gentilmente por la Dra. V. Padmanabhan, Universidad de Michigan, Ann Harbor, MI, EUA) marcadas con <sup>32</sup>P por la técnica de Random Primer (Gibco), usando hexameros de nucleótidos al azar como iniciadores de la polimerización. Como solución de prehibridación e hibridación se utilizó EDTA (Sigma) 1 mM, pH 8.0, NaHPO<sub>4</sub> (Sigma) 0.15 M y SDS al 7% a 65°C por 18-24 h. Finalmente las membranas fueron lavadas con SDS al 0.1% a 65°C por 30 min y a temperatura ambiente durante otros 30 min. Los filtros se expusieron a placas radiográficas (Kodak XAR-5) a -70°C durante aproximadamente 72 h. La normalización de la cantidad de ARN depositada en el gel se realizó midiendo la absorbancia del bromuro de etidio incorporado a la fracción ribosomal 18S del ARN total.

#### *Transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(RT-PCR)*

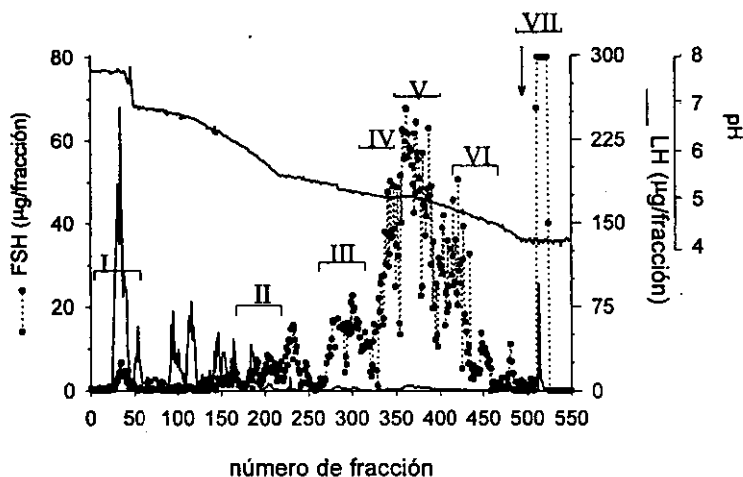
La transcripción reversa se realizó por técnicas estándar utilizando oligo dT y la enzima transcriptasa reversa aislada del virus de la leucemia murina (PCR Superscript II™, Gibco). Brevemente, 2 µg de ARN total fueron incubados a 42°C durante 2 h con



200 UI de transcriptasa reversa MuLV en un amortiguador Tris-HCl conteniendo una mezcla de nucleótidos y oligo dT como iniciador de la transcripción. Posteriormente se digirió el ARN con ARNasa H durante 20 min a 37°C. El ADN complementario (cDNA) obtenido se sometió a amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para P<sub>450</sub> aromatasa (Rappaport *et al.*, 1996), tPA (generados con el programa OLIGO 4.0, National Biosciences Inc., EUA) o gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (G3PD) (Rappaport *et al.*, 1996). Se usaron las siguientes temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión durante 30 ciclos: 94°C - 15 seg, 50°C - 30 seg y 72°C - 45 seg para P<sub>450</sub> aromatasa y 94°C - 15 seg, 54°C - 30 seg y 72°C - 45 seg, para tPA y G3PD. El tiempo de extensión para el último ciclo fué de 7 min para ambas amplificaciones. Los productos de PCR obtenidos (584 pb para aromatasa, 539 para tPA y 515 pb para G3PD), se depositaron en un gel de agarosa al 1% y se separaron electroforéticamente durante 30 minutos a 50V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se digitalizaron en un analizador de imágenes (Eagle Eye II, Stratagene). La normalización se realizó dividiendo la absorbancia relativa del producto de PCR de la aromatasa o tPA entre la del G3PD.

## V. RESULTADOS

La separación de las isoformas de FSH provenientes de los extractos hipofisarios reveló la existencia de múltiples picos de inmunoreactividad en todo el rango de pH utilizado. En la figura 4 podemos observar el perfil de distribución por carga de la FSH intrahipofisaria. Este contiene aproximadamente 20 picos mayores de FSH inmunoreactiva en un rango de pH de  $>7.10$  a  $<3.80$ . Se detectó así mismo, una elevada inmunoreactividad de LH en las primeras 170 fracciones del cromatograma y en el pico de sal. Como se mencionó, las fracciones fueron agrupadas en diferentes pozas de acuerdo a su pH de elución, dializadas y finalmente liofilizadas. Después de su resuspensión, cada concentrado fue transferido a columnas de cromatografía de afinidad para remover la LH que co-eluyó con las isoformas de FSH durante el CF (Figura 4). Como se aprecia en la Tabla 1 el porcentaje de LH luego de la cromatografía de afinidad es menor al 2.5% (2.47-0.18) para aquellas fracciones que contenían poca LH antes de la purificación (isoformas III a VII), mientras que en las dos primeras fracciones se mantuvo un 37.7 y 16% de LH. El porcentaje de reducción de LH antes y después de la purificación fue superior al 90% para todas las pozas.



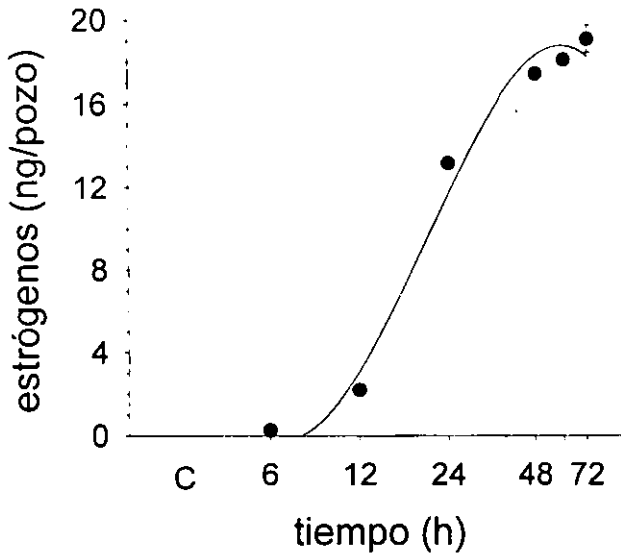
**Figura 4:** Patrón representativo de distribución por pH de FSH y LH presentes en un extracto hipofisario enriquecido en glicoproteínas después de su separación por cromatografía. La flecha indica la adición de la solución de NaCl 1M. Los corchetes delimitan a las fracciones mezcladas que constituyeron cada poza o isoforma de FSH (I a VII).

**Tabla 1:** Rangos de pH, masas de FSH y LH recuperadas luego de la purificación mediante columnas de cromatografía de afinidad usando un anticuerpo monoclonal contra LH.

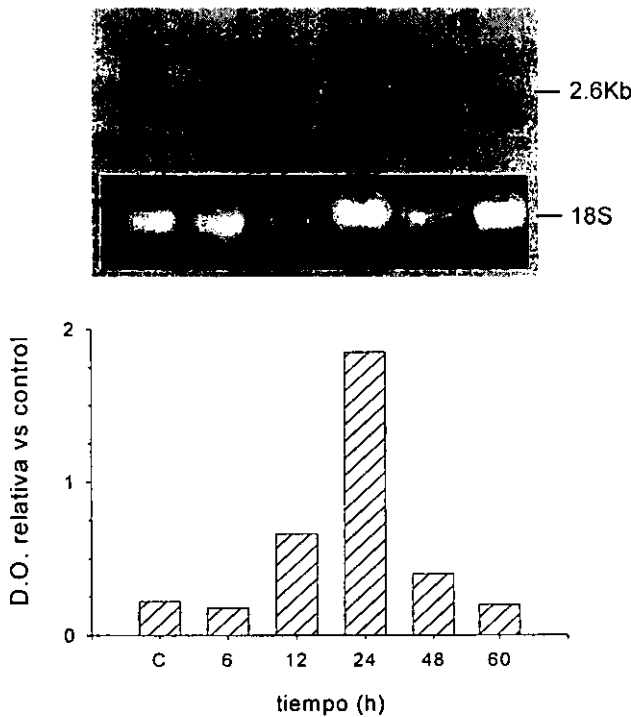
Poza #	pH	FSH (µg/ml)	LH (µg/ml)	LH/FSH %
I	> 7.10	17.93	6.76	37.7
II	6.60-6.20 (6.4)	348.37	55.83	16.00
III	5.47-5.10 (5.3)	1791.00	13.00	0.72
IV	5.06-4.60 (4.8)	2390.00	12.20	0.51
V	4.76-4.12 (4.44)	1596.00	6.97	0.43
VI	4.05-3.82 (3.95)	128.80	3.19	2.47
VII	<3.80	3747.90	6.91	0.18

### *Estandarización temporal de los productos finales*

La estandarización se llevó a cabo incubando células de la granulosa de rata prepúber durante distintos intervalos de tiempo con 2.8 ng de recFSH que es la dosis que produce el 50% de estimulación ( $ED_{50}$ ) para estradiol (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b; Zambrano *et al.*, 1995). Brevemente, se cultivaron las células durante 24 h con medio de Mc Coy sin el suplemento de inhibidores de fosfodiesterasas. A las 24 h se sustituyó por medio GAB suplementado con metil-isobutil xantina (MIX) y se estimuló con recFSH. A distintos tiempos se cosechó el medio y/o se extrajo el ARN total de las células de la granulosa. En la figura 5 se observa la evolución temporal de la producción de estradiol y en la figura 6 la inducción del ARNm de la  $P_{450}$  aromatasas. Fue posible detectar por primera vez la producción de estrógenos a las 12 h de cultivo y su producción aumentó de manera exponencial hasta las 48 h. Luego de este tiempo no se observó incremento en su producción .



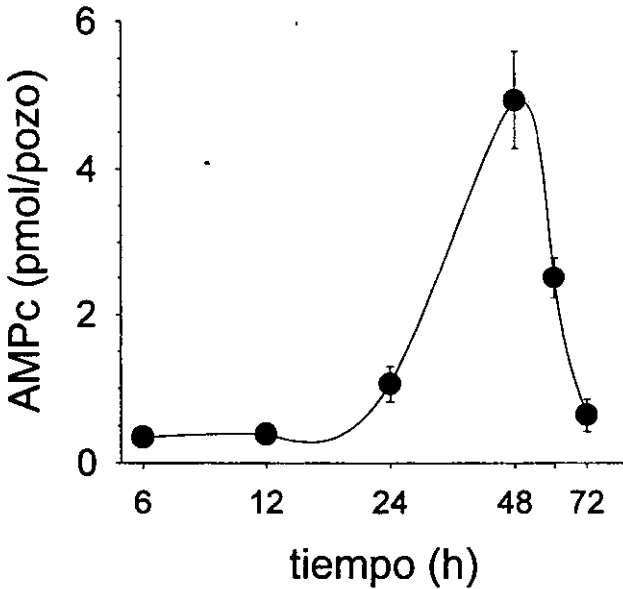
**Figura 5:** Evolución temporal de la producción de estrógenos por células de la granulosa en cultivo. Las células se estimularon con 2.8ng de recFSH y a las horas indicadas en las abscisas se colectó el medio de cultivo y se analizó su contenido de estrógenos por RIA. C= Control, células sin estimular.



**Figura 6:** Evolución temporal de la inducción del ARNm de P<sub>450</sub> aromatasa por células de la granulosa en cultivo. Las células se estimularon con 2.7ng de recFSH y a las horas indicadas en la gráfica (abscisas) se colectó el ARN total y se analizó su contenido de ARNm específico de P<sub>450</sub> aromatasa por hibridación en Northern Blot. C= Control, células sin estimular.

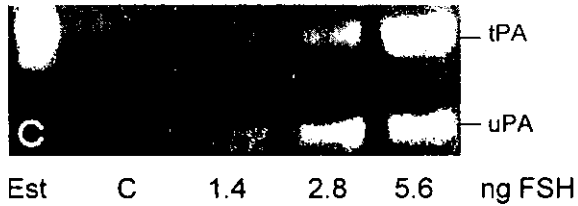
En base a estos resultados se determinó que el tiempo de estimulación con FSH de las células de la granulosa en cultivo para el análisis de estrógenos totales como producto final debería ser de 48 h, mientras que para el del ARNm de P<sub>450</sub> aromatasa de 24 h.

De forma similar se realizó la estandarización temporal de la producción de AMPc (Figura 7). Obteniéndose una producción máxima a las 48 h para luego descender a las 60 y 72 h.



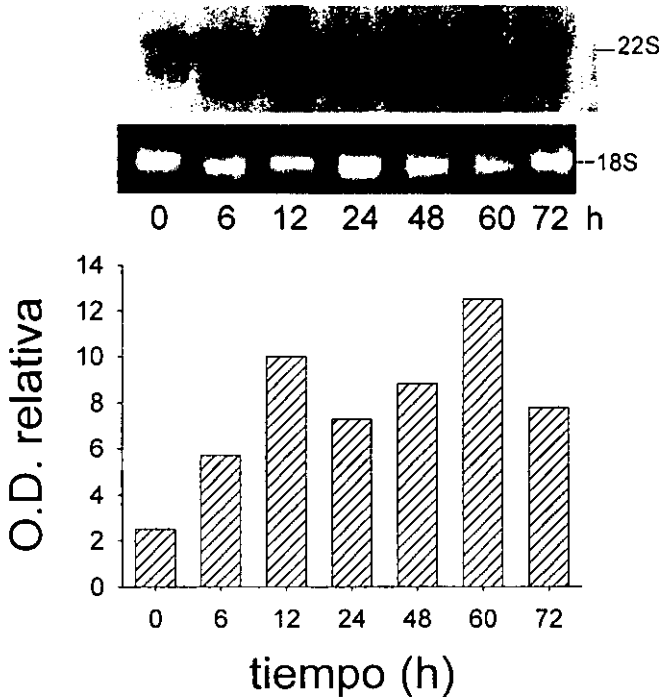
*Figura 7:* Estudio temporal de la producción de AMPc en células de la granulosa en cultivo. Se estimularon las células con 2.7ng de recFSH, y a las horas indicadas en la gráfica se colectó el medio de cultivo y se determinó el contenido de AMPc por RIA. Se observó un máximo a las 48 h, y un descenso posterior presumiblemente por acción de fosfodiesterasas.

Se realizó así mismo un experimento para determinar la actividad enzimática de activador de plasminógeno tisular. Se estimularon células de la granulosa con cantidades crecientes de recFSH durante 24, 48 y 72 h a fin de determinar tanto la mínima concentración de FSH que producía una actividad enzimática de tPA como el tiempo mínimo en la cual ésta se podría detectar. La actividad enzimática de tPA por zimografía, fue solo detectable a las 72 h de cultivo (figura 8). La dosis mínima a la que se detecta la actividad de tPA fue 1.4 ng.



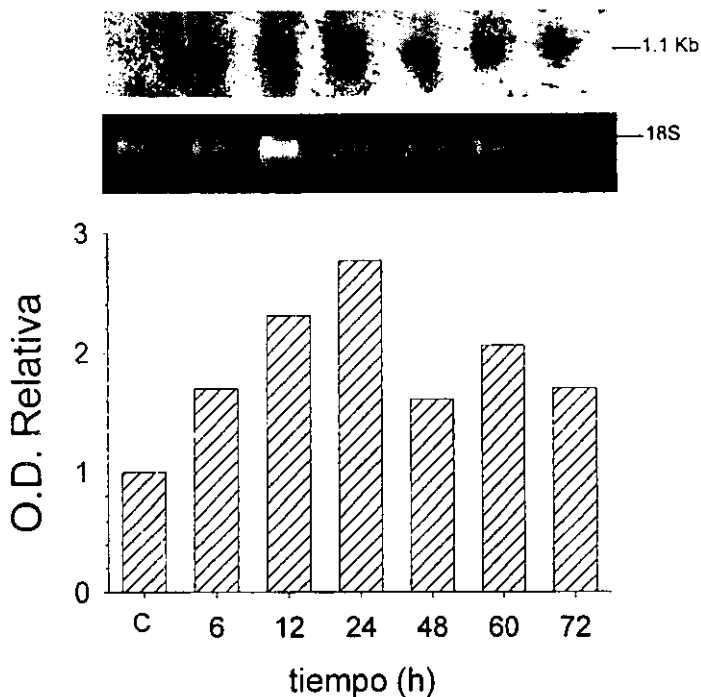
**Figura 8:** Inducción de la producción de activador de plasminógeno tipo tisular por células de la granulosa a las 72 h de cultivo. Se estimularon las células con diferentes dosis de recFSH y a las 72 h se cosechó el medio de cultivo, se redujo su volumen por evaporación al vacío y se determinó la actividad de tPA por zimografía. Se observó que la dosis de 1.4ng produce un área de lisis que es diferente a la del control (C= células sin estimular); las dosis mayores producen un aumento del área lisada de forma dosis dependiente.

La estandarización del tiempo de inducción del ARN mensajero de tPA reveló que éste posee un primer máximo de actividad a las 12 h y un segundo máximo a las 60 h posteriores al estímulo (Figura 9). La producción de este ARNm inducida por FSH no disminuyó como en el caso del ARNm de P<sub>450</sub> aromatasasa por lo que se decidió tomar como tiempo de cosecha 12 horas después del estímulo.



**Figura 9:** Estandarización temporal de la inducción del ARNm de tPA. Las células se estimularon con 2.8ng de FSH recombinante y se colectó el ARN total a las horas indicadas. En el panel superior se observa la inducción del ARNm de tPA. El primer máximo ocurrió a las 12 h posteriores al estímulo con FSH recombinante y un segundo máximo a las 60 h de cultivo. En el panel medio podemos observar el ARN ribosomal 18S del mismo gel, con el cual se normalizó el northern blot. En el panel inferior se presenta la densidad óptica relativa en la cual se observa cuantitativamente este fenómeno.

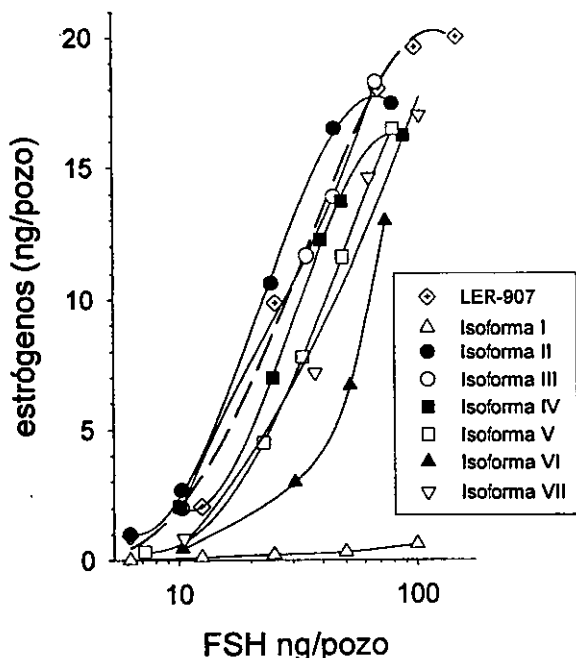
En la figura 10 se observa la evolución temporal de la inducción del ARNm de  $\alpha$ -inhibina inducido por recFSH. Al igual que en los experimentos anteriores, se extrajo el ARN total, y se analizó la producción del ARNm específico para  $\alpha$ -inhibina inducido por recFSH por hibridación por Northern Blot. La máxima producción de este ARNm se detecta a las 24 h post-estimulo.



**Figura 10:** Evolución temporal de la inducción del ARNm de  $\alpha$ -inhibina por células de la granulosa en cultivo. Las células se estimularon con 2.7ng de recFSH y a las horas indicadas en la gráfica se aisló el ARN total y se analizó su contenido de ARNm específico de  $\alpha$ -inhibina por hidridización en Northern Blots. En el panel superior se observa la inducción del ARNm de  $\alpha$ -inhibina. El máximo se encuentra a las 24 h posteriores al estímulo con FSH recombinante. En el panel medio podemos observar el ARN ribosomal 18S del mismo gel, con el cual se normalizó el northern blot de tPA. En el panel inferior se presenta la densidad óptica relativa en la cual se observa cuantitativamente este fenómeno. C= células sin estimular

*Estudio de la actividad biológica de las isoformas de FSH*  
*Estrógenos totales*

Todas las isoformas, con excepción de la más básica (y menos sializada; pH >7.10), indujeron la aromatización de andrógenos en células de la granulosa de manera dosis-dependiente (figura 11). El comportamiento de las isoformas II a VII siguió un patrón de actividad biológica en el cual las formas menos ácidas (isoformas II a IV, pH 6.6 a 4.6) fueron más potentes que sus contrapartes más ácidas (isoformas V a VII, pH 4.76 a < 3.88) la potencia relativa fue: isoforma II > III > IV > V > VII > VI. La tabla 2 muestra la potencia biológica para la inducción de la aromatización de cada isoforma expresada como la relación actividad biológica/inmunológica (B:I) de cada una de ellas (media  $\pm$  DE de tres experimentos). Como se observa en la tabla, las isoformas menos ácidas (II-IV) mostraron una potencia  $\sim$ 1.8 a 3 veces mayor a la de las más ácidas.



**Figura 11:** La habilidad de producir estrógenos de dosis crecientes de las isoformas purificadas de LH. Se estimularon las células con las dosis indicadas de cada isoforma durante 48 h, luego de lo cual se colectó el medio de cultivo y se determinó el contenido de estrógenos totales por RIA. Se observa el aumento dosis dependiente en todas, salvo la isoforma I.

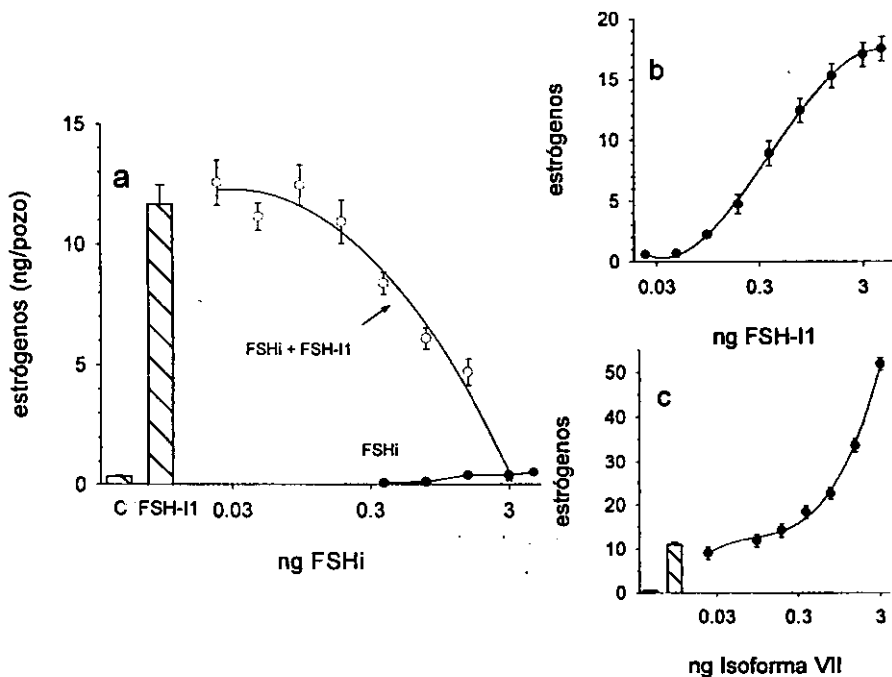


**Tabla 2:** Cociente actividad biológica para la inducción de la aromatización / actividad inmunológica de las isoformas I a VII de la FSH

	I	II	III	IV	V	VI	VII
<b>pH</b>	>7.10	6.40	5.3	4.8	4.44	3.95	>3.8
<b>B:I</b>	-	1.24±0.05 <sup>a</sup>	0.90±0.04 <sup>b</sup>	0.76±0.02 <sup>c</sup>	0.62±0.04 <sup>d</sup>	0.37±0.04 <sup>f</sup>	0.49±0.03 <sup>e</sup>

Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p < 0.05$ , ANOVA y prueba de t)

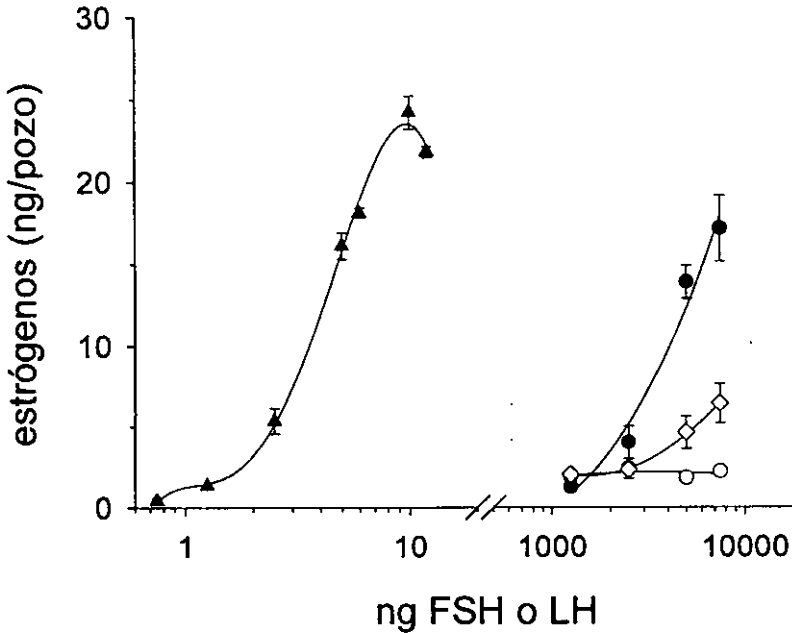
En virtud de que la isoforma I posee un bajo grado de sialización (a juzgar por su pH de elución), se analizó la posibilidad de que pudiera comportarse como un antagonista de la acción de FSH sobre su célula blanco. Para ello, se diseñó un experimento en el que se incubaron células de la granulosa en presencia de concentraciones estimuladoras al 50% ( $ED_{50}$ ) para aromatización (figura 12b) de recFSH o de un estándar altamente purificado de FSH hipofisaria (FSH-11) con cantidades crecientes de la isoforma I (codificada con fines descriptivos como FSHi) (figura 12a). Como se muestra en la figura, FSHi inhibió la producción de estrógenos inducida por el estándar de FSH hipofisaria de manera dosis dependiente. Por el contrario, la isoforma VII empleada como control positivo en el experimento se comportó como un agonista de la FSH (figura 12c). Se observa efecto inhibitorio estadísticamente significativo a partir de la dosis de 0.35ng. La dosis inhibitoria al 50% ( $ID_{50}$ ) es de aproximadamente 1.4 ng de Isoforma I.



**Figura 12:** Efecto inhibitorio de la isoforma I (FSHi) en la producción de estradiol inducida por ED<sub>50</sub> de FSH-I1. (a): Las células fueron incubadas durante 48 h en presencia de 2.8 ng de FSH-I1 únicamente (barra con líneas diagonales), de 2.8 ng de FSH-I1 + concentraciones crecientes de la isoforma I (O) o de la isoforma I sola (●). Se puede observar un claro efecto inhibitorio de FSHi a partir de la dosis de 0.35 ng. (b): Curva dosis-respuesta de la producción de estradiol inducida por el estándar FSH-I1. (c): Efecto agonista de la isoforma VII en la producción de estrógenos inducida por FSH-I1, en condiciones similares a las descritas para la isoforma I o FSHi. C= control en ausencia de FSH.

A la dosis máxima la inhibición alcanzada es superior al 95%. Este hallazgo sugirió que la actividad de aromatización de andrógenos previamente detectada con preparaciones no purificadas de esta isoforma básica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992) pudo haber sido causada por el elevado contenido de LH presente en la muestra original. De hecho, como se muestra en la figura 13, LH altamente purificada fue capaz de inducir la producción de estradiol en células de la granulosa en cultivo cuando se incubaron en presencia de concentraciones elevadas de este estándar. El efecto de LH sobre la aromatización no fue debida a la presencia de trazas de FSH presentes en esta

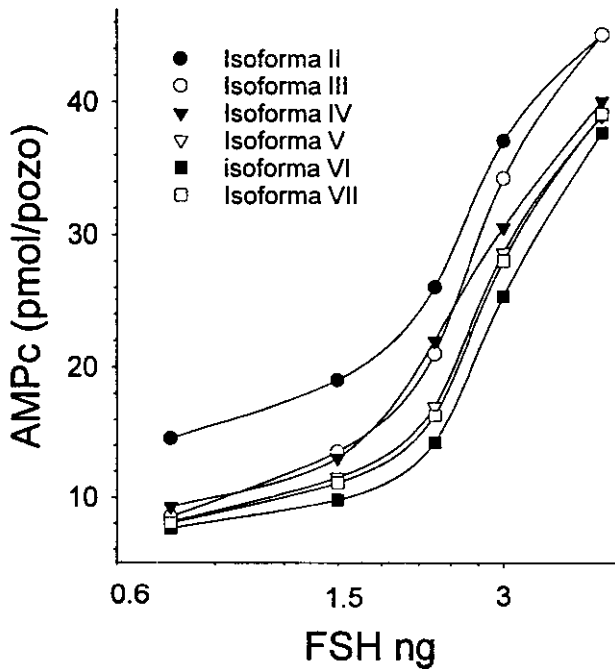
preparación altamente purificada, ya que este efecto fue efectivamente bloqueado con la adición de un anticuerpo anti-LH humana a la incubación (Figura 13).



**Figura 13:** Cambios en la concentración de estrógenos secretados al medio de cultivo en el bioensayo de células de la granulosa al ser estimuladas con FSH o LH hipofisarias altamente purificadas. Las células fueron cultivadas durante 48 h con cantidades crecientes de FSH-I1 (▲) o LH-I1(●). Las células expuestas a LH fueron también incubadas con anti-LH a diluciones 1:2000 (◇) o 1:1000 (○).

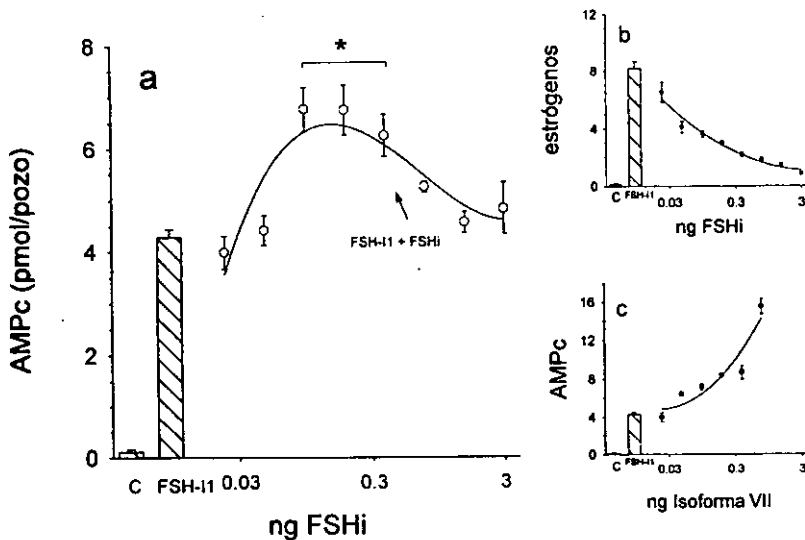
#### Producción de AMPc

La figura 14 muestra la producción de AMPc inducida por las diferentes isoformas (II a VII) de FSH. Aunque todas las isoformas estimularon la acumulación de este segundo mensajero de manera dosis-dependiente, las variantes menos ácidas fueron más potentes que las más sializadas en este efecto a juzgar por el desplazamiento hacia la izquierda de sus curvas dosis-respuesta. La potencia relativa para AMPc fue: Isoforma II pH6.4 > III pH5.3 > IV pH4.8 > V pH4.44 ≈ VII pH(<3.88) < VI pH3.95.



**Figura 14:** Capacidad de las isoformas purificadas de FSH hipofisaria para inducir la producción de AMPc en un cultivo de células de la granulosa. Las células fueron preincubadas en medio libre de fosfodiesterasas durante 24 h, para luego ser estimuladas durante 48 h adicionales por cada una de las isoformas preparadas en medio suplementado con MIX. Después de la incubación la concentración de AMPc extracelular fue determinada por RIA.

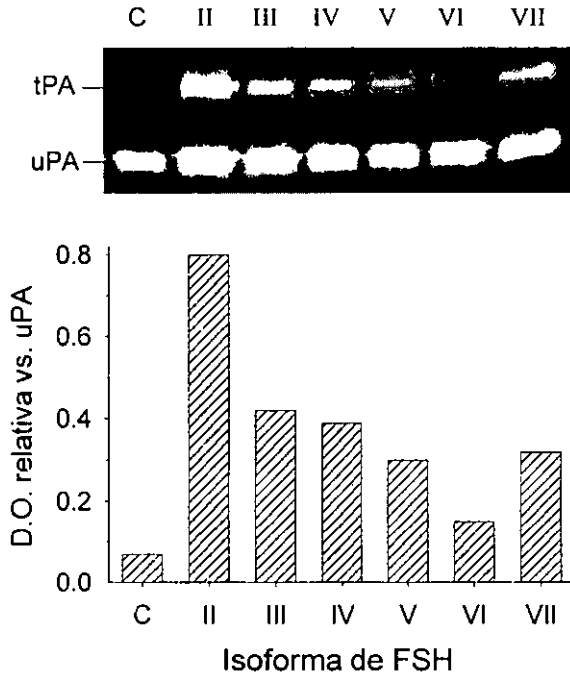
Los efectos de la FSHi en la acumulación de AMPc se muestran en la figura 15. En presencia de la ED<sub>50</sub> de FSH-I1, FSHi en bajas dosis (0.09 a 0.36 ng) fue capaz de incrementar significativamente la producción de AMPc, mientras que a dosis mayores (1.4 a 2.8 ng) la isoforma no presentó efecto alguno sobre la producción de AMPc inducida por el estándar FSH-I1 (Figura 15a). Por otro lado, el efecto de la isoforma VII sobre la producción de AMPc (figura 15c) siguió un patrón similar al mostrado en la figura 12c para la producción de estrógenos.



**Figura 15:** Efecto de FSH-11, FSHi y la isoforma VII sobre la producción de AMPc por las células de la granulosa. Las células fueron estimuladas durante 48 h con FSH-11 en ausencia (barras cruzadas) o presencia de cantidades crecientes de FSHi o de la isoforma VII; (a): Efecto de FSHi en la producción de AMPc estimulada por FSH-11; (b): Inhibición dosis-dependiente de la aromatización de andrógenos inducida por FSH-11 en el mismo experimento mostrado en (a); (c): Acumulación de AMPc luego de coincubar la isoforma VII con FSH-11. \*  $p < 0.01$  vs las dosis menores y mayores de FSHi vs FSH-11 sola. C= control en ausencia de FSH.

#### *Inducción de la actividad enzimática del activador tisular del plasminógeno (tPA)*

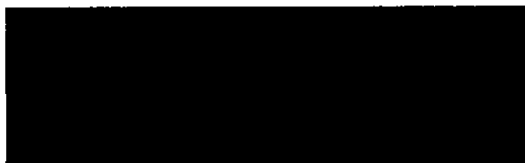
La capacidad de los activadores del plasminógeno [tPA y urokinasa (uPA)] producidos por la célula de la granulosa en respuesta a las isoformas II a VII se muestra en la figura 16. En el panel superior de la figura 16 se puede observar que la actividad lítica inducida por la presencia de tPA varió con las distintas isoformas mientras que, como era de esperarse, la del uPA se mantuvo prácticamente constante. Las isoformas II a IV mostraron una potencia ~2.5 a 4.5 veces mayor a la de sus análogos más ácidos (V-VII), tal y como se muestra en la normalización representada en el panel inferior de la misma figura.



**Figura 16:** El panel superior muestra un zimograma representativo en el cual el área lítica superior marca la actividad enzimática del tPA y la inferior la del uPA. Las células de la granulosa fueron cultivadas durante 72 h en presencia de cada una de las isoformas de FSH. Después de la incubación el medio de cultivo fue colectado de cada pozo realizándose posteriormente la zimografía tal y como se indica en Materiales y Métodos. La actividad lítica normalizada [densidad óptica (D.O.) relativa del tPA/ D.O. relativa del uPA] reveló un mayor efecto de las isoformas básicas en comparación con sus análogos más ácidos (panel inferior). C= incubación control en ausencia de estímulo. Los resultados mostrados fueron reproducidos en 2 experimentos adicionales. Los geles control (co-polimerizados con gelatina únicamente) no mostraron actividad lítica en las zonas correspondientes a pesos moleculares de 70 y 50 KD.

El efecto de FSHi sobre la actividad enzimática de tPA fue analizado incubando células de la granulosa en presencia de FSH-I1 + 2.8 ng de FSHi. Como se muestra en la figura 17, FSHi (isoforma I) inhibió completamente la actividad enzimática del tPA inducida por FSH-I1. En el carril 3 de la misma figura se puede observar el área lítica inducida por 2.2 ng de FSH-I1 y en los carriles 5 y 6 los efectos agonistas de la isoforma VII.

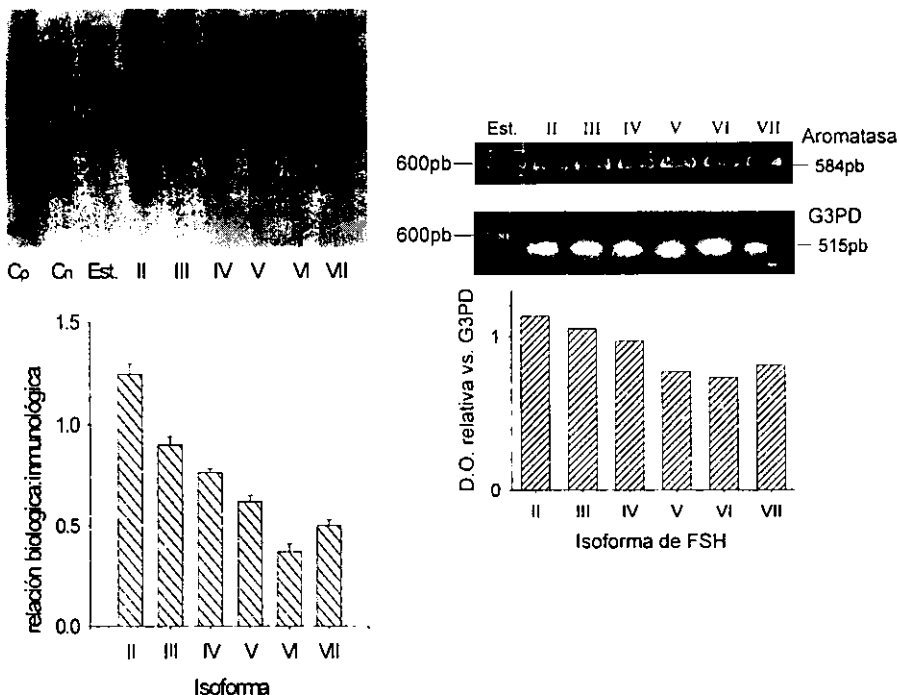
1      2      3      4      5      6      7



**Figura 17:** Efecto de FSHi sobre la actividad enzimática de tPA. Carril 1: células sin estimular, carril 2: 1.4 ng de FSH-I1, carril 3: 2.8 ng de FSH I-1, carril 4: 5.4 ng de FSH-I1, carril 5: 1.4 ng FSH-I1 + 1.4 ng de isoforma VII, carril 6: 1.4 ng FSH-I1 + 2.8 ng de Isoforma VII, carril 7: 2.8 ng FSH-I1 + 1.4 ng de Isoforma VII.

#### *Análisis de la inducción del ARNm de P450 aromatasa*

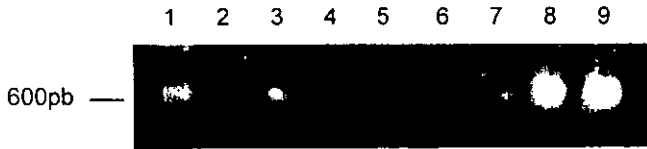
En estos experimentos, se estimularon células de la granulosa en cultivo con 2.8 ng de cada una de las isoformas. Las células de la granulosa se incubaron en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasa durante 24 h, luego de lo cual se cambió a medio GAB con MIX. Después de 24h más de incubación en presencia de cada una de las isoformas (II a VII) se extrajo el ARN total y se analizó la expresión del gene de la P<sub>450</sub> aromatasa (producción de ARNm específico) por medio de análisis de hibridación (Northern blot) con una sonda específica de cDNA tal como se describe en Material y Métodos. La inducción de los tres transcritos del ARNm de la aromatasa (Hickey *et al.*, 1988) por la isoformas de FSH fue cualitativamente similar a la de la producción de estrógenos, ya que la mayor producción de este mensajero se observó con las isoformas menos ácidas y la menor con las más ácidas o sializadas (figura 18). Para corroborar los resultados anteriores se realizó RT-PCR de la P450 aromatasa. Como se puede observar en la figura 18, la aplicación de esta técnica alternativa confirmó los resultados del estudio por hibridación.



**Figura 18 izquierda:** El panel superior muestra un análisis representativo de hibridación por Northern Blot del ARNm de citocromo P<sub>450</sub> aromatasa inducido por las isoformas de FSH II a VII. Cp: Control positivo (ARN total extraído de ovarios de rata de 18 días de gestación); Cn: Control negativo (células de la granulosa en ausencia de FSH). Est: estándar de FSH (LER-907, 2.7 ng). El panel inferior muestra la relación biológica: inmunológica de las isoformas II a VII en términos de producción de estradiol (datos obtenidos de la tabla 2). Observe la correlación entre la potencia de las diferentes isoformas de FSH para inducir la citocromo P<sub>450</sub> aromatasa y la producción de estrógenos. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. **Figura 18 derecha:** Panel superior RT-PCR del ARNm de P<sub>450</sub> aromatasa inducido por las diferentes isoformas de FSH (II a VII). Panel intermedio, el mismo análisis pero del ARNm de glicerhaldéhid 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD, enzima constitutiva de la gluconeogénesis). Panel inferior, normalización de la producción del ARNm inducido por las isoformas de FSH (densidad óptica de P<sub>450</sub> aromatasa / densidad óptica de G3PD).

El efecto antagonista de la isoforma I en la producción del ARNm de la P<sub>450</sub> aromatasa inducida por recFSH se pone de manifiesto en la figura 19. La isoforma I inhibió la inducción del ARNm de P<sub>450</sub> aromatasa por recFSH (carril 4), y fue incapaz de activar la transcripción del mismo ARNm por si sola (carril 5). Además este inhibidor no tuvo efectos sobre la síntesis del ARNm de G3PD (carriles 8 y 9) lo que indicó la especificidad de la isoforma antagonista sobre la acción de recFSH.

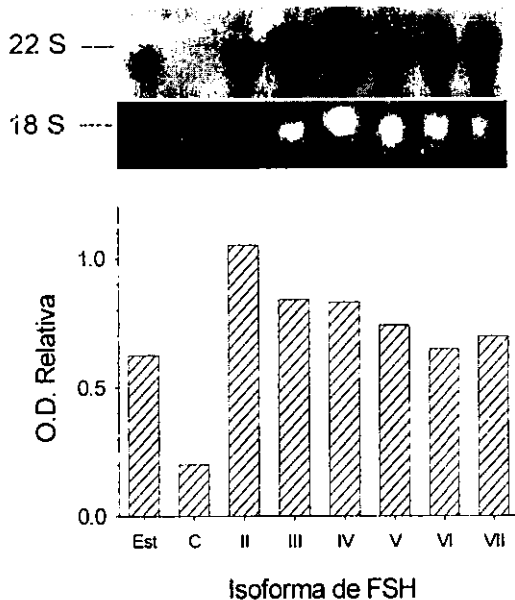




**Figura 19:** RT-PCR del ARNm de la P<sub>450</sub> aromatasa inducida por la isoforma I. Las células se cultivaron durante 24hs en medio de cultivo libre de inhibidores de fosfodiesterasas; posteriormente se estimularon con recFSH 2.7ng (carril 3), recFSH 2.7 ng + Isoforma I 1.4ng (carril 4), isoforma I 1.4ng (carril 5). Se extrajo el ARN total y se realizó la transcripción reversa seguida de PCR de cada uno de los cDNA obtenidos. Del carril 6 al 9 se observa el mismo análisis del ARNm de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD). Carril 1: Standard de peso molecular.

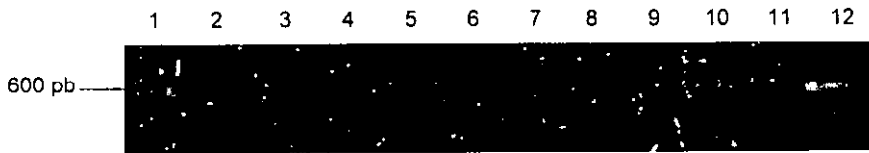
**Análisis de la inducción del ARNm de tPA**

Como se muestra en la figura 20, todas las isoformas con actividad agonista (II a VII) fueron capaces de estimular la producción de ARNm para tPA. En estos experimentos, las isoformas con mayor potencia fueron las II, III y IV.



**Figura 20:** Análisis por hibridación por Northern Blot del ARNm del tPA (panel superior) inducido por las isoformas de FSH II a VII en células de la granulosa en cultivo. El panel intermedio representa el ARNr 18S del mismo gel de hibridación, en tanto que el panel inferior muestra la normalización correspondiente. Est= estándar de FSH (recFSH), C= células sin estimular.

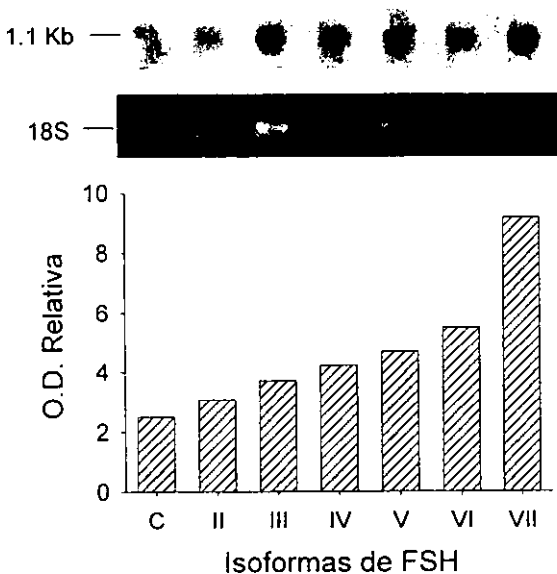
En el caso de la isoforma I, los resultados fueron semejantes a los observados para la P<sub>450</sub> aromataasa, encontrándose inhibición del ARNm del tPA inducida por recFSH unicamente en las incubaciones realizadas en presencia de la isoforma I (FSHi) (figura 20).



**Figura 21:** Inhibición de la expresión del ARNm de tPA por la isoforma I. Carriles 1 y 10 estándar de peso molecular, carriles 2 a 5, RT-PCR del tPA [2: células de la granulosa sin estimular; 3: células estimuladas con recFSH 2.8 ng; 4: células estimuladas con recFSH 2.8 ng + FSHi 1.4 ng; 5: células estimuladas con FSHi 1.4 ng]; carriles 6 a 9, RT-PCR de G3PD con los mismos estímulos que en los carriles 2 a 5 respectivamente; carril 11, control positivo de tPA, carril 12 control positivo de P<sub>450</sub> aromataasa.

#### Análisis de la inducción del ARNm de $\alpha$ -inhibina ( $\alpha$ -INH)

La  $\alpha$ -inhibina es la subunidad común de las diferentes formas de inhibina. Esta es una proteína sintetizada por las células de la granulosa en respuesta a la FSH, a través de la activación de la proteína G $\alpha$ s y la cual tiene actividad inhibitoria sobre la síntesis de FSH a nivel hipofisiario.



**Figura 22:** Análisis de hibridación por Northern Blot del ARNm de  $\alpha$ -INH inducido por las isoformas II a VII de FSH. Panel superior: Northern Blot representativo; panel intermedio: ARN ribosomal 18S; panel inferior: normalización (densidad óptica relativa del ARNm de  $\alpha$ -INH / densidad óptica relativa del ARNr 18S). las células de la granulosa fueron incubadas 24 h en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasa y posteriormente durante 24 h adicionales en presencia de isoformas de FSH y MIX.

La detección de la subunidad  $\alpha$  de INH o de su ARNm puede ser utilizada por lo tanto como marcador de la actividad biológica de FSH en sistemas *in vitro*. En este estudio (figura 22), se encontraron resultados opuestos a los observados para el ARNm de P450 aromatasa y tPA (figuras 17 y 20). Las isoformas más ácidas fueron las más potentes para inducir la producción del ARNm de  $\alpha$ -INH que sus contrapartes menos ácidas/sializadas.

*Estudio del mecanismo de acción de la isoforma I (FSHi)*

La observación de que FSHi en dosis bajas fue capaz de estimular la acumulación de AMPc y de potenciar parcialmente el efecto de la FSH hipofisaria, y de que la exposición a esta isoforma por 24h de células de embrión fetal humano que expresan el receptor humano recombinante de la FSH resultara en una acumulación significativa de AMPc (resultados preliminares no mostrados), sugirió que el mecanismo de inhibición de esta isoforma en la producción de estrógenos y del tPA inducidos por FSH hipofisaria podría ser ejercido en niveles posteriores a la formación de este segundo mensajero. Para demostrar esta hipótesis, analizamos el efecto de FSHi sobre la producción de estradiol y actividad del tPA inducida por el dibutilil-AMPc (DBAMPc: un análogo del AMPc que es degradado lentamente por fosfodiesterasas).

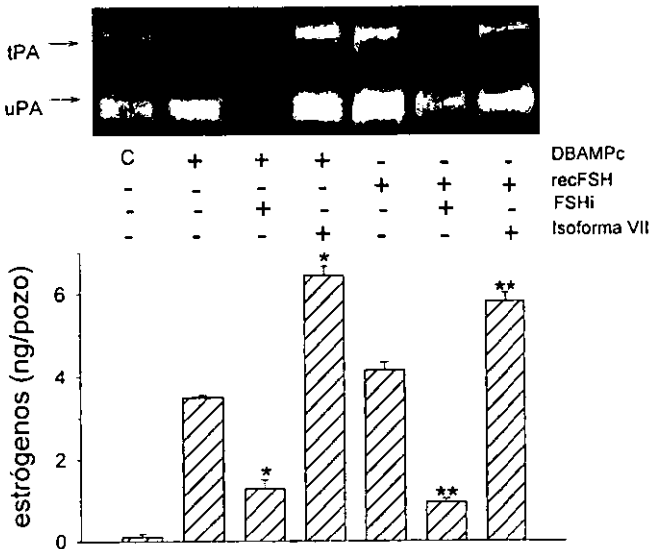
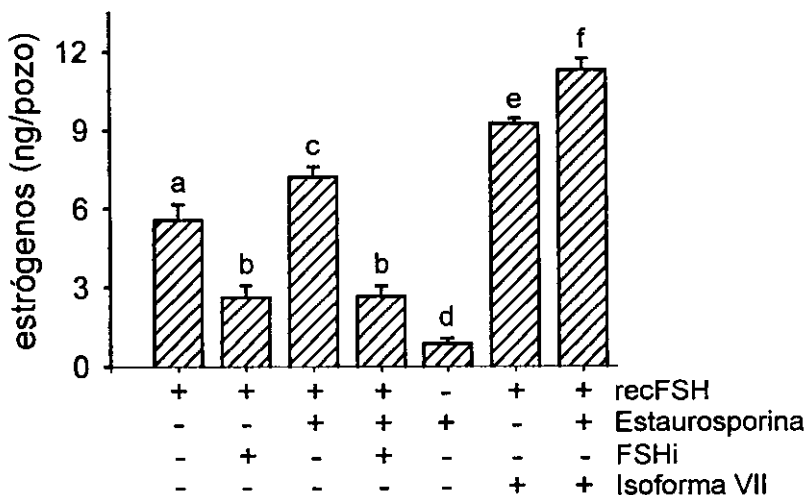


Figura 23: Efecto de FSHi y de la isoforma VII en la producción de tPA (panel superior) y de estrógenos (panel inferior) inducida por DBAMPc o recFSH. Células de la granulosa fueron incubadas durante 72 horas en ausencia (C) o presencia de DBAMPc o recFSH, solos o coincubados con FSHi o la isoforma VII. La actividad enzimática de tPA fue posteriormente analizada por zimografía (panel superior) y la producción de estrógenos por RIA (panel inferior). \* p<0.05 vs DBAMPc solo; \*\* p<0.05 vs recFSH sola. Se encontraron resultados similares en 2 experimentos independientes adicionales.

Como muestra la figura 23, la isoforma I (FSHi) inhibió tanto la producción de estradiol como la de tPA inducida por DBAMPc (carril 3) o recFSH (carril 6), mientras que los efectos del análogo fueron potenciados por la isoforma VII (carril 4 y 7 respectivamente).

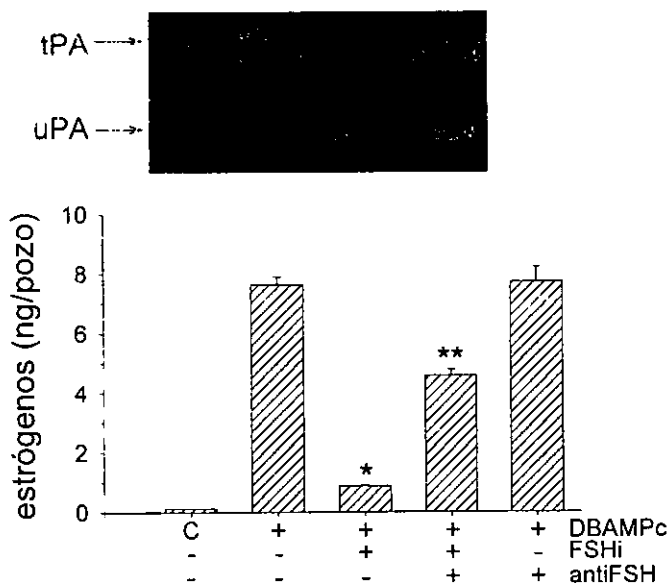
Conociendo que la vía de traducción de señal a través de la cinasa de proteína C (PKC) puede bloquear algunas acciones mediadas por FSH sobre la célula de la granulosa y de Sertoli (Lambert *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 1995), investigamos la posibilidad de que los efectos antagonistas pudieran estar relacionados con la activación de PKC. Para ello se incubaron células de la granulosa con recFSH y de FSHi en presencia o ausencia de estaurosporina, un inhibidor muy efectivo de la PKC. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 24.



**Figura 24:** Efecto del inhibidor de la PKC estaurosporina sobre la producción de estradiol por células de la granulosa de rata en cultivo. Las células fueron estimuladas con 2.7 ng de recFSH durante 48hs en ausencia o presencia de estaurosporina 0.5 nM, 1.4 ng de FSHi o 1.4 ng de la isoforma VII. Al final del período de incubación se colectó el medio de cultivo y se analizó su contenido de estrógenos totales por RIA. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de incubaciones por triplicado. Los valores (media  $\pm$ DE) para las incubaciones control fueron:  $0.4 \pm 0.03$  ng/pozo (ausencia de hormonas o de estaurosporina),  $0.5 \pm 0.02$  ng/pozo (FSHi sola) y  $4.7 \pm 0.2$  ng/pozo (Isoforma VII). Diferentes letras sobre las barras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ).

Como ha sido informado previamente (Lambert *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 1995 ), la inhibición de la PKC por la estaurosporina indujo un leve pero significativo aumento en la aromatización de andrógenos tanto basal como inducida por FSH. La inclusión del inhibidor de esta cinasa no alteró, sin embargo el efecto inhibitorio de FSHi sobre la producción de estradiol mediada por recFSH indicando que su efecto antagonístico fue independiente de la activación de esta vía.

Para descartar la posibilidad de que la inhibición de los efectos de la FSH por la isoforma I (FSHi) hubiera ocurrido de forma inespecífica por la acción de un factor contaminante presente en la muestra (que pudiera interferir con la viabilidad celular o bien inhibir inespecíficamente la producción de estradiol y tPA), se realizaron dos experimentos adicionales. En el primero se incubaron células de la granulosa en presencia de recFSH, recFSH y FSHi o FSHi sola y después de 48h se analizó la viabilidad celular a través de la capacidad de las células para excluir el colorante colorante vital azul de tripán. El análisis cualitativo mostró que no hubo diferencias en los patrones de tinción entre los grupos celulares que recibieron los diferentes tratamientos mencionados.



**Figura 25:** inmunoneutralización de los efectos inhibitorios de FSHi sobre la actividad del tPA (panel superior) y la producción de estrógenos (panel inferior) inducida por DBAMPC en células de la granulosa. Las células se cultivaron con DBAMPC 0.5 mM por 48hs en ausencia o presencia de 2.8 ng de FSHi con o sin la adición de anti-FSH a una dilución 1:10000. \* $p < 0.01$  vs. DBAMPC solo y DBAMPC + anti-FSH,  $p < 0.05$  vs control (C). \*\*  $p < 0.01$  vs todos los demás grupos.

En el segundo experimento (figura 25) se midió la producción de estrógenos y tPA inducida por DBcAMP y por DBcAMP coincubado con FSHi en presencia o ausencia de anti-FSH-6 (un anticuerpo policlonal altamente específico dirigido contra la FSH humana) a un título suficiente que bloqueara los efectos de cantidades equivalentes de recFSH (resultado no mostrado). El anticuerpo anti-FSH revirtió en un 60% y 80% los efectos inhibitorios de la isoforma I en la producción de estradiol y de tPA inducidos por DBAMPc.

## VI. DISCUSION

Los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas son indispensables para la expresión de su actividad biológica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Se ha demostrado que la remoción parcial de sus oligosacáridos, ya sea por mutagénesis dirigida o por tratamientos enzimáticos o químicos disminuye la actividad biológica de estas hormonas (Bishop *et al.*, 1994;1995), mientras que la eliminación completa de los mismos mediante los procedimientos anteriores produce la pérdida total de la actividad biológica, conservándose la capacidad de unión a su receptor y convirtiendo a la variante artificial o sintética en un antagonista de la hormona silvestre o natural capaz de inhibir su unión al receptor y la generación de segundos mensajeros: (Sairam y Bhargavi, 1985; Manjunath y Sairam, 1982).

En el presente estudio, analizamos en detalle la actividad biológica *in vitro* de siete variantes por carga de la FSH hipofisaria a las cuales se les extrajo por cromatografía de afinidad la LH que habitualmente co-eluye con ellas en el CF. Los puntos isoeléctricos de las isohormonas aisladas variaron desde >7.1 para la isoforma I hasta < 3.8 para la obtenida en el pico de sal (isoforma VII), demostrándose la gran heterogeneidad por carga, y por lo tanto la alta variabilidad en contenido de ácido siálico presente en la FSH de origen natural (hipofisaria). Todas las isoformas, fueron capaces de inducir la síntesis del segundo mensajero (AMPc) generado por la activación de la vía dependiente de la proteína G $\alpha$ s, y con la excepción de la más básica (isoforma I) la secreción de al menos dos productos finales (estrógenos y tPA), así como la expresión de sus genes respectivos medida a través de la síntesis de sus ARN mensajeros. La isoforma I o FSHi, la cual mostró una baja actividad agonista en términos de producción de AMPc, posee presumiblemente una mayor proporción de oligosacáridos relativamente ricos en manosa y de estructura híbrida (Creus *et al.*, 1996) que de aquellos de estructura compleja que terminan en ácido siálico (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1984). A este respecto, esta isoforma natural es estructuralmente similar a la FSH recombinante producida en baculovirus, la cual está pobremente glicosilada (Jarvis y Finn, 1995), pero diferente a los análogos sintéticos con actividad antagonista, los cuales están completamente deglicosilados (Sairam, 1989).

La inducción de la síntesis de los diferentes productos finales, así como de sus ARNm no fue sin embargo uniforme para las isoformas que presentaron actividad agonista (II a VII). Las variantes de la FSH menos ácidas (isoformas II a IV, con un contenido relativamente bajo de ácido siálico y posiblemente con oligosacáridos de baja y mediana complejidad) mostraron una mayor actividad biológica a nivel de la célula blanco que sus contrapartes ricamente sializadas (V a VII), y al menos entre estas variantes no encontramos efectos diferenciales o únicos en cuanto a su capacidad de inducir la producción de estradiol y tPA, pero si una actividad biológica dispar. La potencia relativa de las isoformas menos ácidas *versus* las más ácidas para inducir la actividad enzimática de tPA fue mayor que aquella para producir estrógenos (2.5 a 4.5 veces vs 1.8 a 3 veces, respectivamente). El potente efecto sobre la producción de tPA presentada por las isoformas menos ácidas podría estar relacionado con el fenómeno de la ovulación, ya que se ha demostrado que la secreción de estas variantes se incrementa significativamente en el periodo preovulatorio del ciclo menstrual de la mujer (Zambrano *et al*, 1995; Padmanabhan *et al.*, 1988). Tal parecería, por lo tanto, que las diferencias en actividad biológica intrínseca (presente estudio) y vida media circulante (Ben-Rafael *et al.*, 1995) entre las diferentes isoformas de la FSH se correlacionan con los cambios en el patrón de secreción de las mismas durante el ciclo menstrual; aparentemente, la predominancia de isoformas circulantes fuertemente ácidas y de desaparición plasmática lenta (Ben-Rafael *et al.*, 1995; Timossi *et al*, 1998b) durante la fase folicular estaría relacionada con la necesidad de un estímulo gonadotrópico moderado pero sostenido que regule procesos fisiológicos tales como el crecimiento y la maduración foliculares, en tanto que el aumento en la secreción de isoformas menos ácidas de corta acción (poco sializadas) que se observa en la fase folicular tardía y la preovulatoria respondería a la necesidad de un estímulo potente y breve que conlleve a la ruptura del folículo y la ovulación sin sobrestimular otras funciones del aparato folicular o a los folículos en desarrollo destinados a madurar en los ciclos subsiguientes.

Otro efecto dispar encontrado en este estudio fue sobre la producción del ARNm de  $\alpha$ -inhibina, la cual fue significativamente mayor en respuesta al estímulo de las isoformas más ácidas/sializadas que a sus contrapartes con menor grado de sialización. Este efecto, no descrito previamente para las isoformas naturales de esta



gonadotropina, podría ser debido a las siguientes razones: 1- Ha sido recientemente descrito el efecto inhibitorio de los estrógenos producidos en respuesta al estímulo gonadotrópico sobre la transcripción del gene de la  $\alpha$ -inhibina en células de la granulosa de rata en cultivo (Tate *et al.*, 1996; Tekmal *et al.*, 1996). Dado que la producción de estrógenos es mayor para las isoformas menos ácidas (tabla 2) y menor para las variantes más sializadas, se esperaría que a mayor producción de estrógenos menor producción del  $\alpha$ -inhibina. Este efecto parácrino o autócrino, está mediado por mecanismos de transducción de señal hasta ahora desconocidos y podría explicar, al menos en parte, la regulación negativa de los estrógenos sobre la producción de inhibina luego del pico gonadotrópico preovulatorio (Tekmal *et al.*, 1996). 2- Como se discutió previamente, el receptor de FSH envía señales intracelulares fundamentalmente a través de vías dependientes de AMPc, es decir induce la transcripción de factores activadores o represores tales como el CREB y el CREM respectivamente. Así, el segundo mecanismo podría llevarse a cabo a través de la supresión de la transcripción del gene de la  $\alpha$ -inhibina desencadenada por un represor inducible temprano de AMPc (ICER) producido en respuesta a la estimulación de la célula de la granulosa por FSH (Mukherjee *et al.*, 1998). El ARNm del ICER se transcribe desde un promotor intrónico del CREM (Molina *et al.*, 1993) y codifica para una proteína que contiene los dominios de unión al ADN y de dimerización pero que carece de los dominios de transactivación y los de cinasa-inducible, por lo que actúa como un potente represor. El promotor intrónico del ICER es en si mismo inducido por AMPc, por lo cual su expresión está autorregulada. 3- Ha sido recientemente sugerido que la estimulación de la expresión del gene de la  $\alpha$ -inhibina mediada por FSH requiere obligadamente de la activación de cinasas de tirosina endógenas a través de la activación del receptor de factor de crecimiento semejante a insulina (IGF-I) (Li *et al.*, 1998). Además, la FSH es capaz de regular en forma decreciente la producción de las proteínas ligadoras del factor de crecimiento semejante a insulina (IGFBP's) en la célula de la granulosa (Barreca *et al.*, 1996; Iwashita *et al.*, 1994). Por ello, otro mecanismo podría relacionarse con la capacidad de cada isoforma para inducir en forma diferencial la síntesis de IGFBP's, regulando de esta manera la concentración de IGF-I libre. En esta última eventualidad se tendría que asumir que las isoformas menos ácidas son

menos potentes que las más ácidas para inducir la producción de estas proteínas unificadoras de IGF-I.

Solo una isoforma de entre todas las isoformas naturales de la FSH hipofisiaria fue capaz de inducir un efecto diferencial. La isoforma I (FSHi) inhibió la acción de FSH en la aromatización de andrógenos y la inducción de tPA por células de la granulosa en cultivo. Este efecto no pudo ser detectado en estudios previos debido al alto contenido de LH presente en la preparación original (Zambrano *et al.*, 1996) y/o al empleo de columnas de cromatoenfoque de menor resolución (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992) lo cual no permite separar adecuadamente las isoformas básicas con actividad antagonista de aquellas con actividad agonista (observaciones inéditas). Más aún, los efectos antagonistas de FSHi no fueron debidos a contaminación de la preparación libre de LH con factores que podrían potencialmente interferir con algunas de las acciones mediadas por FSH (Villanueva *et al.*, 1996, Orly *et al.*, 1994), ya que la adición de un anticuerpo contra la FSH humana al medio de incubación neutralizó efectivamente la actividad inhibitoria de FSHi. Además, esta isoforma antagonista inhibió específicamente los ARNm de P<sub>450</sub> aromatasas y tPA pero no el de la G3PD. La observación de que el procedimiento de inmunoneutralización de los efectos de FSHi sobre la acción de FSH no pudo revertir en forma completa los efectos bloqueadores, pudo haberse debido a una discreta sobrestimación de la cantidad de FSHi presente en la muestra por el inmunoensayo empleado en el presente estudio (Zambrano *et al.*, 1996). De manera opuesta a lo observado con FSHi, los efectos agonistas de la variante altamente sializada empleada como control positivo (isoforma VII) no se afectaron por la remoción de LH a pesar de que, como se mencionó anteriormente, fue sometida a cromatografía de afinidad dos veces.

El o los mecanismos a través de los cuales este inhibidor natural afecta la producción de tPA y la aromatización de andrógenos inducidas por FSH-I1 y recFSH son inciertos. Los resultados de este estudio demostraron que la inhibición no fue debida [al menos como mecanismo único, tal y como sucede con los análogos sintéticos (Manjunathm y Sairam, 1982)] a desplazamiento competitivo a nivel del receptor, ya que a dosis bajas el inhibidor fue capaz de activar al receptor e inducir la generación de un segundo mensajero. Esta última observación, aunado al hallazgo de

que la isoforma antagonista induce de manera dosis-dependiente la síntesis de AMPc en células humanas que expresan el receptor recombinante humano de FSH (Zambrano *et al.*, 1996), indicaría que los efectos inhibitorios de FSHi fueron ejercidos a nivel de la vía AMPc-PKA o de vías independientes a ésta; la observación de que los efectos de FSHi fueron insensibles a la estaurosporina sugieren que el bloqueo no fue mediado por la activación simultánea de la vía mediada por la cinasa de proteína C (PKC), la cual es uno de los mecanismos por los cuales el receptor de FSH es desensibilizado (Lambert *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 1995; Ascoli *et al.*, 1994). Parecería ser, por lo tanto, que FSHi actúa a través de vías alternas para inhibir los efectos de FSH. A este respecto se podrían proponer varios mecanismos que pudieran interferir con la expresión génica inducida por FSH, incluyendo la activación-cruzada ('cross-talk') de receptores para hormonas con actividad antagonista de FSH, como sería el caso de la prolactina, la cual se ha encontrado que suprime la acción estimuladora de FSH en células de la granulosa (Villanueva *et al.*, 1996) ó a la inhibición de la activación de la cinasa de tirosina independiente de receptor, efecto que eventualmente bloquearía la acumulación del ARNm de la P<sub>450</sub> aromataza (Orly *et al.*, 1996; Costrici *et al.*, 1995). Otra alternativa es que FSHi pueda ejercer su efecto antagónico incrementando las concentraciones intracelulares de inhibidores de la PKA, los cuales si bien no han sido aún aislados de células de la granulosa, existen en una amplia variedad de tejidos, incluyendo a las células de Sertoli (Tash *et al.*, 1981). Finalmente, es bien conocido que las proteínas ligadoras del factor semejante a la insulina (IGFBPs), cuya síntesis y secreción es regulada por la FSH en las células de la granulosa (Barreca *et al.*, 1996; Iwashita *et al.*, 1994), son capaces de bloquear la acción de las gonadotropinas incluyendo la producción de estradiol e inducción de tPA (Yoshimura *et al.*, 1996); es posible, por lo tanto, que FSHi antagonice las acciones estimuladoras de FSH a través del incremento en la producción de estas proteínas ligadoras (Mason *et al.*, 1998).

Recientemente se ha informado que células de insecto transfectadas con el gene de la FSH humana producen variantes incompletamente glicosiladas (Jarvin y Finn, 1995), las cuales pueden ejercer efectos antagonistas o agonistas de FSH dependiendo del grado de ocupación del receptor y de la activación del trasmisor de la señal intracelular (Arey *et al.*, 1997). Aunque la activación simultánea de varias subclases de

proteínas G ( $G_s$  y miembros de  $G_{Vo}$ ) o el desacoplamiento entre el receptor y su señal estimuladora dependiente de proteínas G pudieran explicar los efectos duales inducidos por estos análogos expresados en baculovirus, en el presente estudio se encontró que la isoforma I bloqueó eficientemente los efectos estimulatorios del DBAMPc, por lo que es poco probable que su efecto inhibitorio haya sido mediado a través de la activación de proteínas  $G_{Vo}$ .

Aunque el significado fisiológico de la existencia de FSHi es en este momento incierta, es tentador el especular que en algunas condiciones fisiológicas, como por ejemplo la fase preovulatoria del ciclo menstrual, esta antihormona natural pueda funcionar como un regulador fino de la intensidad de la señal gonadotrópica para evitar la sobrestimulación del folículo en sus etapas finales de maduración. De hecho, varios estudios han encontrado que la secreción basal de esta variante particular de FSH se incrementa durante la fase folicular tardía del ciclo menstrual (Zambrano *et al.*, 1995). Por el contrario, las concentraciones anormalmente elevadas de este inhibidor podrían contrarrestar excesivamente el estímulo fisiológico de la FSH llevando eventualmente a un estado de hipogonadotropismo. La presencia de este inhibidor natural en cantidades excesivas podría explicar la causa del hipogonadismo hipergonadotrópico en el caso recientemente informado (Dumestic *et al.*, 1993) de una mujer joven infértil, con cocientes B/l disminuidos y cuya FSH en suero contenía variantes básicas de FSH anormalmente altas (65% del total) en contraste con lo generalmente encontrado en mujeres normales (Zambrano *et al.*, 1995, Padmanabhan *et al.*, 1988). La posibilidad de que FSHi pueda ser producida y secretada por la hipófisis en ciertas condiciones está apoyada adicionalmente en la observación de que ciertas mujeres hipogonádicas tratadas con antagonistas de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) pueden exhibir formas circulantes de la FSH sin actividad biológica pero con la capacidad de bloquear la acción de la FSH a nivel de la célula blanco (Dahl *et al.*, 1988).

## VII. CONCLUSIONES

En resumen, en este estudio se encontró que la hipófisis anterior es capaz de producir diferentes isoformas de la hormona estimulante del folículo que pueden actuar como agonistas o antagonistas de la acción de FSH, y que los primeros pueden ejercer efectos dispares a nivel de su célula blanco. Los hallazgos indican en conjunto que el sistema receptor – transductor que activa o inhibe señales intracelulares en respuesta a FSH, posee una versatilidad suficiente para responder de una manera diferente a estímulos de naturaleza diversa, como los representados por las isoformas de la hormona y/o alguno de sus productos finales (*v.gr.* estrógenos, IGFbps). La caracterización de la estructura química de estas glico-variantes podría ser potencialmente útil para definir de una manera más precisa la relación estructura-actividad de la FSH así como para el diseño de análogos que pudieran ser empleados en el control exógeno de la maduración folicular o en anticoncepción.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., May, J.V., Knecht, M., Svoboda, M.E., Van Wyk, J. (1988) Insulin-like growth factor-I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, **122**, 1583-1591

Albanese, C., Christin-Maitre, S., Sluss, P.M., Jameson, J.L. (1994). Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and cAMP responsive luciferase reporter gene. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **101**, 211-219.

Albanese, C., Colin, I.M., Crowley, W.F., Ito, M., Pestell, R.G., Weiss, J., Jameson, J.L. (1996). The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res*, **51**, 23-61.

Arey, B.J., Stevis, P.E., Deecher, D.C., Shen, E.S., Frail, D.E., Negro-Vilar, A., Lopez, F.J. (1997). Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: A novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol. Endocrinol.* **11**, 517-526.

Baenzinger, J.U., Green, D.E. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of asparagine linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**, 287-306.

Barreca, A., Artini, P.G., Cesarone, A., Arvigo, M., Dambrogio, G., Genazzani, A.R., Giordano, G., Minuto, F. (1996). Interrelationships between follicle stimulating hormone and the growth hormone-insulin-like growth factor-I/IGF-binding proteins axes in human granulosa cells in culture. *J Endocrinol Invest*, **19**, 35-42.

Ben-Menahem, D., Shraga-Levine, Z., Mellon, P.L., Naor, Z. (1995). Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone upon gonadotropin alpha-subunit mRNA levels in the alpha T3-1 cell line: role of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. *Biochem. J.*, **309**, 325-329.

Ben Rafael, Z., Levy, T., Schomaker, J. (1995). Pharmacokinetics of follicle-stimulating hormone: clinical significance. *Fertil. Steril.*, **63**, 689-700.

Besecke, L.M., Guendner, M.J., Schneyer, A.L., Bauer-Dantoin, A.C., Jameson, J.L., Weiss, J. (1996). Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone-beta gene expression through an activin/follistatin autocrine or paracrine loop. *Endocrinology*, **137**, 3667-3673.

Bicsak, T.A., Cajander, S.B., Peng, X.R., Ny, T., LaPolt, P.S., Lu, J.K., Kristensen, P., Tsafiri, A., Hsueh, A.J. (1989). Tissue-type plasminogen activator in rat oocytes: expression during the periovulatory period, after fertilization, and during follicular atresia. *Endocrinology*, **124**, 187-194.

Bishop, L.A., Nguyen, T.V., Schofield, P.R. (1995). Both of the  $\alpha$ -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., 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.

Boime, I., Boothby, M., Hoshina, M., Daniels-McQuenn, S., Darnell, R. (1982). Expression and structure of human placental hormone genes as a function of placental development. *Biol. Reprod.*, **26**, 73-91.

Boothby, M., Ruddon, R.W., Anderson, C., Mc Williams, D., Boime, I. (1981) A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5121-5127.

- Bousfield, G.R., Butnev, V.Y., Gotschall, R.R., Baker, V.L., Moore, W.T. (1996). Structural features of mammalian gonadotropins. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **125**, 3-19.
- Bousfield, G.R., Perry, M.W., Ward, D.M. Gonadotropins: Chemistry and biosynthesis. En: Knobil A and Neill J.D. (eds.), *The physiology of Reproduction*, Raven Press, Ltd., New York, pp. 1749-1792.
- Braun, T., Schofield, P.R., Sprengel, R. (1991). Amino-terminal leucine rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO. J.*, **10**, 1885-1890.
- Chappel, S.C. (1995). Heterogeneity of follicle-stimulating hormone: control and physiological function. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 479-487.
- Chappel, S.C., Ramaley, J.A. (1985). Changes in the isoelectric focusing profile of pituitary follicle-stimulating hormone in the developing male rat. *Biol. Reprod.*, **32**, 567-573.
- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A., Coutifaris, C. (1983a). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endoc. Reviews*, **4**, 179-211
- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A., Ramaley, J.A. (1983b). Sexual maturation in female rats: time related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary FSH. *Biol. Reprod.*, **28**, 196-205.
- Chin, W.W., Maizel, J.V. Jr., Habener, J.F. (1983). Difference in sizes of human compared to murine alpha-subunits of the glycoprotein hormones arises by four-codon gene deletion or insertion. *Endocrinology*, **112**, 482-485.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.
- Costrici, N., Elberg, G., Lunenfeld, B., Pariente, C., Dor, J., Kanety, H., Karasik, A. (1995). A cytosolic protein tyrosine kinase activity induced by follicle-stimulating hormone and insulin growth factor I in granulosa cells. *Endocrinology*, **136**, 4705-4708.
- Creus, S., Chaia, Z., Pellizari, E., Cigorraga, S., Ulloa-Aguirre A. (1996). Biological characterization of pituitary human FSH. Program of the 10<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, San Francisco, CA. Resumen P3-296
- Culler, M.D., Negro-Vilar, A. (1990). Destruction of testicular Leydig cells reveals a role of endogenous inhibin in regulating follicle-stimulating hormone secretion in the adult male rat. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **70**, 89-98.
- Culler, M.D. (1990). Role of the Leydig cells and endogenous inhibin in regulating pulsatile gonadotropin secretion in the adult male rat. *Endocrinology*, **127**, 2540-2550.
- Dahl, K., Jia, X.C., Hsueh, A. (1989). Granulosa cell aromatase bioassay for follicle stimulating hormone. *Methods in Enzymol.*, **168**, 414 -422.
- Dahl, K., Bicsak, T.A., Hsueh, A.J.W. (1988). Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with GnRH analog. *Science*, **239**, 72-74.
- Dalkin, A.C., Haisenteder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., Marshall, J.C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, **125**, 917-924.
- Damián-Matsumura, P., Zaga, V., Sanchez-Hernandez, C., Maldonado, A., Timossi, C., Ulloa-Aguirre A. (1998). The changes in the  $\alpha$ -2,3 sialyltransferase mRNA levels during the rat estrous cycle and after castration correlate with variations in the charge distribution of intrapituitary follicle-stimulating hormone

(FSH). Program of the 80<sup>th</sup> Annual meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA. Resumen OR-28.6.

Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L., Habener, J.F. (1988a). Cyclic AMP and phorbol ester-stimulated transcription mediated by similar DNA elements that bind distinct proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7922-7926.

Deutsh, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L., Lin, J.C., Habener, J.F. (1988b). Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive elements. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18466-18472.

Dharmesh, S.M., Baenzinger, J.U. (1993). Estrogen modulates expression of the glycosyltransferase that synthesizes sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11127-11130.

Dighe, R.R., Murthy, G.S., Kurkalli, B.S., Moudgal, N.R. (1990). Conformation of the alpha-subunit of glycoprotein hormones: a study using polyclonal and monoclonal antibodies. *Mol. Cell Endocrinol.*, **72**, 63-70.

Dumestic, D.A., Padmanabhan, V., Beitins, I.Z., Sostein, J.S., Shapiro, S.S. (1993). Elevated serum levels of immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) with partial bioactivity mimics hypergonadotropic hypogonadism in women with infertility. Program of the 75<sup>th</sup> Annual meeting of The Endocrine Society, Las Vegas, NV, Resumen 1064.

Erickson, G.F., Hsueh, A.J.W. (1978a). Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*, **103**, 1960-1963.

Erickson, G.F., Hsueh, A.J.W. (1978b). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology*, **102**, 1275 - 1282.

Fiddes, J.C., Talmadge, K. (1984). Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* **40**, 43-78.

Fiete, D., Srivastava, V., Hindsgaul, O., Baenzinger, J.U. (1991). A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO4 - 4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2 Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*, **67**, 1103-1110.

Flack, M.R., Froehlich, J., Bennet, A.P., Anasti, J., Nisula, B.C. (1994). Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14015-14020.

Fortune, J.E., Armstrong, D.T. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology*, **100**, 1341-1347.

Furuhashi, M., Suzuki, S., Suganuma, N. (1996). Disulfide bonds 7-31 and 59-87 of the alpha-subunit play a different role in assembly of human chorionic gonadotropin and lutropin. *Endocrinology*, **137**, 4196-4200.

Fujiki, Y., Rathnam, P., Saxena, B.B. (1980). Studies on the disulfide bonds in human pituitary follicle-stimulating hormone. *Biochim Biophys Acta*, **624**, 428-435.

Galway, A.B., Hsueh, A.J.W., Keene, J.L., Yamoto, M., Fauser, B.C.J.M., 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.

Gharib, S.D., Wierman, M.E., Badger, T.M., Chin, W.W. (1987). Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J. Clin. Invest.* **80**, 294-299.



- Gharib, S.D., Roy, A., Wierman, M.E., Chin, W.W. (1989). Isolation and characterization of the gene encoding the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA*, **8**, 339-49.
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., Chin, W.W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endoc. Reviews*, **11**, 177-199.
- Godine, J.E., Chin, W.W., Habener, J.F. (1982). Alpha subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8368-8371.
- Gordon, D.F., Wood, W.M., Ridgway, E.C. (1988). Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA*, **7**, 679-690.
- Granelli-Piperno, A., Reich, E. (1978). A study of proteases and proteases inhibitors complexes in biological fluids. *J. Exp. Med.*, **148**, 223-234.
- Grasso, P., Deziel, M.R., Reichert, L.E. (1995a). Synthetic peptides corresponding to residues 551 to 555 and 650 to 653 of the rat testicular follicle-stimulating hormone (FSH) receptor are sufficient for post-receptor modulation of Sertoli cell responsiveness to FSH stimulation. *Reg. Pept.*, **60**, 177-183.
- Grasso, P., Leng, N., Reichert Jr., L.E. (1995b) A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmic loop (residues 533 to 555) of the testicular follicle-stimulating hormone receptor affects signal transduction in rat testis membranes and in intact cultured rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **110**, 35-41.
- Gudermann, T., Brockmann, H., Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. (1994). *In vitro* bioassay for human follicle stimulating hormone (FSH), based on L-cells transfected with recombinant rat FSH receptor: Validation of a model system. *Endocrinology*, **135**, 2204-2213.
- Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y., Sugino, H. (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13835-13842.
- Heckert, L.L., Daley, I.J., Griswold, M.D. (1992). Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 70-80.
- Heikoop, J.C., Van den Boogaart, P., Mulders, J.W., Grootenhius, P.D. (1997) Structure-based design and the protein engineering of intersubunit disulfide bonds in gonadotropins. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 658-662.
- Heussen, C., Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl-sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, **102**, 196-202.
- Hickey, G.J., Chen, S., Besman, M.J., Sively, J.E., Hall, P.F., Gaddy-Kurten, D., Richards, J.S. (1988). Hormonal regulation, tissue distribution and content of aromatase cytochrome P450 mRNA and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, **122**, 1426-1436.
- Hong, H., Herington, A.C., Roupas, P. (1995). Effect of protein kinase C modulation on gonadotrophin-induced granulosa cell steroidogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**, 83-90.
- Hsueh, A.J.W., Bicsak, T., Jia, X.C., Dahl, K.D., Fauser, B.C., Galway, A.B., Czekala, N., Pavlou, S.N., Papkoff, H., Keene, J. (1989). Granulosa cells as hormone targets: The role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Hormone Res.*, **45**, 209-277.

Iwashita, M., Adachi, T., Katayama, E., Kudo, Y., Takeda, Y. (1994). Regulation and physiological role of insulin-like-growth-factor-binding protein-1 in human granulosa cells. *Horm. Res.*, **41** (Sup 1), 22-28.

Jakubowiak, A., Janecki, A., Tong, D., Sanborn, B.M., Steinberger, A. (1991). Effects of recombinant human inhibin and testosterone on gonadotropin secretion and subunit mRNA in superfused male rat pituitary cell cultures stimulated with pulsatile gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **82**, 265-273.

Jameson, J.L., Jaffe, R.C., Gleason, S.L., Habener, J.F. (1986a). transcriptional regulation of chorionic gonadotropin alpha- and beta- subunit gene expression by 8-bromo-adenosine 3',5' monophosphate. *Endocrinology*, **119**, 2560-2567.

Jameson, J.L., Lindell, C.M., Habener, J.F. (1986b). Gonadotropin and thyrotropin alpha- and beta-subunit gene expression in normal and neoplastic tissues characterized using specific messenger ribonucleic acid hybridization probes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **64**, 319-327.

Jameson, J.L., Becker, C.B., Lindell, C.M., Habener, J.F. (1988). Human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.*, **2**, 806-815.

Jarvis, D.L., Finn, E.E. (1995). Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology*, **212**, 500-511.

Ji, I., Ji, T.H. (1995) Differential roles of exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15970-15973.

Ji, I., Murdoch, W.J., Ji, T.H. (1995). Activation of membrane receptors. *Endocrine*, **3**, 187-194.

Jia, X.C., Hsueh, A. (1986). Granulosa cell aromatase bioassay for follicle stimulating hormone: Validation and application of the method. *Endocrinology*, **119**, 1570-1577.

Jones, L.R., Benker, G., Salacinski, P.R. (1970). Large scale preparation of highly purified pyrogen free human growth hormone for clinical use. *J. Endocrinol.*, **82**, 77- 83.

Kay, T.W., Jameson, J.L. (1992). Identification of a gonadotropin-releasing hormone-responsive region in the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1767-1773.

Kelton, C.A., Cheng, S.V.Y., Nugent, N.P., Schweickhardt, R.L., Rosenthal, J.L., Overton, S.A., Wands, G.D., Kuzejka, J.B., Luchette, C.A., Chappel, S.C. (1992). The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO and Y-1 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **89**, 141-151.

Keri, R.A., Andersen, B., Kennedy, G.C., et al. (1991). Estradiol inhibits transcription of human glycoprotein hormone alpha subunit gene despite the absence of high affinity binding site for estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.*, **5**, 725-733.

Kim, D.S., Ahn, S.K., Yoon, J.H., Hong, S.H., Kim, K.E., Maurer, R.A., Park, S.D. (1994). Involvement of a cAMP-responsive DNA element in mediating TRH responsiveness of the human thyrotropin alpha-subunit gene. *Mol Endocrinol.*, **8**, 528-536.

Kim, K.E., Gordon, D.F., Maurer, R.A. (1988). Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone beta-subunit. *DNA*, **7**, 227-233.

Kojima, F.N., Cupp, A.S., Stumpf, T.T., Zalesky, D.D., Roberson, M.S., Werth, L.A., Wolfe, M.W., Kittok, R.J., Grotjan, H.E., Kinder, J.E. (1995). Effects of 17 $\beta$  estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, **52**, 297-304.

- Krummen, L.A., Woodruff, T.K., DeGuzman, G., Cox, E.T., Baly, D.L., Mann, E., Garg, S., Wong, W.L., Cossom, P., Mather, J.P. (1993). Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*, **132**, 431-443.
- Lambert, A., Talbot, J.A., Mitchell, R., Robertson, W.R. (1991). Inhibition of protein kinase C by staurosporine increases estrogen secretion by rat Sertoli cells. *Acta Endocrinol.*, **125**, 286-294.
- Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Cafield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., Isaacs, N.W. (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*, **369**, 455-461.
- Li, D., Kubo, T., Kim, H., Shimasaki, S., Erickson, G.F. (1998). Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin  $\alpha$ -subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, **58**, 219-225.
- Ling, N., DePaolo, L.V., Bicsak, T.A., Shimasaki, S. (1990). Novel ovarian regulatory peptides: inhibin, activin, and follistatin. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **33**, 690-702.
- Manjunath, P., Sairam, M.R. (1982). Biochemical biological and immunological properties of chemically deglycosylated human choriogonadotropin. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7109-7115.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, S., Esch, F., Ueno, N., Ying, S-Y, Guillemin, R., Niall, H., Seeburg, P.H. (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- $\beta$ . *Nature*, **318**, 659-663
- Matteri, R.L., Baldwin, D.M., Lasley, B.L., Papkoff, H. (1987). Biological and immunological properties of zebra pituitary gonadotropins: comparison with horse and donkey gonadotropins. *Biol. Reprod.*, **36**, 1134-1141.
- Matteri, R.L., Papkoff, H. (1988). Microheterogeneity of equine follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, **38**, 324-331.
- Matzuk, M.M., Boime, I. (1988a). The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the  $\alpha$  subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotropin. *J. Cell. Biol.*, **106**, 1049-1059.
- Matzuk, M.M., Boime, I. (1988b). Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.*, **263**, 17106-17111.
- Matzuk, M.M., Boime, I. (1989). Mutagenesis and gene transfer define site-specific roles of the gonadotropin oligosaccharides. *Biol. Reprod.*, **40**, 48-53.
- Mercer, J.E., Clements, J.A., Funder, J.W., Clarke, I.J. (1989). Regulation of follicle-stimulating hormone  $\beta$  and common  $\alpha$  subunit messenger ribonucleic acid by gonadotropin releasing hormone and estrogen in sheep pituitary. *Neuroendocrinology*, **47**, 563-566.
- Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M., Vale, W. (1988). Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A and beta B subunits in various tissues predicts diverse function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 247-251.
- Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Ibuki, Y., Igarashi, M. (1991). Cloning and sequencing of the human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 1125-1130.
- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autorregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell*, **75**, 875-886.

Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J., Ashwell, G. (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J. Biol. Chem.*, **246**, 1461-1467.

Mukherjee, A., Urban, J., Sassone-Corsi, P., Mayo, K.E. (1998). Gonadotropins regulate inducible cyclic adenosine 3',5'- monophosphate early repressor in the rat ovary: implications for inhibin  $\alpha$  subunit gene expression. *Mol. Endocrinol.*, **12**, 785-800.

Muyan, M., Ryzmkiewicz, D.M. and Boime, I. (1994). Secretion of lutropin and follitropin from transfected GH3 cells: Evidence for separate secretory pathways. *Mol. Endocrinol.*, **8**, 1789 -1797.

Nakamura, H., Nakao, K. (1993). Mechanism of regulation of TSH biosynthesis and secretion. *Nippon Rinsho*, **51**, 2611-2617.

Navickis, R.J., Jones, P.B., Hsueh, A.J. (1982). Modulation of prolactin receptors in cultured rat granulosa cells by FSH, LH and GnRH. *Mol Cell Endocrinol*, **27**, 77-88.

Naylor, S.L., Chin, W.W., Goodman, H.M., Lalley, P.A., Grzeschik, K.H., Sakaguchi, A.Y. (1983). Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genet*, **9**, 757-770.

Ny, T., Leonardson, G., Hsueh, A.J.W. (1988). Cloning and characterization of a cDNA for rat tissue type plasminogen activator. *DNA*, **7**, 671- 677 .

Oikawa, M., Dargan, C., Ny, T., Hsueh, A.J. (1990). Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology*. **127**, 2350-2356 .

Okamoto, T., Nishimoto, I (1992). Detection of G protein-activator regions in M4 subtype muscarinic, cholinergic and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors based upon characteristics of primary structure. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8342-8346.

Orly, J., Rei, Z., Greenberg, G.N.M., Richards, J.S. (1994). Tyrosine kinase inhibitor AG-18 arrest follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation: use of reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, **134**, 2336-2346.

Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstein, J., Kelch, R.P., Beitins, I.Z. (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoformas distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **67**, 465-473.

Padmanabhan, V., Kersey, K.A., Sairam, M.R., Cole, L.A., Ireland, J.J., Beitins, I.Z. (1993). A multiple end point bioassay to assess physiological relevance of FSH heterogeneity. Program of the 75<sup>th</sup> Annual Meeting of The Endocrine Society, Las Vegas, NV, Resumen 182.

Papandreou, M-J., Asteria, C., Petterson, K., Ronin, C., Beck-Peccoz, P. (1993). Concanavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **76**, 1008-1013.

Papavasiliou, S.S., Zmeili, S., Khoury, S., Landefeld, T.D., Chin, W.W., Marshall, J.C. (1986). Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **83**, 4026-4029

Parsons, T.F., Bloomfield, G.A., Pierce, J.G. (1983) Purification of an alternate form of the  $\alpha$  subunit of the glycoprotein hormones from bovine pituitaries and identification of its O-linked oligossacharide. *J.Biol. Chem.*, **258**, 240-244.

Parsons, T.F., and Pierce, J.G. (1984) Free  $\alpha$ -like material from bovine pituitaries: removal of its O-linked oligossacharide permits combination with lutropin- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, **259**, 2662-2666.

- Pennathur, S., Madison, L.D., Kay, T.W., Jameson, J.L. (1993). Localization of promoter sequences required for thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone responsiveness of the glycoprotein hormone alpha-gene in primary cultures of rat pituitary cells. *Mol Endocrinol*, **7**, 797-805
- Petraglia, F., Sawcheko, P., Lim, A.T., Rivier, J., Vale, W. (1987). Localization, secretion and action of inhibin in human placenta. *Science*, **237**, 187-189.
- Phillips, D.J., Albertsson-Wikland, K., Eriksson, K., Wide, L. (1997). Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **82**, 3103-3106.
- Pierce, J.G., Bahl, O.P., Cornell, J.S., Swaminathan, N. (1971). Biologically active hormones prepared by recombination of the alpha chain of human chorionic gonadotropin and the hormone-specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2321-2324.
- Pierce, J.G., Parsons, T.F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 465-495
- Rappaport, M.S., Smith, E.P. (1996). Insulin-like growth factor I inhibits aromatization induced by follicle-stimulating hormone in rat sertoli cell culture. *Biol Reprod*, **54**, 446-52
- Reichert, L.E. Jr., Dattatreymurty, B. (1989). The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: Interaction with FSH, mechanism signal transduction and properties of the purified receptor. *Biol. Reprod.*, **40**, 13-26.
- Reichert, L.E. Jr., Dattatreymurty, B., Grasso, P., Santa-Coloma, T.A. (1991). Structure-function relationships of the glycoprotein hormones and their receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **12**, 199-203.
- Rhea, M.A., Marshal, G.R., Weinbauer, C.F., Nieschlag, E. (1986). Testosterone maintains pituitary and serum FSH and spermatogenesis in GnRH antagonist suppressed rats. *J. Endocrinol.*, **108**, 101-107.
- Richards, J.S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev.*, **15**, 725-751.
- Rivier, C., Rivier, J., Vale, W. (1986). Inhibin mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science*, **234**, 645-648.
- Robertson, D.M., Foulds, L.M., Ellis, S. (1982). Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology*, **111**, 385-391.
- Ryan, R.J., Keutmann, H.T., Charlesworth, M.C., McCormick, D.J., Milius, R.P., Calvo, F.O., and Vutyavanich, T. (1987). Structure-function relationship of gonadotropins. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **43**, 383-429.
- Sairam, M.R. (1989) Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J.*, **3**, 1915-1926.
- Sairam, M.R., Bhargavi, G.N. (1985). A role for the glycosilation of the  $\alpha$  subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, **229**, 65-67.
- Sairam, M.R., Jiang, L.G., Yamey, T.A., Khan, H. (1996). Folliotropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of the receptor wich inhibits hormone action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 717-722.
- Sakai, H., Ishii, S. (1980). Isolation and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **42**, 1-8.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (eds) (1989). *Molecular cloning*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab Press.
- Sawcheko, P.E., Plotsky, P.M., Pfeoffer, S.W., Cunninham, E.T.C., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W. (1988) Inhibin beta neural pathways involved in the control of oxytocin secretion. *Nature*, **334**, 615-617.
- Schoderbek, W.E., Kim, K.E., Ridgway, E.C., Mellon, P.L., Maurer, R.A. (1992). Analysis of DNA sequences required for pituitary-specific expression of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene. *Mol. Endocrinol.*, **6**, 893-903.
- Schoderbek, W.E., Roberson, M.S., Maurer, R.A. (1993). Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene. *J Biol Chem*, **268**, 3903-3910.
- Shaw, G., Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, **46**, 659-667.
- Shimasaki, S., Koga, M., Buscaglia, M.L., Simmons, D.M., Bicsak, T.A., Ling, N. (1989). Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol. Endocrinol.*, **3**, 651-659.
- Shupnik, M.A., Gharib, S.D., Chin, W.W. (1989a). Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. *Mol. Endoc.*, **3**, 651-659.
- Shupnik, M.A., Weinmann, C.M., Notides, A.C., Chin, W.W. (1989b). An upstream region of the rat luteinizing-hormone beta gene binds estrogen receptor and confers estrogen responsiveness. *J.Biol. Chem.* **264**, 80-86.
- Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. *Endocr. Rev.*, **18**, 739-773.
- Simoni, N., Jockenhövel, F., Nieschlag, E. (1994). Polymorphism of human pituitary FSH: Analysis of immunoreactivity *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J. Endocrinol.* , **141**, 359-367.
- Smith, P.L., Baenzinger, J.U. (1988). A pituitary N-Acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones. *Science*, **242**, 930-933.
- Sprang, S.R. (1997) G proteins mechanism: insights from structural analysis. *Ann. Rev. Biochem.*, **66**, 639- 678.
- Sprengel, R., Braun, T., Nikolics, K., Segaloff, D.L., Seeburg, P.H. (1990). The testicular receptor for follicle-stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.*, **4**, 525-530.
- Stanton, P.G., Burgon, P.G., Hearn, M.T.W., Robertson, D.M. (1996). Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **125**, 133-141.
- Stanton, P.G., Robertson, D.M., Burgon, P.G., Schmauk-White, B., Hearn, M.T.W. (1992). Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*, **130**, 2820-2832.
- Steger, D.J., Buscher, M., Hecht, J.H., Mellon, P.L. (1993). Coordinate control of the alpha- and beta-subunit genes of human chorionic gonadotropin by trophoblast-specific element-binding protein. *Mol Endocrinol*, **7**, 1579-1588.

- Steinfelder, H.J., Wondisford, F.E. (1997). Thyrotropin (TSH) beta-subunit gene expression : an example for the complex regulation of pituitary hormone genes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **105**, 196-203.
- Stockell-Hartree, H.A., Renwick, G.C.A. (1992) Molecular structure of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem. J.*, **287**, 665-679.
- Stumpf, T.T., Roberson, M.S., Wolfe, M.W., Zalesky, D.D., Cupp, A.S., Werth, L.A., Kojima, W.N., Hejl, K., Kitokk, R.J., Grotjan, H.E., Kinder, J.E. (1992). A similar distribution of gonadotropin isohormones in maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biol. Reprod.*, **46**, 442-450.
- Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., Titani, K., Sugino, H. (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15579-15587.
- Tash, J.S., Welsh, M.J., Means, A.R. (1981). Regulation of protein kinase inhibitor by follicle-stimulating hormone in Sertoli cells *in vitro*. *Endocrinology*, **108**, 427-434.
- Takahashi, H., Hanaoka, Y. (1981). Isolation and characterization of multiple components of basic gonadotropin from bullfrog (*rana catesbeiana*) pituitary gland. *J. Biochem.*, **90**, 1333-1340.
- Tate, S., Suganuma, N., Furuhashi, M., Ando, T., Asada, Y., Kondo, I., Kikkawa, F., Tomoda, Y. (1996). Direct effects of estradiol and tamoxifen on gene expressions of inhibit alpha- and beta A-subunits in rat granulosa cells *in vitro*. *Endocr. J.*, **43**, 621-628.
- Tekmal, R.R., Burns, W.N., Rao, D.V., Montoya, I.A., Chang, P.L., Stoica, G., Schenken, R.S. (1996). Regulation of rat granulosa cell  $\alpha$ -inhibin expression by luteinizing hormone, estradiol and progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2**, 420-426.
- Timossi, C. M., Barrios de Tomasi, J., Zambrano, E., Gonzalez, R., Ulloa-Aguirre, A. (1998a) A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity *in vitro*. *Neuroendocrinology*, **67**, 153-163.
- Timossi C, Damián-Matsumura P., Dominguez-Gonzalez A., Ulloa-Aguirre A. (1998b). A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analog in phenobarbital-blocked proestrus rats. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 1032-1038.
- Tsafiri, A., Bicsak, T.A., Cajander, S.B., Ny, T., Hsueh, A.J. (1989). Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue-type plasminogen activator and alpha 2-antiplasmin. *Endocrinology*, **124**, 415-421.
- Tsang, B.K., Armstrong, D.T., Whitfield, J.F. (1980). Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells *in vitro*. *J. Clin. Endoc. Metab.*, **51**, 1407-1411.
- Tsatsoulis, A., Shalet, S.M., Robertson, W.R. (1991). Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol.*, **35**, 193-206.
- Turgeon, J.L., Waring, D.W. (1982). Differential changes in the rate and pattern of follicle-stimulating hormone secretion from pituitaries of cyclic rats superfused *in vitro*. *Endocrinology*, **111**, 66-81.
- Ulloa-Aguirre, A., Chappel, S.C. (1982) Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamster. *J. Endocrinol.*, **95**, 257-266.

Ulloa-Aguirre, A., Conn, P.M. (1998). G Protein coupled receptors and the G protein family. In: Conn, P.M. (ed.). *Handbook of Physiology-Endocrinology* Section 7, Cellular Endocrinology, Oxford University Press, New York. Pp: 81-124.

Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damian-Matzumura, 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.

Ulloa-Aguirre, A., Espinosa, R., Damian-Matzumura, P., Chappel, S.C. (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Reprod.*, **4**, 491-501.

Ulloa-Aguirre, A., Midgley, A.R., Beitins, I.Z., Padmanabhan, V. (1995a). Follicle stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endoc. Reviews* **16**, 765-787.

Ulloa-Aguirre, A., Miller, C., Hyland, L., Chappel, S.C. (1984). Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.*, **30**, 382-387.

Ulloa-Aguirre A., Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum. Reprod. Update*, **4**, 260-283.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C.M., Zambrano, E., Damian-Matzumura, P., Quintanar, A., Musi, N. y Dominguez-Gonzalez, A. (1997). Physicochemical and biological attributes of recombinant human follicle-stimulating hormone In: *New Horizons in Reproductive Medicine*, Mastroiani G, Cotufaris L (eds.), Parthenon Publishing Group, England, pp 153-163.

Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C.M., Olivares, A., Quintanar, A., Aguilnaga, M., Diaz-Cueto, L., Mendez, J.P. (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 commercial preparations of urofollitropin. *Arch. Med. Res.*, **26**, S221-S223.

Vaitukaitis, J.L., Ross, G.T. (1971) Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **33**, 308-311.

Valove, F.M., Finch, C., Anastli, J.N., Froehlich, J., Flack, M.R. (1994). Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, **135**, 2657-2661.

Van Damme MP, Robertson DM, Marana R, et al. (1979). A sensitive and specific *in vitro* bioassay method for the measurement of follicle stimulating hormone. *Acta Endocrinol*, **91**, 224- 234.

Villanueva, L.A., Mendez, I., Ampuero, S., Larrea, F. (1996). The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone induced aromatase activity in cultures rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 725-731.

Watkins, P.C., Eddy, R., Beck, A.K., et al. (1987) DNA sequence and regional assignment of the human FSH gene to the short arm of the chromosome 11. *DNA*, **6**, 205-212.

Weiss, J., Guendner, M.J., Halvorson, L.M., Jameson, J.L. (1995). Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology*, **136**, 1885-1891.

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.

Wide, L. (1989). Follicle-stimulating hormones in the anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J. Endocrinol.*, **123**, 519-529.



- Wide, L., 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.
- Wide, L., Hobson, B.M. (1993). Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in the pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 371-375.
- Wide, L., Naessen, T. (1994).  $17\beta$  estradiol counteracts the formation of the more acididc isoforms of the follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin. Endocr. (Oxf)*, **40**, 783-789.
- Wide, L., Naessen, T., Phillips, D.J. (1995). Effect of chronic oral administration of  $17\beta$  estradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotropins in post-menopausal women. *Clin. Endocr. (Oxf)*, **42**, 59-64.
- Wierman, M.E., Gharib, S.D., Rovere, J.M.V., Badger, T.M., Chin, W.W. (1989). Selective failure of androgens to regulate follicle-stimulating hormone  $\beta$  mRNA levels in male rat. *Mol. Endocrinol.*, **2**, 492-498.
- Wierman, M.E., Wang, C. (1990). Androgen selectively stimulates FSH beta mRNA levels after GnRH antagonist administration. *Biol. Reprod.* **42**, 563-571.
- Winters, S.J., Janick, J.J., Loriaux, D.L., Sherins, R.J. (1979). Studies on the role of sex steroids in the feedback control of gonadotropin concentrations in men. II. Use of estrogen antagonist, clomiphene citrate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**, 222-227.
- Winters, S.J., Ishizaka, K., Kithahara, S., Troen, P., Attardi, B. (1992). Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, **130**, 726-734.
- Winters, S.J., Troen, P. (1985). Evidence for the role of endogenous estrogen in hypothalamic control of gonadotropin secretion in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 842-845.
- Wong, S-F., Parker, E.M., Ross, E.M. (1990). Chimeric muscarinic cholinergic:  $\alpha$ -adrenergic receptors that activate Gs in response to muscarinic agonists. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6219-6224.
- Yang, W.H., Papkoff, H. (1973). Effect of desialylation of ovulation-inducing activity of ovine interstitial cell-stimulating hormone, ovine follicle-stimulating hormone, pregnant mare's serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin in the hamster. *Fertil. Steril.*, **24**, 633-639.
- Ying, S-Y. (1988). Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating secretion of FSH. *Endoc. Reviews*, **9**, 267-293.
- Yoshimura, Y., Nagamatsu, S., Ando, M., Iwashita, M., Oda, T., Katsumata, Y., Shiokawa, S., Nakamura, Y. (1996). Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits gonadotropin-induced ovulation, oocyte maturation and steroidogenesis in rabbit ovary. *Endocrinology*, **137**, 438-436.
- Zaidi, A.A., Robertson, D.M., Diczfalussy, E. (1981). Studies on the biological and immunological properties of human follitropin: profile of two international reference preparations and of an aqueous extract of pituitary glands after electrofocusing. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **97**, 157-165.
- Zaidi, A.A., Froysa, B., Diczfalussy, E. (1982). Biological and immunological properties of different molecular species of human follicle-stimulating hormone: electrofocusing profiles of eight highly purified preparations. *J. Endocrinol.*, **92**, 195-204.
- Zambrano, E., Olivares, A., Mendez, J.P., Guerrero, L., Díaz Cueto, L., Veldhuis, J.D., 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. Endoc. Metab.*, **80**, 1647-1656 .

Zambrano, E., Barrios de Tomasi, J., Cardenas, M., 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.*, **2**, 563-571.

Carlos M. Timossi<sup>a</sup>  
Jorgelina Barrios de Tomasi<sup>b</sup>  
Elena Zambrano<sup>b</sup>  
Roberto González<sup>c</sup>  
Alfredo Ulloa-Aguirre<sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, and

<sup>b</sup> Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F., México;

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana, Cuba;

<sup>d</sup> The Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oreg., USA

## A Naturally Occurring Basically Charged Human Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Variant Inhibits FSH-Induced Androgen Aromatization and Tissue-Type Plasminogen Activator Enzyme Activity *in vitro*

### Key Words

Gonadotropins  
Gonadotropin antagonists  
Plasminogen activator  
Aromatization

### Abstract

It is well known that deglycosylation of gonadotropins by enzymatic or chemical procedures or by deletion of sites for N-linked glycosylation produces antagonistic analogs which are able to interact strongly with the receptor and to inhibit binding of the wild-type hormone. In the present study, we analyzed the antagonistic properties of a naturally occurring basic follicle-stimulating hormone (FSH) charge isoform obtained after high-resolution chromatofocusing of human anterior pituitary glycoprotein extracts. Coincubation of increasing amounts of this isoform with a highly purified human pituitary FSH preparation or with recombinant human FSH at doses equivalent to their corresponding ED<sub>50</sub> for estradiol and tissue-type plasminogen activator (tPA) production, inhibited FSH-induced estrogen production and tPA enzyme activity by cultured rat granulosa cells in a dose-dependent manner. These inhibitory effects were apparently exerted at steps following 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) formation and did not involve activation of the protein kinase C pathway since: (a) at low doses, this basic FSH isoform moderately increased FSH-induced cAMP production by cultured rat granulosa cells; (b) coincubation of the antagonist isoform with dibutyl cAMP completely inhibited the effects of this cAMP analog on estrogen and tPA production; (c) the isoform was able to stimulate production of cAMP in a human fetal cell line expressing the recombinant human FSH receptor, and (d) the inhibitory effects of the isoform were not affected by staurosporine, a protein kinase C inhibitor. The effects of this isoform upon dibutyl cAMP-induced estrogen and tPA production were blocked by the addition of a highly specific antibody directed against human FSH, further demonstrating that the antagonistic effects observed were due to FSH-like molecules. In contrast to the inhibitory effects exhibited by this basic FSH isoform, a more acidic FSH charge variant consistently acted as an agonist of pituitary and recombinant FSH on both estrogen production and induction of tPA enzyme activity. These results indicate that the anterior pituitary gland normally produces FSH isoforms which act as either agonists or antagonists of FSH at the target cell level.

### Introduction

Follicle-stimulating hormone (FSH) is produced and secreted in multiple molecular forms by the anterior pituitary gland [1]. The number and relative abundance of

each isoform depend on the source of the sample and the physiological status of the donor at the time of tissue or sample collection [1-5]. Since FSH isoforms have been separated principally on the basis of electrical charge, it is thought that they differ from each other in their posttrans-

### KARGER

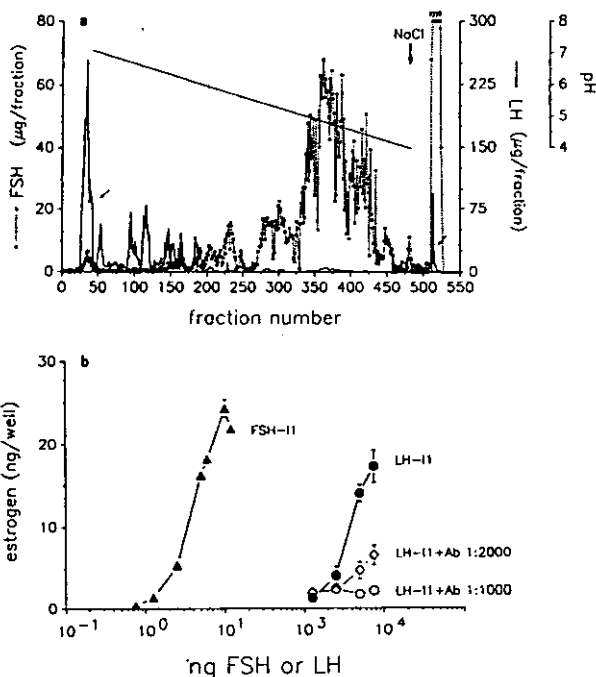
Fax + 41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 1998 S. Karger AG, Basel  
0028-3835/98/0673-0153\$15.00/0

This article is also accessible online at:  
<http://BioMedNet.com/karger>

Alfredo Ulloa-Aguirre  
Department of Reproductive Biology  
Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Vaseo de Quiroga No. 15  
Tlalpen 14000, México D.F. (Mexico)  
Tel. +525 573 1160, Fax +525 655 9859, E-Mail [aulloa@buzon.main.conacyt.mx](mailto:aulloa@buzon.main.conacyt.mx)

**Fig. 1. a** The pattern of pH distribution of intrapituitary FSH and LH after chromatofocusing of an anterior pituitary glycoprotein extract. The bold arrow indicates the addition of 1 M NaCl to the chromatofocusing columns. Fractions containing the highest concentrations of immunoreactive FSH recovered outside the limits of the pH window (FSH1 and FSH-5; first and last FSH peaks, respectively) were further submitted to immunoaffinity chromatography to remove LH (arrows). FSH and LH concentrations are expressed in terms of the LER-907 standard. **b** Changes in concentrations of E secreted into the culture medium of granulosa cells. Rat granulosa cells were cultured for 48 h in the presence of increasing concentrations of highly purified pituitary FSH (FSH-11;  $\blacktriangle$ ) or LH (LH-11;  $\bullet$ ). Cells exposed to LH were also incubated in the presence of antiLH at 1:2,000 ( $\circ$ ) or 1:1,000 ( $\square$ ) dilutions.



lationally modified carbohydrate composition, mainly sialic acid content [4, 6]. The different FSH glycoforms differ in their ability to bind to target cell receptors, survive in the circulation and induce a biological response in vivo and in vitro [1, 7]. More acidic FSH isoforms (i.e. those possessing greater sialic acid content) have longer plasma half-lives but lower receptor-binding/immunoactivity relationships than their less acidic/sialylated counterparts [7].

Utilizing high-resolution chromatofocusing (CF) as the separation technique, we recently characterized some of the biological features exhibited by the multiple FSH variants present in unpurified human anterior pituitary glycoprotein extracts [8]. Employing two different in vitro assay systems (rat granulosa cells in culture and human embryonic kidney cells expressing the recombinant human FSH receptor), we found that isoforms with elution

pH values 6.60–4.60 were more biologically potent in vitro than isoforms with pH values <4.5, whereas the more basic variant (pH >7.10) exhibited different responses depending on the assay system employed. In the rat assay, the in vitro biopotency of this isoform was intermediate between those of the less and more acidic analogs whereas in the human assay it exhibited the highest in vitro biopotency [8]. The present study was conducted to further characterize the biological properties of this particular isoform which has been detected in abnormally high concentrations in some hypogonadal women [9, 10] and whose relative abundance in the circulation changes throughout the normal menstrual cycle [3, 11]. Since this isoform coelutes with extremely high quantities of luteinizing hormone (LH) in the CF procedure employed to fractionate the different FSH isoforms (fig. 1a), LH was removed by affinity chromatography and the in vitro bio-

logical activity of the partially purified FSH variant was then retested employing rat granulosa cells in culture. The results showed that this basic naturally occurring FSH variant was unable to induce either estrogen (E) production or tissue-type plasminogen activator (tPA) enzyme activity but rather exhibited unique and previously unreported effects behaving as an antagonist of FSH action in this particular *in vitro* system.

## Materials and Methods

### Reagents

Polybuffer exchange resin (PBE-94), Polybuffer 74, Sephadex G-25, Sepharose 4B and concanavalin A-Sepharose 4B were purchased from Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J. McCoy's 5A (modified culture medium) (without serum), *L*-glutamine, penicillin and streptomycin sulfate were from Gibco BRL (Gaithersburg, Md., USA). Diethylstilbestrol, 1-methyl-3-isobutyl-xanthine (MIX), 4-androstene-3,17 dione (androstenedione), 2-O-monosuccinyl cAMP tyrosylmethyl ester, N<sup>6</sup>,2'-O-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (DBcAMP), staurosporine, purified recombinant tPA and urokinase-type plasminogen activator were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA). All electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Hercules Calif., USA). Human plasminogen was obtained from American Diagnostics (New York, N.Y.). Highly purified (iodination grade) human pituitary LH-11, antihuman LH-2, all human FSH radioimmunoassay (RIA) reagents and standards and the CV-27 cAMP antiserum were kindly provided by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK, Bethesda, Md., USA); recombinant human FSH (recFSH) expressed in Chinese hamster ovary cells (Org32489) was graciously provided by Organon International BV (Oss, The Netherlands). The antisera to estradiol-17 $\beta$  and to human LH (monoclonal anti-LH-BG7) were generously provided by the Cuba-Mexico World Health Organization RIA Reagents Program (Mexico).

### 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 postmortem and were kept at 8°C with in 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. [12]. 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 at which the work was conducted.

### Chromatofocusing of Pituitary Glycoprotein Extracts

Chromatofocusing of FSH contained in two different batches of pituitary glycoprotein extracts was performed according to a previously described procedure [8]. Briefly, to increase the resolution of the chromatofocusing separation, columns of PBE-94 with larger dimensions (90 × 1.5 cm) than those previously used [7] were constructed and equilibrated with 15 bed volumes 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 been previously equilibrated with the eluent buffer

(1:8 dilution of Polybuffer-74 in deionized water, pH 4.0) by chromatography in Sephadex G-25 was added 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 changed to a solution of 1 M NaCl to recover those proteins bound at the lower limiting pH (salt peak). Each fraction was divided in several aliquots which were stored frozen at -20°C until measurement of FSH content by RIA. Recoveries of FSH by this method were 79 ± 4% of the total amount applied to the column.

After RIA determination of the amount of FSH and LH contained in 5–15  $\mu$ l aliquots of each fraction collected from three chromatofocusing separations, fractions containing the greatest concentration of immunoreactive FSH recovered at each end of the pH window (elution pH values >7.10 and <3.8; first and last peaks of FSH immunoactivity shown in fig. 1a) were separately pooled, transferred to dialysis membrane tubings (molecular weight cutoff 12,000), dialyzed at 4°C for 24 h against deionized water and thereafter against 0.01 M ammonium carbonate (pH 7.5) and freeze-dried. Powders containing the basic and the acidic FSH isoforms (coded as FSHi and FSH-5, respectively) were then redissolved in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 7.4, and transferred to 1 × 10 cm columns of monoclonal antiLH-IgG (antiLH-BG7) immobilized in Sepharose 4B to remove the LH that coeluted with these isoforms during the CF separation (fig. 1a); this procedure removed >90% of immunoactive LH present in each original concentrate. Eluates containing the highest FSH concentrations free of immunoactive LH were pooled, dialyzed as described above, lyophilized, redissolved in McCoy's 5A modified (serum-free) medium and kept frozen at -70°C until used.

### Cell Cultures

**Rat Granulosa Cell Culture.** Granulosa cells were collected by follicular puncture of ovaries from 21-day-old Wistar rats implanted for 4 days with diethylstilbestrol-containing silastic capsules and cultured in 16-mm 24-well plates at a density of 5–7.5 × 10<sup>4</sup> viable cells in 0.5 ml of McCoy's 5a medium supplemented with 2 mM *L*-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate. After a 24-hour incubation period in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, the cells were washed twice with unsupplemented McCoy's medium and then incubated during 48 additional hours in the presence or absence of the various human FSH preparations (FSHi or recFSH and FSHi or FSH-5) or other treatments added to 500  $\mu$ l fresh McCoy's medium containing *L*-glutamine, antibiotics, 0.125 mM MIX and 10<sup>-6</sup> M androstenedione (aromatization substrate). At the end of the treatment period, media were collected and either stored frozen until quantitation of E and/or cAMP or dried by vacuum centrifugation and immediately processed for tPA enzyme activity determination.

**Human Fetal Cells Expressing the FSH Receptor.** The human embryonic kidney-derived (HEK) 293-cell line transfected with the human FSH receptor cDNA was a generous gift of Dr. Aaron J.W. Hsueh, Stanford University (Stanford, Calif.). The origin, handling, ligand specificity and biochemical properties of the recombinant human FSH receptor expressed by this cell line have been described elsewhere [13]. Transfected HEK cells (2 × 10<sup>5</sup> cells/culture dish) were exposed to increasing doses of FSHi or FSH-5 isoform concentrates in the presence of 0.125 mM MIX for 24 h at 37°C. After incubation, total (intra- and extracellular) cAMP levels were determined by RIA.

### Radioimmunoassays

Highly purified human pituitary FSH (human FSH-11, NIDDK) was iodinated by the lactoperoxidase-glucose oxidase method [14]. Following separation of protein-bound and free  $^{125}\text{I}$  by Sephadex G-100 column chromatography,  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH was further purified by concanavalin A chromatography as described by Dufau et al. [15]; the specific activity of  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH was 75–85  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  protein. The FSH RIA was performed using reagents provided by the NIDDK; the reference preparation LER-907 was employed to construct the standard curve. This standard exhibits a degree of charge heterogeneity similar to crude pituitary extracts as disclosed by chromatofocusing [16] and has an immunological potency of  $\sim 0.03$  the potency exhibited by the purified FSH-13 preparation. 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 LH and undetectable reactivity with free  $\alpha$ -subunit. Concentrations of FSH-11, recFSH, FSHi and FSH-5 are expressed in terms of the FSH-11 standard unless specified. The LH RIA was performed employing [ $^{125}\text{I}$ ]-labelled LH-11 as the tracer (specific activity, 70–90  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  protein), the LER-907 reference preparation as standard and the antihuman LH-2 as antiserum. For both assays the inter- and intra-assay coefficients of variation were  $<13$  and  $<8\%$ , respectively.

The amount of E produced *in vitro* by the rat granulosa cells was determined by RIA using an antiserum against estradiol-17 $\beta$  [8]. Because of the significant cross-reactivity of this antiserum with estrone ( $\sim 22\%$ ), results are expressed as total E produced by the granulosa cells in culture. The sensitivity of the assay was 6.3 pg/tube. The RIA of cAMP was performed employing 2-O-mono succinyl cAMP tyrosylmethyl ester iodinated by the chloramine T method as the labeling ligand and the CV-27 cAMP antiserum at a final dilution of 1:150,000. After incubation at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h, antibody-bound and free cAMP were separated by ethanolic precipitation followed by centrifugation at 1,200 g at  $4^\circ\text{C}$ . The sensitivity of the assay was 4 fmol/tube. All samples from a single experiment were analyzed for estradiol and/or cAMP content in the same batch. For both assays the intra-assay coefficient of variation was  $<6\%$ .

### Receptor Binding Assay

The receptor binding assay for FSHi and FSH-5 was performed using rat granulosa cells collected from diethylstilbestrol-primed 21-day-old Wistar rats as described above. Cells were washed twice with unsupplemented McCoy's medium, redissolved in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM sucrose and 0.1% bovine serum albumin (binding buffer) and incubated at a density of  $2 \times 10^4$  per tube for 18 h at room temperature in the presence of 15,000 cpm  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH (specific activity  $\sim 35 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  protein) and increasing amounts of FSHi, FSH-5 or highly purified human FSH-I-SIAFP-1 (NIDDK). At the end of the incubation period, 2 ml ice-cold binding buffer were added to each tube and bound and free ligand was separated by centrifugation at 2,200 g for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Radioactivity in the cell pellets was measured in a  $\gamma$ -counter (Packard Crystal Plus). Nonspecific binding was assessed by adding a 1,000-fold excess of highly purified urinary FSH (Fertinorm HP, Serono de México S.A.). Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH to granulosa cells was 14% of the total radioactivity added.

### Detection of tPA Enzyme Activity

Detection of tPA enzyme activity was assessed by zymography using the method of Granelly-Piperno and Reich [17] as modified by

Heussen and Dowdle [18]. Briefly, all vacuum-dried samples were individually redissolved in the same volume of  $1 \times$  Laemmli sample buffer and electrophoresed in 12% sodium dodecylsulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) slab mini gels at  $4^\circ\text{C}$  for 1.5 h. Each SDS-PAGE involved two gels, the first contained 0.1% gelatin to detect non plasminogen-dependent proteases and the second contained both gelatin and purified human plasminogen to detect plasminogen-dependent proteases. Purified recombinant tPA ( $M_r \sim 70,000$ ) and urokinase-type plasminogen activator ( $M_r \sim 50,000$ ) were also applied to each gel. After electrophoresis, gels were treated for 1 h with 2.5% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, at room temperature, washed 3 times for 1 h with the same Tris-HCl solution, and then incubated for 16 h at  $37^\circ\text{C}$ , fixed, stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 and photographed.

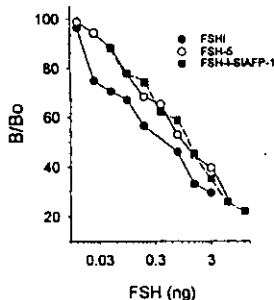
### Statistical Analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to determine differences between groups. When differences existed, *t* tests were used to determine which means were different. Probabilities of  $<0.05$  were considered statistically significant.

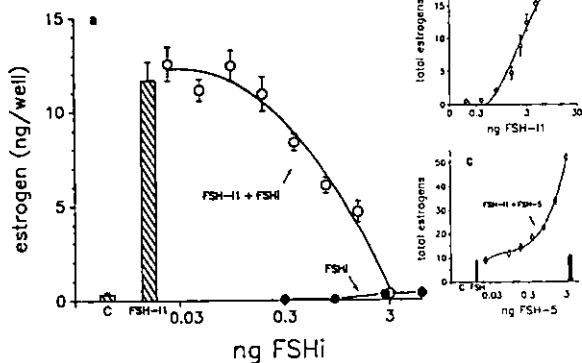
## Results

Separation of pituitary glycoprotein extracts through high-resolution chromatofocusing columns disclosed the presence of many ( $\sim 20$ ) distinct peaks of FSH immunoreactivity with pH values ranging from  $>7.10$  to  $<3.80$  (fig. 1a). Fractions comprising the first FSH peak (FSHi), which appeared in eluates containing those proteins that flew to the column unrestricted (pH value  $>7.10$ ), were processed as described in 'Material and Methods' and tested for *in vitro* bioactivity. FSH-5, a highly acidic isoform detected within the salt peak (pH  $<3.8$ ), which behaves as a potent FSH agonist in the rat granulosa cell system [8], was processed in the same manner as FSHi and included in all experiments as a positive control (agonist of FSH activity). As shown in figure 2, both FSH isoforms displaced  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH from the granulosa cells in a dose-dependent manner and in a similar fashion than the highly purified human FSH-I-SIAFP-1 standard.

Incubation of rat granulosa cells in culture with increasing doses of FSHi failed to induce significant E production; similar results were found when induction of tPA enzyme activity was measured as end point (not shown). These findings strongly suggested that the increase in androgen aromatization previously detected with this isoform [8] was probably triggered by the extremely high amounts of LH present in the original sample. In fact, highly purified LH was able to induce significant E production when added in high concentrations to cultured granulosa cells, an effect which was efficiently blocked by adding the antihuman LH-2 antibody (fig. 1b) but not



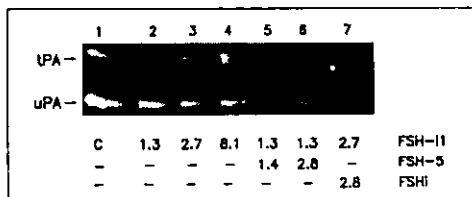
**Fig. 2.** Competitive displacement curves of  $^{125}\text{I}$ -labelled FSH by FSHi, FSH-5 and FSH-I-SIAFP-1 in the receptor binding assay. The dose is expressed in terms of human FSH-13 as measured by RIA. Data points are the mean of triplicate incubations. Similar results were found in two additional assays.



**Fig. 3.** Changes in concentrations of E released into the culture medium of granulosa cells cultured in the presence of FSHi, FSH-5, FSH-11 and FSH-11 plus FSHi and FSH-11 plus FSH-5. **a** Cultured rat granulosa cells were incubated during 48 h with human FSH-11 (2.7 ng/well; shaded bar) in the absence or presence of increasing concentrations of FSHi (O) and the amount of estradiol accumulated in the culture media was quantitated by RIA. Closed circles: the ability of FSHi to induce E production. **b** Changes in concentrations of E released into the culture medium of granulosa cells incubated in the presence of increasing amounts of FSH-11. **c** The effect of FSH-5 alone (solid bar) and FSH-11 alone (2.7 ng/well; shaded bar) or coincubated with increasing doses of FSH-5 (O) on total E production. Data points are the mean  $\pm$  SD of triplicate incubations. Similar results were found in two additional experiments; C = control incubations in the absence of hormones. To convert to nmol/l, multiply by 7.34.

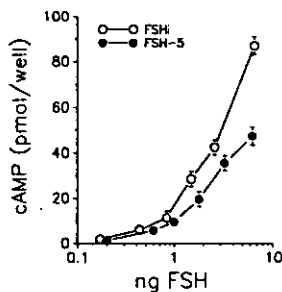
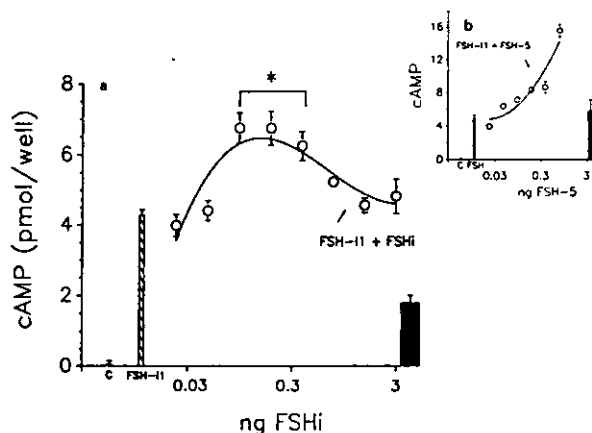
antihuman FSH-6 (not shown). In contrast, when graded amounts of FSHi were coincubated with the  $\text{ED}_{50}$  of either FSH-11 or recFSH it behaved as an antagonist, inhibiting the FSH-mediated E production in a dose-dependent manner (fig. 3a). Similar effects were observed when the induction of tPA enzyme activity was measured as the biological endpoint (fig. 4). In contrast to FSHi, the FSH-5 variant behaved as an agonist when added either alone (fig. 3c for E production; not shown for tPA enzyme activity) or in the presence of the  $\text{ED}_{50}$  of highly purified FSH (fig. 3c, 4); the agonist activity of this more acidic isoform was, however, more apparent for estradiol production than for induction of tPA enzyme activity.

The effects of FSHi on cAMP accumulation are shown in figure 5a. In the presence of the  $\text{ED}_{50}$  of FSH-11, FSHi induced a bell-shaped dose response curve; low doses (0.09–0.36 ng) of this isoform significantly increased the effects of FSH-11 on cAMP production by cultured granulosa cells whereas at high doses (1.4–2.8 ng) the isoform had no effect on cAMP accumulation induced by the pitu-



**Fig. 4.** Detection of tPA enzyme activity in conditioned media from granulosa cells exposed to different FSH preparations. Cultured rat granulosa cells were stimulated during 48 h with FSHi or FSH-5 alone (results not shown in the figure) or with FSH-11 in the absence (lanes 2–4) or presence of FSH-5 (lanes 5 and 6) or FSHi (lane 7) at the doses (in ng/well) shown below the representative zymograph. Aliquots of media were then electrophoresed in SDS-PAGE containing gelatin and plasminogen as described in the text. The location of tPA ( $M_r$  ~ 70,000) and high molecular weight ( $M_r$  ~ 50,000) urokinase-type plasminogen activator (uPA) activities are noted. No proteolytic activity with  $M_r$  ~ 70,000 or  $M_r$  ~ 50,000 was detected when plasminogen was omitted from the polyacrylamide gels (not shown). The results are representative of three separate experiments.

**Fig. 5.** The effects of FSH-11, FSHi and FSH-5 on cAMP production by cultured granulosa cells. Cultured granulosa cells were stimulated for 48 h with FSH-11 in the absence (shaded bars) or presence of increasing amounts of FSHi or FSH-5. At the end of the incubation period, cAMP and E accumulation were quantitated by RIA. **a** The effect of FSHi (solid bar) and FSH-11 (2.7 ng/well) plus increasing amounts of FSHi (O) on cAMP accumulation. **b** cAMP accumulation after cell exposure to FSH-5 (solid bar) or FSH-11 plus graded doses of FSH-5 (O). \*  $p < 0.01$  vs. the lower and higher FSHi doses and vs. FSH-11 alone; C = control incubations in the absence of hormones. Similar results were found in two additional experiments.



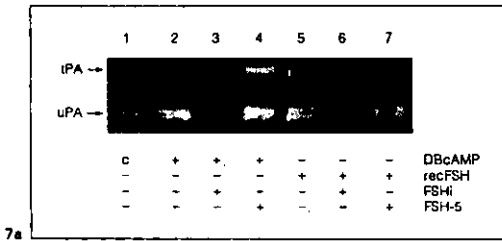
**Fig. 6.** The effects of increasing doses of FSHi and FSH-5 on cAMP production by HEK cells.  $2 \times 10^5$  HEK cells transfected with the cDNA for the human FSH receptor were stimulated during 24 h with different doses of FSHi or FSH-5. At the end of the incubation period aliquots of media were analyzed for cAMP content by RIA.

itary standard (FSH-11). On the contrary, the effects of FSH-5 alone or in the presence of FSH-11 on cAMP accumulation were similar to those elicited on total E production (fig. 5b). To confirm the capability of FSHi to induce cAMP accumulation, HEK cells expressing an homogeneous population of the human FSH receptor were incubated with increasing doses of FSHi. As figure 6 shows,

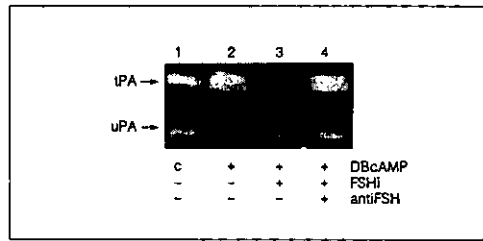
FSHi induced cAMP formation by HEK cells in a dose-dependent manner; further, as previously reported [8], the potency of this isoform to stimulate the human FSH receptor was higher than that exhibited by its most acidic counterpart (FSH-5). These results strongly suggested that FSHi counteracted the effects of purified FSH at steps following cAMP formation. To corroborate this possibility, we analyzed the effects of FSHi on DBCAMP-induced E production and tPA enzyme activity. As figure 7b shows, FSHi inhibited DBCAMP-induced E production; meanwhile, the effects of the cAMP analog were potentiated by FSH-5. Similar results were found when tPA enzyme activity was analyzed as the end point (fig. 7a).

To rule out the possibility that the inhibitory effects exhibited by FSHi were actually produced by a nonspecific contaminant or factor present in the sample, cultured granulosa cells were incubated with DBCAMP plus FSHi in the presence or absence of antihuman FSH-6 (at a titer sufficient to completely block androgen aromatization induced by recFSH) and the effects of the FSHi-containing sample on DBCAMP-induced E production and tPA enzyme activity were then analyzed. Addition of the FSH antibody to the incubation medium had no effect on tPA enzyme activity or E accumulation; however, when added together with FSHi and DBCAMP it blocked by 60 and 80% the inhibitory effects of FSHi on second messenger-induced E and tPA enzyme activity, respectively (fig. 8).

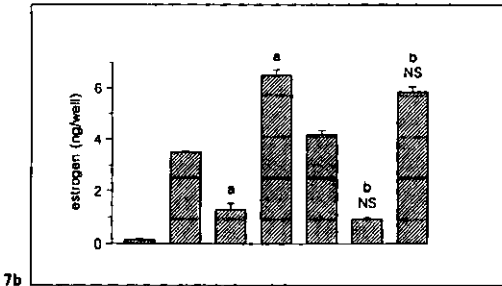




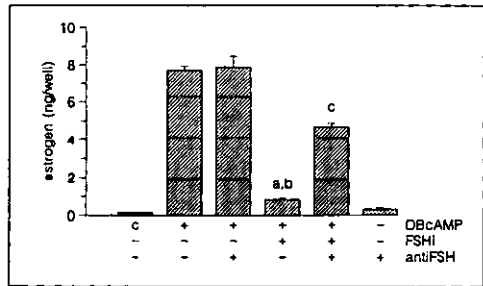
7a



8a



7b



8b

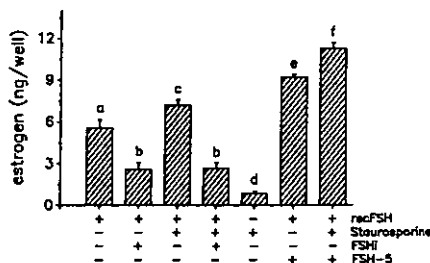
**Fig. 7.** Detection of tPA enzyme activity and total estrogens in conditioned media from granulosa cells exposed to recFSH and dibutylcAMP (DBcAMP) in the presence or absence of FSHi or FSH-5. Cultured rat granulosa cells were stimulated during 48 h with FSHi or FSH-5 alone (results not shown in the figure) or with recFSH (5.3 ng/well for tPA detection and 2.7 ng/well for E production) or 0.5 mM DBcAMP in the absence or presence of FSHi (2.8 ng for tPA detection and 2.1 ng for E production) or FSH-5 (1.4 ng). Aliquots of media were processed for quantitation of E by RIA or electrophoresed in SDS-PAGE containing gelatin and plasminogen as described in the text. The location of tPA ( $M_r$  ~ 70,000) and high molecular weight ( $M_r$  ~ 50,000) urokinase-type plasminogen activator (uPA) activities are noted. **a** Representative zymograph showing the effect of DBcAMP and recFSH in the absence (lanes 2 and 5) or presence of FSHi (lanes 3 and 6) or FSH-5 (lanes 4 and 7). **b** E accumulation in the same experiment shown above; C (lane 1) = control incubation with no hormones or DBcAMP added. The results are representative of three separate experiments. \*  $p < 0.01$  vs. DBcAMP; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  vs.

recFSH in the absence of FSHi or FSH-5. NS: recFSH plus FSHi vs. DBcAMP plus FSHi and recFSH plus FSH-5 vs. DBcAMP plus FSH-5. The results are representative of 3 separate experiments.

**Fig. 8.** Immunoneutralization of the inhibitory effects of FSHi on dibutylcAMP (DBcAMP)-induced tPA enzyme activity and E production by granulosa cells. Cultured cells were stimulated with 0.5 mM DBcAMP for 48 h in the absence or presence of 2.8 ng/well FSHi with or without the addition of an antibody against human FSH at a 1:10,000 dilution. **a** Representative zymograph showing the effects of antiFSH on the FSHi-dependent inhibition of tPA enzyme activity induced by DBcAMP. **b** The effects of antiFSH on DBcAMP-induced androgen aromatization and FSHi-mediated inhibition of E production. \*  $p < 0.01$  vs. DBcAMP alone and DBcAMP plus antiFSH; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. control; <sup>c</sup>  $p < 0.01$  vs. all other groups; C = control incubations in the absence of hormones, DBcAMP or antiFSH. The results are representative of 3 separate experiments.

Since activation of the protein kinase C (PKC) pathway may block some FSH-mediated actions in both granulosa [19–21] and Sertoli [22] cells, we investigated whether the antagonistic effects of FSHi on FSH-induced E production were related to selective activation of the PKC pathway. To study this possible relationship, granulosa cells were incubated with recFSH plus FSHi in the presence or absence of staurosporine, a very effective

PKC inhibitor [23]. As previously reported [24], staurosporine induced a slight but significant increase in both basal and FSH-stimulated granulosa cell aromatization (fig. 9). The presence of this PKC inhibitor, however, did not alter the inhibitory effect of FSHi upon recFSH-induced E production.



**Fig. 9.** The effects of the PKC inhibitor staurosporine on E production by rat granulosa cells. Cultured cells were stimulated for 48 h with FSHi or FSH-5 alone, or with 2.7 ng/well recFSH in the absence or presence of 0.5 nM staurosporine, 1.4 ng/well FSHi or 1.4 ng/well FSH-5. At the end of the incubation period, media were removed and analyzed for E content by RIA. Values (mean  $\pm$  SD) for control incubations were  $0.4 \pm 0.03$  ng/well (absence of hormones or staurosporine),  $0.50 \pm 0.02$  ng/well (FSHi alone) and  $4.7 \pm 0.2$  ng/well (FSH-5). Different letters above each bar indicate the existence of significant ( $p < 0.05$ ) differences between groups.

## Discussion

The sugar residues of heterodimeric glycoprotein hormones are important for the expression of full biological activity [1, 25–27]. Extensive removal of the carbohydrate moieties from FSH, LH and hCG causes complete loss of biological activity without a significant loss in their ability to bind their corresponding receptor [25, 28–30]. Further, deglycosylation of these gonadotropin hormones either by enzymatic [28] or chemical [25, 30, 31] procedures or by deletion of sites for N-linked glycosylation [32, 33], produces antagonist hormones which are able to interact strongly with the receptor and that inhibit both the binding of the wild-type hormone and the generation of second messenger in a dose-dependent manner.

In the present study we analyzed the effects of a naturally occurring FSH-like molecule, which binds to the FSH receptor and possesses presumptively a low sialic acid content as indicated by its elution pH profile during the chromatofocusing separation [6]. Although this isoform was identified in those fractions that flew from the column unrestricted and thus its exact pH value could not be determined, previous studies performed on a similar less acidic isoform also exhibiting FSH antagonist properties but recovered from the serum of GnRH antagonist-

treated hypogonadal women, have revealed that this particular FSH charge isoform may in fact be composed by at least 3 components with more basic elution pH values (9.6–9.4) [9]. Furthermore, recent lectin-binding studies have indicated that this FSH isoform bears more high mannose- and hybrid-type oligosaccharides thus indicating that, unlike other FSH antagonist isoforms [30, 33], it is not a completely deglycosylated isoform but rather an underglycosylated variant [34].

As previously reported for deglycosylated FSH analogs [30, 33], this FSH inhibitor behaved as antagonist of FSH action in cultured granulosa cells isolated from estrogen-primed immature rats. This previously undetected feature was unmasked only after LH removal, thus indicating that the agonistic activity previously reported [7, 8] was in fact due to the extremely high amounts of LH that coeluted with it during the chromatofocusing procedure [35]. Further, the blocking effects of FSHi were not due to contamination with factor(s) which may potentially interfere with some FSH-mediated actions [20], since addition of a highly specific antibody to human FSH to the incubation medium effectively neutralized the inhibitory activity of the isoform. Failure to observe complete reversion of the blocking effects of FSHi upon FSH action by this immunoneutralization procedure may be due to a slight underestimation of the amount of FSHi present in the sample by the immunoassay employed in the present study [8]. In contrast to FSHi, the agonistic effects of the more acidic/sialylated FSH isoform (FSH-5) was unaffected by LH removal.

The mechanism(s) subserving the inhibitory effects of FSHi on FSH-induced aromatization and tPA enzyme activity are uncertain. In contrast to deglycosylated pituitary and recombinant FSH [30, 33], which are incapable to activate the receptor and trigger a signal transduction, the antagonist FSH isoform was able to induce adenylate cyclase activity in a dose-dependent manner, thus indicating that its inhibitory effects were probably exerted at or independently of steps downstream of cAMP formation and protein kinase A activation; further, the observation that the effects of FSHi were insensitive to staurosporine, strongly suggests that the FSH blocking effects were not mediated by simultaneous activation of the PKC pathway, which is one of the main mechanisms by which the FSH receptor is desensitized [36]. Thus, it seems that FSHi acts on alternate pathways to inhibit the stimulatory effects of FSH. Several mechanisms may be proposed, including induction of receptor cross-talk and the subsequent activation of receptors for hormones with FSH antagonistic effects, such as prolactin, which has been

shown to suppress the stimulatory actions of FSH [22, 37, 38]. Another possibility is that FSHi may inhibit nonreceptor tyrosine kinase activation, an effect that may potentially arrest the FSH-induced accumulation of aromatase cytochrome P450 mRNA in rat granulosa cells [39, 40]. Alternatively, FSHi may exert its antagonistic effects by increasing the intracellular levels of protein kinase A inhibitors, which have not been yet isolated from ovarian granulosa cells but that may inhibit cAMP-dependent phosphorylation in a variety of tissues, including rat Sertoli cells [41–43]. On the other hand, FSHi may inhibit the FSH-stimulated actions indirectly by increasing the amounts of insulin-like growth factor binding proteins, which have been shown to act as potent inhibitors of some specific gonadotropin actions, including induction of E production and tPA enzyme activity, in a variety of animal models [44–47].

All these possible mechanisms, however, imply that FSH isoforms (including FSHi) may be able to elicit differential or even disparate responses at the receptor level. Support for isoform-specific induction of unique target site events comes from studies showing that, in contrast to its native analog, chemically deglycosylated ovine FSH may induce divergent effects in terms of cAMP accumulation and inhibin production in immature rat Sertoli cells [1, 48]. On the other hand, it has been recently reported that insect-cell-expressed human FSH, which is incompletely glycosylated and sialylated at very low levels [49, 50], may induce dose-dependent biphasic responses behaving as agonist or antagonist of human pituitary FSH depending on the level of receptor-transducer activation promoted by the FSH stimulus [51]. Although simultaneous activation of different G protein subtypes ( $G_s$  and members of the  $G_i/G_o$  class) or uncoupling of the receptor from the stimulatory (G-dependent) signaling pathway may explain the dual effects provoked by the underglycosylated, baculovirus-expressed FSH analog, it is important to emphasize that FSHi also blocked the stimulatory effects of DBcAMP, suggesting that its inhibitory properties are not mediated through simultaneous activation of the  $G_i/G_o$  pathway. Nevertheless, the overall data indicates that the FSH receptor-transducer system possesses sufficient versatility to respond in a different manner to glycosylation-dependent diverse FSH signals.

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 antihormone may function as a fine-tuning regulator of the intensity of the gonadotropic signal to avoid overstimulation of the growing follicle. In

fact, we and others have found that the basal secretion of this particular FSH variant increases during the late follicular phase of the menstrual cycle [3, 11]. Conversely, abnormally elevated levels of this FSHi may counteract in excess the physiological gonadotropic stimulus and eventually lead to a hypogonadotropic state; this possibility is exemplified by the recently reported case of a young woman with normal ovulatory menstrual cycles, infertility and low B/I FSH ratios [10]; 65% of her serum FSH eluted in a pH range above 6.0 and, in terms of estradiol production *in vitro*, had compromised bioactivity. The means of this abnormal production of basic FSH isoforms in terms of FSH-induced *in vivo* functions and whether it is the cause or consequence of this patient's infertility is a matter of speculation at this time. Further support for the possibility that this naturally occurring FSH antagonist may be produced and secreted by the pituitary gland during certain conditions comes from the finding that hypogonadal women treated with GnRH antagonist may exhibit circulating immunoreactive FSH isoforms that are devoid of bioactivity but are otherwise capable of blocking FSH action in ovarian granulosa cells [9].

In summary, the anterior pituitary gland synthesizes different FSH charge isoforms which may act as either agonists or antagonists of FSH action at the target cell level. Elucidation of the chemical structure of both the stored and released FSH antagonist variants may be useful to further define the structure-function relationship of this gonadotropin as well as to design antagonist analogs, potentially of use in exogenously controlled follicular maturation and in contraception.

#### Acknowledgments

The authors are indebted to the NIDDK for the human FSH and LH RIA reagents, to Dr. Aaron J.W. Hsueh from Stanford University, Stanford, Calif., for providing the HEK 293-cell line expressing the human FSH receptor and to Dr. P. Michael Conn from the Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, Oreg., for his critical review of the manuscript.

This work 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.

## References

- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V: Follicle-stimulating isoforms: Characterization of physiological relevance. *Endocr Rev* 1995;16:765-787.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J: Sexual maturation in female rats: Time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1983;28:196-205.
- Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein JS, Ketch RP, Beitins IZ: Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroid in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:465-473.
- Wide L: Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol* 1989;123:519-529.
- Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Espinoza R, Domínguez R, Morales L, Flores A: Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol* 1990;126:323-332.
- Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel SC: Production of all follicle-stimulating hormone isoforms from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod* 1984;30:382-387.
- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V: Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod* 1992;7:23-30.
- Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cárdenas M, Ulloa-Aguirre A: Studies on the relative *in vitro* biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 1996;2:563-571.
- Dahl KD, Biczak TA, Hsueh AJW: Naturally occurring antibodies: Secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science* 1988;239:72-74.
- Dumestic DA, Padmanabhan V, Beitins IZ, Sonstein JS, Shapiro SS: Elevated serum levels of immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) with partial bioactivity mimics hypergonadotropic hypogonadism in women with infertility. 75th Annu Meet Endocr Soc, Las Vegas, 1993, abstr 1064.
- Zambrano E, Olivares A, Méndez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A: Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1647-1656.
- Jones LR, Benker G, Satalinski PR, Lloyd TI, Lowry PJ: Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J Endocrinol* 1997;82:77-86.
- Tilly JL, Aihara T, Nishimori K, Jia X-C, Billig H, Kowalski KJ, Perlas EA, Hsueh AJW: Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: Species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 1992;131:799-806.
- Bex FJ, Corbin A: Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology* 1981;108:273-280.
- Dufau ML, Tsurahara T, Catt KJ: Interaction of glycoprotein hormones with agarose-concanavalin A. *Biochem Biophys Acta* 1972;278:281-292.
- Chappel SC, Bashey HM, Snyder PJ: Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol* 1986;113:311-316.
- Granelly-Piperno A, Reich R: A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J Exp Med* 1978;148:223-232.
- Heussen CM, Dowdle EB: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980;102:196-204.
- Shinohara O, Knecht M, Catt KJ: Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8518-8522.
- Richards JE: Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994;15:725-751.
- Hong H, Herington AC, Roupas P: Effect of protein kinase C modulation on gonadotropin-induced granulosa cell steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:83-95.
- Lambert A, Talbot JA, Mitchell R, Robertson WR: Inhibition of protein kinase C by staurosporine increases estrogen secretion by rat Sertoli cells. *Acta Endocrinol* 1991;125:286-290.
- Hidaka H, Kobayashi R: Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992;32:377-397.
- Villanueva LA, Méndez I, Ampuero S, Larrea F: The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod* 1996;2:725-731.
- Sairam MR, Bhargavi GN: A role for glycosylation of the  $\alpha$  subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science* 1985;229:65-67.
- Stockell Hartree A, Renwick GCA: Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 1992;287:665-679.
- Bishop LA, Robertson DM, Cahir N, Schofield PR: Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle-stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol Endocrinol* 1994;8:722-731.
- Moyle WR: Role of the carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action. *J Biol Chem* 1975;250:9163-9169.
- Manjunath P, Sairam MR: Biochemical, biological, and immunological properties of chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem* 1982;257:7109-7115.
- Sairam MR, Manjunath P: Studies on pituitary follitropin. XI. Induction of hormonal antagonistic activity by chemical deglycosylation. *Mol Cell Endocrinol* 1982;28:139-150.
- Sairam MR, Manjunath P: Hormonal antagonistic properties of chemically deglycosylated human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem* 1983;258:445-449.
- Dunkel L, Jia X-C, Nishimori K, Boime I, Hsueh AJW: Deglycosylated human chorionic gonadotropin (hCG) antagonizes hCG stimulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation through a noncompetitive interaction with recombinant human luteinizing hormone receptors. *Endocrinology* 1993;132:763-769.
- Keene JL, Nishimori K, Galway AB, Matzuk MM, Hsueh AJW, Boime I: Recombinant deglycosylated human FSH is an antagonist of human FSH action in cultured rat granulosa cells. *Endocr J* 1994;2:175-180.
- Creus S, Chaia Z, Pellizzari E, Cigorraga S, Ulloa-Aguirre A: Biological characterization of pituitary human FSH. 10th Int Congr Endocrinol, San Francisco, 1996, abstr P3-296.
- Siris ES, Nisula BC, Catt KJ, Horner K, Birken S, Canfield R, Ross GT: New evidence for intrinsic follicle-stimulating hormone-like activity in human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Endocrinology* 1978;102:1356-1361.
- Quintana J, Hipkin RW, Sánchez-Yague J, Ascoli M: Follitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *J Biol Chem* 1994;269:8772-8779.
- Krasnow JS, Hickey GJ, Richards JS: Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol Endocrinol* 1990;4:13-22.
- Yoshimura Y, Maruyama K, Shiraki M, Kawakami S, Fukushima M, Nakamura Y: Prolactin inhibits plasminogen activator activity in the preovulatory follicles. *Endocrinology* 1990;126:631-636.
- Orly J, Rei Z, Greenberg GNM, Richards JS: Tyrosine kinase inhibitor AG-18 arrests follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation: Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for multiple messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 1994;134:2336-2346.

- 40 Costieri N, Elberg G, Lunenfeld B, Pariente C, Dor J, Kanety H, Karasik A: A cytosolic protein tyrosine kinase activity is induced by follicle-stimulating hormone and insulin like growth factor-I in human granulosa cells. *Endocrinology* 1995;136:4705-4708.
- 41 Tash JS, Welsh MJ, Means AR: Regulation of protein kinase inhibitor by follicle-stimulating hormone in Sertoli cells *in vitro*. *Endocrinology* 1981;108:427-434.
- 42 Olsen SR, Uhler MD: Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor. *Mol Endocrinol* 1991;5:1246-1256.
- 43 Van Patten SM, Howard P, Walsh DA, Maurer RA: The  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms of the inhibitor of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase: Characteristics and tissue and developmental-specific expression. *Mol Endocrinol* 1992;6:2114-2122.
- 44 Mason HD, Willis D, Holly JMP, Cwyfan-Hughes SC, Seppala M, Franks S: Inhibitory effects of insulin-like growth factor-binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 89:R1-R3.
- 45 Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM, Seppala M: Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: Evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv Exp Med Biol* 1993;343:377-385.
- 46 Yoshimura Y, Nobumitsu A, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M, Kobayashi T: Interactions between insulin-like growth factor-I and the renin-angiotensin system in follicular growth and maturation. *J Clin Invest* 1996;98: 308-316.
- 47 Yoshimura Y, Nagamatsu S, Ando M, Iwashita M, Oda T, Katsumata Y, Shiokawa S, Nakamura Y: Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits gonadotropin-induced ovulation, oocyte maturation and steroidogenesis in rabbit ovary. *Endocrinology* 1996;137:438-446.
- 48 Padmanabhan V, Kersey KA, Sairam MR, Cole LA, Ireland JJ, Beitins IZ: A multiple endpoint bioassay to assess physiological relevance of FSH heterogeneity. 75th Annu Meet Endocr Soc, Las Vegas, 1993, abstr 182.
- 49 Chen W, Shen QX, Bahl OP: Carbohydrate variant of the recombinant  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin expressed in baculovirus expression system. *J Biol Chem* 1991;266: 4081-4087.
- 50 Jarvin DL, Finn EE: Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology* 1995;212:300-301.
- 51 Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, López FJ: Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: A novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 1997; 11:517-526.