

11262

16
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

"ISOFORMAS DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE EN LOS DIFERENTES ESTADIOS
PUBERALES DEL VARON"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A:

DANIELA NORA SODERLUND SEDANE

TUTOR: DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
CO-TUTOR: DR. ALFREDO ULLOA-AGUIRRE

MEXICO. D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

273644



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A GEORGINA, *POR TODO*

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor.

A mi Co-Tutor.

A mis compañeras de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo.

Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. I.M.S.S.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

RESUMEN

La Hormona Estimulante del Folículo (FSH), liberada en forma pulsátil por la hipófisis, está constituida por un grupo de isoformas que difieren entre sí en el contenido de carbohidratos. Cada isoforma presenta características fisicoquímicas y biológicas particulares, y la microheterogeneidad existente varía con el estado endócrino del sujeto.

En el presente estudio separamos e identificamos las diversas formas moleculares de la FSH secretada tanto en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH, durante los diversos estadios de pubertad del varón.

Se incluyeron 5 varones sanos en cada uno de los 5 estadios puberales. A cada sujeto se le extrajo 1.5 ml de sangre cada 10 min. durante 2 hs en forma basal, durante 4 hs luego de la administración de 10 μg de GnRH i.v. y durante 4 hs después de la administración de 90 μg de GnRH i.v. Para evaluar el patrón de distribución de las isoformas de FSH, se constituyeron 3 pozas para cada sujeto (I: 2hs basales, II: 4hs pos 10 μg de GnRH y III: 4hs pos 90 μg de GnRH). Cada poza fue dializada, liofilizada y sometida a un cromatoenfoco (CF) con un gradiente de pH de 7.5 a 3.0. El material eluido se dividió en 10 grupos de fracciones (GDF) a intervalos de pH de 0.5. A cada GDF se le determinó su concentración de FSH por RIA.

En todos los sujetos estudiados, en todas las fases del estudio, las isoformas de FSH fueron recuperadas predominantemente en valores de pH < 4.5 . En condiciones basales, los sujetos en estadio 1, 4 y 5 presentaron una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas que los sujetos en estadios 2 y 3 de Tanner. Luego del estímulo con 10 y con 90 μg de GnRH se observó que los sujetos en estadio 1, 2 y 5 presentaron una mayor abundancia de las isoformas menos ácidas que los individuos en estadios 3 y 4 de Tanner. Los cambios en la distribución de las isoformas de FSH fueron expresados como el cociente de las isoformas con valores de pH de elución < 4.5 entre aquellas con valores ≥ 4.5 . Las comparaciones en condiciones basales demostraron un incremento de este índice entre los sujetos en estadio 2 en relación con aquellos en estadio 1, y un decremento paulatino de dicho índice a partir del estadio 3. Luego del estímulo tanto con 10 como con 90 μg de GnRH se observó que este índice, en los estadios 1, 2 y 3 de Tanner disminuía en relación con lo encontrado en condiciones basales, mientras que en los estadios 4 y 5 se mantenía.

Independientemente del estadio de pubertad en que se encuentre el varón las formas más ácidas de FSH siempre predominarán, pero existen variaciones en las isoformas de la FSH circulante a lo largo del proceso puberal las cuales pueden deberse a cambios en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH o a cambios en el ambiente esteroideogénico.

ABSTRACT

FSH, which is released in a pulsatile fashion by the pituitary, is constituted by a group of isoforms which differ between them in their carbohydrate composition. Each isoform exhibits specific physicochemical and biological characteristics. The existing microheterogeneity depends on the endocrine status of the donor.

In the present study we separated and identified the various FSH isoforms secreted basally, as well as after repeated stimuli with GnRH, throughout male sexual maturation.

Five normal males in each Tanner stage (1-5) were included. Blood samples (1.5 ml) were obtained every 10 min basally for 2 hs. At the beginning of the third hour, all subjects received an i.v. bolus of 10 μ g GnRH and samples were obtained for 4 hs every 10 min; afterwards, an i.v. bolus of 90 μ g GnRH was administered and samples were drawn every 10 min for 4 more hours. In order to determine the distribution pattern of the FSH isoforms, we constituted 3 different pools for each individual (I: 2 basal hours; II: 4 post 10 μ g GnRH hours; III: 4 post 90 μ g GnRH hours). Each pool was lyophilized and dialyzed and chromatofocused in a pH gradient ranging from 7.5 to 3.0. The eluted material was separately pooled in 10 fractions (divided by 0.5 pH intervals). Each fraction was measured for FSH content by radioimmunoassay.

In all individuals and in each cycle phase FSH isoforms were predominantly recovered at pH values below 4.5. During the basal phase individuals classified as Tanner 1, 4 or 5 presented a significant increase in the relative abundance of less acidic isoforms when compared to individuals Tanner 2 or 3. After both GnRH stimuli subjects in Tanner stage 1, 2 or 5 had a significant increase in the relative abundance of less acidic isoforms when compared to individuals Tanner 3 or 4. Changes in isoform distribution were expressed as the ratio of the amounts of isoforms with elution pH values below 4.5, relative to those with values above this pH. Basally, this ratio was higher in individuals Tanner 2 than in Tanner 1; from Tanner 3 on, this ratio decreased progressively. After both GnRH stimuli, this ratio decreased in Tanner 1, 2 and 3, whilst in Tanner 4 and 5 it remained constant.

In all Tanner stages acidic FSH isoforms predominated; however, some differences were detected throughout male sexual maturation which could be due to changes in GnRH pulsatility frequency or to changes in the steroidogenic milieu.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

Pubertad	1-4
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada	4-8
Secreción Pulsátil de GnRH y Gonadotropinas	8-9
Liberación Bifásica de Gonadotropinas	9-11
Mecanismos de Regulación en la Síntesis de LH y FSH	11-12
Isoformas de la Hormona Estimulante del Folículo	12-16

JUSTIFICACION 17

OBJETIVO 18

HIPOTESIS 18

SUJETOS Y METODOS

Diseño del Estudio	19
Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación	20
Métodos	21-24
Cromatoenfoco de FSH	22-23
RIA de FSH	23-24

ANALISIS ESTADISTICO 25

RESULTADOS 26-28

DISCUSION 29-36

BIBLIOGRAFIA 37-49

ABREVIATURAS

ABP	Proteína fijadora de andrógenos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CF	Cromatoenfoque
E2	Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GDF	Grupo de fracciones
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HCG	Gonadotropina coriónica humana
HHG	Hipotálamo-hipófisis-gónada
IEF	Isoelectroenfoque
LH	Hormona luteinizante
PI	Punto isoeléctrico
Proteínas Gs	Proteínas G estimuladoras
RIA	Radioinmunoanálisis
SNC	Sistema nervioso central
T	Testosterona

INTRODUCCION

Pubertad

La pubertad se define como la etapa de transición de la niñez a la vida adulta. Los cambios tanto físicos como psicológicos que se presentan condicionan que el individuo, muchas veces con dificultad, tenga que adaptarse a su nueva situación biopsicosocial. Esta etapa debe ser considerada como una fase más del desarrollo gonadal, la cual conduce finalmente a la madurez sexual completa y a la fertilidad. La edad de inicio es variable puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y ambientales (Wheeler, 1991; Parra y Ramos-Galván, 1992). Las gónadas se desarrollan tanto en su tamaño como en sus funciones endócrina y reproductiva especializadas. La producción total de hormonas sexuales aumenta progresivamente, lo que conduce al desarrollo de las características sexuales secundarias y en asociación y dependencia íntima con los eventos hormonales, se adquiere la capacidad de la gametogénesis. La maduración sexual secundaria en los varones comprende el desarrollo testicular, el genital y la aparición de vello púbico. En condiciones normales en nuestro medio, el inicio de los cambios puberales se presenta después de los 9 años de edad (media 11.5 años, con límites entre los 9 y 14 años) (Wheeler, 1991). Concomitantemente con el crecimiento peneano, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales crecen y se desarrollan. La primera eyaculación se presenta durante la pubertad temprana o media, generalmente precediendo al pico de crecimiento lineal, a una edad cronológica promedio de 14.3 años (Laron *et al*, 1980). El crecimiento peneano comienza generalmente entre 12 y 18 meses después del inicio del crecimiento testicular. El vello púbico aparece generalmente poco después de que ha dado inicio el desarrollo genital. La aparición del vello facial y axilar es sumamente variable y su magnitud depende de factores genético-raciales. El vello axilar aparece aproximadamente dos años después de la

aparición del púbcico. Otros cambios somáticos tales como el aumento en dimensiones de los componentes cartilaginoso y membranoso de las cuerdas vocales (que conlleva al agravamiento de la tonalidad de la voz característica del varón) y el crecimiento de la laringe, del cartilago cricotiroideo y músculos laringeos ocurren exclusivamente en el varón como consecuencia de la acción de los andrógenos. Asimismo, el varón desarrolla un aumento de la masa muscular (Van Vliet, 1991; Ulloa-Aguirre *et al*, 1994).

La descripción comparativa de los cambios físicos entre individuos y poblaciones requiere de un método objetivo y reproducible que describa y clasifique las características sexuales secundarias así como a las diferentes etapas puberales. Estas características fueron descritas y agrupadas por Marshall y Tanner (1969, 1970); en la actualidad, esta es la clasificación más aceptada internacionalmente. En el varón, dicha clasificación incluye las siguientes características: volumen testicular; rugosidad, coloración y elongación del escroto; longitud y grosor del pene y cantidad, distribución y propiedades del vello púbcico. Con base en estas características, la pubertad del varón se divide en cinco estadios de desarrollo, que van desde el estadio 1 (prepuberal) hasta el estadio 5 que corresponde al adulto normal. La pubertad da principio con la elongación escrotal y el aumento en el volumen testicular (Burr *et al*, 1970). El crecimiento de los testículos se presenta durante un período aproximado de 4 años alcanzándose un volumen final mayor de 15 ml. El crecimiento testicular está dado principalmente a expensas de la maduración de los túbulos seminíferos por la acción de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Marshall y Tanner, 1986).

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) se reactiva durante esta etapa de la vida, después de haber permanecido en una pausa fisiológica relativa durante la infancia (Retter y Grumbach, 1982). Los mecanismos íntimos que dan inicio a la pubertad no han sido perfectamente dilucidados, pero es la activación del eje H-H-G lo que genera los cambios somáticos característicos

de esta etapa. Existen dos teorías que podrían explicar de manera satisfactoria la inhibición funcional de la unidad hipotálamo-hipofisaria durante la niñez o prepubertad. La primera de ellas es dependiente de los esteroides gonadales, que a las bajas concentraciones existentes durante el período posnatal, la infancia temprana y la prepubertad son suficientes para inhibir o disminuir el nivel de actividad del sistema hipotalámico generador de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Este sistema de alta sensibilidad hipotalámica a esteroides sexuales opera principalmente durante el período posnatal y la infancia temprana a juzgar por las elevadas concentraciones de gonadotropinas que exhiben aquellos pacientes con gónadas no funcionales, tal y como sucede en el síndrome de disgenesia gonadal. En estos pacientes, es posible detectar concentraciones basales elevadas de la hormona luteinizante (LH) y de FSH, así como una sensibilidad hipofisaria aumentada a la GnRH exógena durante los primeros 2 a 3 años de vida y posteriormente en la pubertad y la vida adulta. Este sistema de control se inicia aparentemente durante la vida fetal, aunque en este período se manifiesta en un nivel más bajo que el observado en la infancia (Conte *et al.*, 1975). El segundo mecanismo responsable del nivel mínimo de operatividad del sistema hipotalámico generador de pulsos durante la prepubertad es el denominado mecanismo inhibitorio intrínseco del sistema nervioso central (SNC), el cual se inicia durante la infancia tardía y opera de manera predominante sobre el mecanismo dependiente de los esteroides gonadales durante la niñez (4 a 11 años de edad). Este mecanismo explica de manera satisfactoria la reducción tan importante en las concentraciones sanguíneas de las gonadotropinas que presentan las pacientes con disgenesia gonadal durante la niñez (Conte *et al.*, 1975). Al igual que el anterior, este mecanismo inicia aparentemente su función durante la vida intrauterina una vez que la diferenciación y desarrollo de la unidad hipotálamo-hipofisaria han sido completados. Aún cuando ambos mecanismos inhibitorios del sistema hipotalámico generador de pulsos de la GnRH operan aparentemente de

manera simultánea, su nivel de actividad difiere dependiendo del estadio de desarrollo. La coexistencia de ambos mecanismos ha sido sugerida por la observación de que durante la niñez (período durante el cual predomina la actividad inhibitoria dependiente del SNC) las concentraciones en suero de las gonadotropinas se encuentran discretamente más elevadas en pacientes con disgenesia gonadal que en niños normales (Conte *et al*, 1975). Aún cuando el o los componentes responsables del mecanismo de inhibición central son desconocidos, es posible que diversos factores de naturaleza peptídica (opioides, hormona liberadora de corticotropina), así como algunos neurotransmisores y neuromoduladores (catecolaminas, δ -aminobutirato, serotonina, glutamato, aspartato, etc.) estén involucrados. Considerando lo anterior, el inicio de la pubertad y el desarrollo de la misma se presentan cuando el mecanismo central disminuye su actividad inhibitoria y se reduce concomitantemente la elevada sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales. La síntesis y secreción de la GnRH por parte del hipotálamo, estimula la secreción de la LH y de la FSH por la hipófisis. Estas estimulan a su vez a las gónadas en sus dos funciones principales: la esteroidogénesis y la gametogénesis (Grumbach y Kaplan, 1990; Ulloa-Aguirre *et al*, 1994).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

En 1949, Everet *y cols.*, propusieron que la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas era mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior. Mc Cann *y cols.*, (1960) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de ambas gonadotropinas por la hipófisis anterior y en 1971 los trabajos tanto de Matsuo *y cols.*, como de Schally *y cols.*, confirmaron que un decapeptido era el directamente responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces hormona

liberadora de gonadotropinas.

Las neuronas controladoras de la secreción de GnRH reciben innervación de otras neuronas capaces también de estimular o inhibir la función gonadal. Ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina modifican la secreción de GnRH (Barraclough y Wise, 1982). Por ejemplo, la inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal de la rata desencadena la liberación de GnRH y consecuentemente de LH y FSH; los bloqueadores alfa adrenérgicos previenen la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y alteran la ovulación en la mujer. Las endorfinas influyen también en la secreción de GnRH y consecuentemente de gonadotropinas durante la pubertad (Ulloa-Aguirre *et al*, 1988). Asimismo, se ha observado que la administración de naloxona (antagonista opioide) induce la ovulación en pacientes con diagnóstico de hiperprolactinemia, amenorrea o anorexia nervosa (Tay *et al*, 1993; Larrea *et al*, 1995; Matera *et al*, 1995).

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico (Marshall *et al*, 1988). Este péptido es secretado en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media; una vez que alcanza la circulación porta-hipofisaria es transportado hacia la hipófisis anterior, estimulándose la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (Bergland y Page, 1978). Se ha demostrado que los pulsos de frecuencias altas (pulsos rápidos) favorecen la síntesis y secreción de LH, mientras que los pulsos de frecuencias bajas (pulsos lentos) favorecen la secreción de FSH (Turgeon y Waring, 1982; Dalkin *et al*, 1989).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión estimula la hidrólisis de fosfoinosítoles de membrana y moviliza el calcio de los depósitos

intracelulares. La GnRH activa a su receptor estimulando la activación de las proteínas G, las cuales estimulan a la fosfolipasa C (PLC) para que se produzca la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacil glicerol (DAG). El rol del IP₃ en este mecanismo es poco claro, pero el DAG actúa activando la protein kinasa C (PKC). La activación de la PKC en forma directa puede estimular la liberación de la LH (Clayton y Catt, 1981; Catt y Stojilkovic, 1989; Conn, 1989; Hawes y Conn, 1993). La GnRH también induce un incremento del calcio intracelular el cual actúa como un segundo mensajero en la liberación de LH inducida por GnRH (Hawes y Conn, 1993). Estas acciones, provocan un aumento bifásico de la concentración de calcio citosólico y consecuentemente inducen la liberación de las gonadotropinas (Catt y Stojilkovic, 1989). Los mecanismos dependientes de calcio, son los responsables de la liberación inmediata de las gonadotropinas contenidas en los gránulos secretorios y éstos también contribuyen en la síntesis de las subunidades de las gonadotropinas. Un mediador intracelular de la señal de calcio en el gonadotropo es la calmodulina, la cual después de unirse al calcio altera la actividad de varias enzimas y proteínas del citoesqueleto que están implicadas en los procesos secretorios (Conn *et al*, 1995). Asimismo, se ha propuesto que la activación de un elemento proteico existente en el complejo contráctil citoesqueleto-vesícula, se presenta después de la fosforilación, induciéndose entonces la extrusión de los gránulos que contienen a las hormonas (Conn, 1989).

El número de receptores hipofisarios para GnRH puede ser incrementado farmacológicamente mediante la exposición de la glándula a GnRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una respuesta mayor de la glándula a la estimulación con GnRH (Hazum y Conn, 1988; Laws *et al*, 1990).

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la gonadotropina coriónica humana (HCG) y la tirotropina, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades

denominadas subunidad alfa y subunidad beta, unidas por fuerzas no covalentes. La alfa es idéntica entre estas glicoproteínas, y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos (Boothby *et al.*, 1981; Fiddes y Goodman, 1981; Godine *et al.*, 1982; Fiddes y Talmadge, 1984; Gordon *et al.*, 1988), mientras que la beta es única para cada una de ellas y les confiere su especificidad biológica (Chappel *et al.*, 1983a; Fiddes y Talmadge, 1984; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). La actividad biológica de las glicoproteínas hipofisarias sólo se observa si ambas subunidades se encuentran unidas (Tsatsoulis *et al.*, 1991).

Ambas gonadotropinas hipofisarias ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios) al estimular la síntesis de esteroides sexuales, así como la maduración de los gametos (Chappel *et al.*, 1983a). En los testículos, el sitio primario de acción de la FSH es el epitelio de los túbulos seminíferos, donde se une a la cara basal de las células de Sertoli con la consecuente estimulación de la espermatogénesis y la síntesis de diversos compuestos de naturaleza proteica [inhibina, activina, proteína fijadora de andrógenos (ABP)] y del complejo enzimático de aromatasas que convierte a la testosterona en estradiol; en el ovario, la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa para estimular el desarrollo folicular. La LH induce la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona; en la mujer, la LH estimula la esteroidogénesis ovárica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1985; Veldhuis, 1991).

La FSH se une a receptores específicos localizados en la membrana de la célula blanco. 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 Conn, 1998; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998); consiste de 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 cilindro, el cual se encuentra orientado perpendicularmente al plano de la membrana celular. La realización de experimentos mediante el uso de péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxilo terminal de la tercera asa intracelular (lisina 551-arginina 555) del receptor de FSH de rata, ha demostrado que esta región es particularmente crítica para el acoplamiento de proteínas G estimuladoras (Gs), activación de PKA y síntesis de 17β estradiol (Grasso *et al.*, 1995 a,b). En el testículo, la FSH interactúa con receptores específicos de superficie celular localizados en la membrana plasmática de las células de Sertoli (Means *et al.*, 1976; 1980). En la hembra, el receptor de FSH se localiza únicamente en las células de la granulosa del ovario (Richards, 1994).

Secreción pulsátil de GnRH y gonadotropinas

La GnRH, liberada en forma pulsátil condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El tónico, es el patrón de secreción observado en los varones y también uno de los mecanismos existentes en la mujer, mientras que la secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente es pulsátil en todas las etapas de la vida, bien que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto) (Dunkel *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991). Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, existe dificultad para detectar los pulsos cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (Spratt *et al.*, 1988).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, pues al exponer a la

glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (Lalloz *et al.*, 1988; Conn y Crowley, 1991). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada induce una respuesta hormonal disminuida. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobre-estimulación de la célula (Ascoli, 1982). Asimismo, ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisaria, además de que la frecuencia en la pulsatilidad de GnRH es modificada de acuerdo con el ambiente endócrino existente; por ejemplo, esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (Marshall *et al.*, 1991).

Liberación bifásica de gonadotropinas

Al igual que otras hormonas proteicas, las gonadotropinas son almacenadas en gránulos liberándose en forma bifásica (Lacy *et al.*, 1973; Bremmer y Paulsen, 1974). Esta liberación se caracteriza por un aumento agudo inicial, presentándose posteriormente un periodo de estabilización seguido por una segunda fase de incremento en la tasa de secreción. El fenómeno de la liberación bifásica se ha explicado mediante la existencia de dos pozas metabólicas de hormona liberable. Se ha considerado que la primera poza metabólica es sintetizada en gránulos cercanos a la membrana celular y es fácilmente liberable en respuesta a altas concentraciones de calcio intracelular. La segunda, originada en gránulos no tan cercanos a la membrana celular, posiblemente requiere de la síntesis *de novo* de hormona en respuesta a un aumento sostenido de calcio, lo cual ocasiona la migración de los gránulos hacia la membrana celular y la subsecuente liberación de la hormona (Leong y Thorner, 1991; Conn *et al.*, 1995). Se ha demostrado que durante la infusión de GnRH (por

cuatro horas) en varones normales, las concentraciones de LH sérica presentan un patrón bifásico de elevación. Este patrón es caracterizado por un aumento agudo durante los primeros 30 minutos, seguido por una meseta hasta los 90 minutos aproximadamente, momento en el cual se inicia el segundo incremento el cual continúa hasta el final de la infusión (Bremmer y Paulsen, 1974). Se ha sugerido que las dos fases de liberación de LH representan una evidencia clara de la existencia de dos pozas metabólicas funcionales en la hipófisis humana, una que es rápidamente liberable y otra que requiere de una estimulación más prolongada para su liberación (Bremmer y Paulsen, 1974; Beitins *et al.*, 1977). Este mismo patrón de liberación ha sido descrito para la FSH ya que se ha observado que después del estímulo con GnRH existe una respuesta aguda a los 20 minutos y una segunda respuesta a los 120 minutos (Rebar *et al.*, 1973; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988).

La administración de dosis submáximas de GnRH por un período de varias horas, bien sea mediante inyecciones repetidas o por infusión continua, permite llevar a cabo tanto la evaluación de la poza metabólica de gonadotropinas que se libera de forma aguda como aquella que se libera tardíamente. Cada poza metabólica representa distintas condiciones fisiológicas, pues la primera refleja la sensibilidad del gonadotropo y la segunda la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos pozas metabólicas hipofisarias de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisaria. Si la estimulación con GnRH es breve y pequeña (5-10 μg), el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisaria, requiere de una duración más prolongada del estímulo o de una mayor cantidad de GnRH (90-100 μg). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje, la cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100-150 μg), no se pueden apreciar por separado los

componentes de sensibilidad y reserva, ya que la existencia de una acción más potente ocasiona la liberación de ambas pozas de manera conjunta (Wang *et al*, 1976).

Mecanismos de regulación en la síntesis de LH y FSH

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas (Winters *et al*, 1979; Winters y Troen, 1985; Gharib *et al*, 1987; Winter *et al*, 1992). Los receptores esteroideos han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde se han relacionado además con la regulación de la conducta sexual y la diferenciación del cerebro (Urban *et al*, 1991).

Existen otras tres hormonas gonadales diferentes a los esteroides, encargadas de regular la secreción de gonadotropinas. Estas incluyen a dos proteínas dimericas, la inhibina y la activina, y a una monomérica, la folistatina; todas ellas, son producidas por las gónadas además de ser sintetizadas en una amplia variedad de tejidos como la hipófisis, el hígado, la placenta, la médula ósea, la glándula suprarrenal y el cerebro (Mason *et al*, 1985; Petraglia *et al*, 1987; Meunier *et al*, 1988; Sawchenko *et al*, 1988; Ying, 1988; Mason *et al*, 1989; Shimasaki *et al*, 1989; Krummen *et al*, 1993; Moore *et al*, 1994). La inhibina es 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 sus efectos son enmascarados por la presencia de testosterona (Culler, 1990; Culler y Negro-Vilar, 1990). Por su parte, la activina, incrementa la síntesis y secreción de FSH, mientras que la folistatina actúa bien sea indirectamente al bionutralizar a la activina (Krummen *et al*, 1993) o por medio de su asociación con cadenas de heparán sulfato de la membrana plasmática, lo cual favorece la unión de activina a su receptor produciéndose su captación

dentro de las células (Mason *et al.*, 1989; Krummen *et al.*, 1993; Sugino *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1997).

Existen otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas a nivel central. La prolactina inhibe la secreción de GnRH (Milenkovic *et al.*, 1994; Calogero *et al.*, 1996). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar en el hipotálamo al modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) mientras que a su vez la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (Marshall y Kelch, 1986).

Isoformas de la hormona estimulante del folículo

La hormona estimulante del folículo, al igual que otras glicoproteínas, no es una hormona de estructura única sino que está constituida por un grupo de isoformas. La presencia de variaciones en la estructura y en la distribución de oligosacáridos sializados y en menor grado sulfatados en la hormona, constituye la base química para la formación de las isoformas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Los oligosacáridos desempeñan un rol importante en el plegamiento, ensamblaje de subunidades y secreción de la molécula, además de que determinan la tasa de depuración metabólica así como la interacción de la hormona con su receptor (Sairam, 1989; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). Cada isoforma posee características biológicas particulares como son su capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades *in vitro* e *in vivo*, características éstas que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a).

Los residuos de ácido siálico y de sulfato, presentes en los oligosacáridos de las gonadotropinas determinan su tasa de depuración metabólica, así como la potencia biológica *in vivo* de la molécula (Morell *et al.*, 1971; Wide, 1986; Wide y Hobson, 1986; Fiete *et al.*, 1991;

Timossi *et al*, 1998b). Los sulfatos terminales favorecen la remoción de las gonadotropinas de la circulación en su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor específico (Fiete *et al*, 1991); por el contrario, el ácido siálico disminuye la captación hepática (Morell *et al*, 1971). La utilización de 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, son rápidamente depuradas de la circulación y son prácticamente inactivas *in vivo* comparadas con la estructura natural de FSH (Vaitukaitis y Ross, 1971; Yang y Papkoff, 1973; Galway *et al*, 1990). Bishop y cols., (1995), demostraron que ambos residuos de carbohidratos de la cadena β tienen un rol importante en la determinación de la potencia *in vitro* de esta gonadotropina.

Por otra parte, los residuos de ácido siálico y en menor grado los de sulfato, determinan la distribución por carga de las isoformas de la FSH (Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992a; 1995a,b). Se han aislado múltiples isoformas por carga en extractos de hipófisis anterior de varias especies animales, incluido el hombre (Ulloa-Aguirre *et al*, 1982; Stanton *et al*, 1992; Chappel, 1995; Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). Las variantes más ácidas (sializadas) presentan una vida media plasmática prolongada y una bioactividad mayor *in vivo*, al determinar 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/sializadas 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 sistema celular utilizado para valorar ambas actividades (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a,b; Zambrano *et al*, 1995; 1996;

Timossi *et al*, 1998a).

La estructura de los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas se encuentra regulado por varios factores. La GnRH, además de ser el factor más importante en la regulación y síntesis de gonadotropinas, también modula su glicosilación (Ramey *et al*, 1987; Sardanons *et al*, 1987; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992c; Vogel *et al*, 1986; Wide y Albertsson-Wikland, 1990; Wide *et al*, 1996a). El tratamiento de mujeres hipogonádicas con antagonistas de la GnRH conduce a la producción de isoformas de FSH con una relación bioactividad-inmunoactividad reducida, probablemente debido a una alteración en la glicosilación (Dahl *et al*, 1988).

La mayor resolución para la separación de isoformas se obtiene mediante técnicas que separan por carga como el isoelectroenfoque (IEF) o el cromatoenfoque (CF). Este último método ofrece la ventaja adicional de que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana del pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y nuevamente procesadas a través de un intervalo de pH diferente, sin que exista pérdida significativa de la actividad (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982). Ha sido demostrado, que las isoformas de FSH tienen predominantemente carga negativa (pI que corresponden a valores de 5.5 a 3.4), en contraste con lo que ha sido descrito para las isoformas de LH. La naturaleza ácida de las isoformas de FSH, se debe primordialmente a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (aproximadamente 87%) con residuos terminales de ácido siálico (Green y Baenziger, 1988).

La rata y el hámster han sido los modelos experimentales más utilizados para la caracterización del pleomorfismo de la FSH. Por medio del IEF o del CF, varios grupos de investigadores han caracterizado detalladamente la distribución de las diversas isoformas de FSH tanto *in vitro* como *in vivo* durante diversas condiciones fisiológicas y experimentales (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995b). En extractos hipofisarios de hámsters y ratas, hembra y macho, se

ha demostrado la presencia de 6 a 7 isoformas inmunoactivas de FSH. Asimismo, Chappel y cols., en 1983 (b) demostraron que en la hipófisis de ratas hembras prepúberes existen todas las isoformas de FSH observadas en las ratas adultas; sin embargo, antes de la pubertad la mayoría (60-70%) de la FSH inmunoactiva migra hacia la porción ácida del gel (3.4-4.9). En la etapa de la apertura vaginal, es posible observar un incremento significativo en la proporción de algunas isoformas menos ácidas de FSH ($pI=5.0-6.0$) que son las que poseen mayor unión al receptor y mayor actividad biológica *in vitro*. Por lo tanto, pareciese que durante la pubertad la hipófisis adquiere la capacidad de transformar el porcentaje de las isoformas existentes al aumentar la cantidad relativa de las que presentan mayor actividad biológica. En otro estudio realizado en ovejas hembra, se examinaron los cambios en la distribución de las isoformas de FSH en paralelo con los cambios en la secreción de FSH bioactiva, demostrándose que al inducir la pubertad existe un cambio marcado en la distribución de isoformas de FSH circulante hacia aquellas isoformas menos ácidas (Padmanabhan *et al*, 1992).

En el hombre adulto también se han llevado a cabo estudios en los que se han separado las isoformas de FSH, encontrándose que existe un gran número de las mismas, tanto en tejido hipofisiario (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992a; Stanton *et al*, 1996; Zambrano *et al*, 1996), como en suero (Wide, 1982) y en orina (Ulloa-Aguirre *et al*, 1992b). Asimismo, se han llevado a cabo dos estudios en los cuales se han descrito diversas isoformas de la gonadotropina en sujetos puberales; sin embargo, ambos estudios demuestran resultados parciales y poco generalizables debido a diseños experimentales inadecuados. En un primer estudio, Phillips y Wide (1994) analizan una muestra única basal, además de muestras a los 30, 60 y 90 minutos pos GnRH de 10 púberes (que se encontraban en estadio de desarrollo puberal 2, 3, 4 ó 5). En este trabajo los autores no especifican en que estadio se encontraba cada uno de los sujetos

estudiados, por lo cual no se puede inferir cual era la respuesta observada para cada estadio puberal, además de que al hacer esto la muestra sería insuficiente. La única conclusión válida de este estudio sería que las isoformas de FSH, al igual que las de LH, tienden a ser más básicas después del estímulo exógeno con GnRH; sin embargo, hay que considerar que los 10 sujetos fueron estudiados únicamente a los 30 y a los 60 minutos, ya que solamente en 4 de ellos se pudo obtener muestra a los 90 minutos. Asimismo, al haber obtenido una muestra única basal, se limita la interpretación que se le pueda dar a este trabajo. En el segundo estudio Phillips y cols., (1997) tratan de demostrar que de manera basal las formas moleculares de FSH difieren entre los diversos estadios puberales. Ahora bien, solamente se colectó una muestra basal, lo cual también hace poco generalizables a los resultados. Además, esta muestra fue tomada indistintamente a las 0200 o a las 0400 horas. Hay que considerar que durante la pubertad la actividad de la GnRH hipotalámica se incrementa inicialmente durante los pulsos nocturnos episódicos de secreción (Boyar *et al*, 1972), por lo cual no es experimentalmente correcto tomar una muestra en condiciones que podrían ser diferentes para cada sujeto. En ninguna parte del estudio se indican los volúmenes testiculares de cada uno de los sujetos y de los 40 niños estudiados cuatro presentaban talla baja, sin indicarse si ésto era debido a una deficiencia de hormona de crecimiento (total o parcial) o a una talla baja constitucional. En este segundo estudio no hubo estímulo con GnRH. Como se puede observar, el diseño experimental en ambos estudios es limitado, razón por la cual los resultados obtenidos solamente podrían demostrar fenómenos aislados en cuanto a la distribución de isoformas de gonadotropinas durante la pubertad, se refiere.

JUSTIFICACION

Consideramos relevante investigar los posibles cambios en la distribución relativa de las diversas isoformas circulantes de FSH durante el proceso puberal en el varón. La demostración de la existencia de diversas isoformas y su variación a través de los diferentes estadios puberales en condiciones basales así como con diferentes dosis del estímulo con GnRH, permitirá definir y entender con mayor precisión el proceso puberal en el humano.

OBJETIVO

- ❖ Separar e identificar las diversas formas moleculares de la FSH secretada tanto en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH, durante los diversos estadios de pubertad del varón.

HIPOTESIS

- ❖ Las isoformas circulantes de la FSH presentan variaciones en su distribución por carga de acuerdo con el estadio puberal existente y con la dosis del estímulo de GnRH administrado.

SUJETOS Y METODOS

Se incluyeron 5 varones sanos en cada uno de los diferentes estadios puberales (estadio I a 5) clasificados de acuerdo con lo propuesto por Marshall y Tanner, tomándose como parámetro de referencia primordial el volumen gonadal (Tabla 1). Para realizar el estudio, se obtuvo aprobación tanto del comité de estudios en humanos, así como de los adultos y de los padres de los niños participantes.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Los pacientes fueron canalizados media hora antes de iniciar el estudio con una mariposa n° 21 en una vena antecubital. El muestreo siempre se inició a las 0800 hs. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon 0.4 ml correspondientes a la solución salina administrada para mantener la vena permeable.

Inicialmente, se tomaron 3 ml de sangre para cuantificar LH, FSH, testosterona (T) y estradiol (E₂) basales. Posteriormente, a cada sujeto se le extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron 10 µg de GnRH sintética (SERONO de México D.F., S.A. de C.V.) i.v. y se extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 4 horas. Al finalizar dicha etapa, se administraron 90 µg de GnRH i.v. y se efectuó el mismo muestreo antes indicado por 4 horas más. En total se extrajeron 93 ml a cada individuo (Figura 1).

Durante las 10.5 horas, los pacientes permanecieron en posición de decúbito, e ingirieron una dieta estándar baja en grasas, tanto a las 0900 hs como a las 1400 hs.

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Sujetos masculinos mayores de 9 años de edad, con más de 23 kg de peso y por arriba de la percentila 3 de talla y peso para cada edad específica.
2. Desarrollo puberal en estadio 1, 2, 3, 4 ó 5 de acuerdo con la clasificación de Marshall y Tanner (Tabla 1).
3. Hemoglobina mayor de 13 gr/dl y hematocrito mayor del 40%, tres días antes del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Presencia de cualquier tipo de enfermedad endócrina asociada o crónica debilitante después de una evaluación clínica detallada.
2. Presencia de cualquier tipo de sangrado.
3. Presencia de cualquier tipo de enfermedad concomitante el día del estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACION

1. Alteración de los signos vitales durante el muestreo.
2. Reacción de cualquier tipo atribuible a la GnRH administrada en la prueba de estimulación.

TABLA 1
ESTADIOS DE TANNER

1	<p>Escroto, testículos y pene infantiles.</p> <p>Vello púbico: ausente.</p>
2	<p>Escroto: se pigmenta, elonga, aumenta de tamaño y se vuelve rugoso.</p> <p>Testículos: 4.3-8.9 cc.</p> <p>Vello púbico: oscuro y delgado.</p>
3	<p>Escroto: mayor elongación y pigmentación.</p> <p>Testículos: 9-11.4 cc.</p> <p>Pene: crecimiento predominantemente en su longitud.</p> <p>Vello púbico: oscuro, rizado y que asciende hasta el pubis.</p>
4	<p>Escroto: mayor oscurecimiento de la piel.</p> <p>Testículos: 11.5-14.9 cc.</p> <p>Pene: mayor crecimiento en longitud y diámetro.</p> <p>Vello púbico: tipo adulto, no cubre más allá de la superficie interna de los muslos.</p>
5	<p>Testículos: mayores de 15 cc.</p> <p>Vello púbico: tipo adulto en cantidad y tipo, distribución en triángulo inverso, cubre la cara interna de los muslos.</p>

METODOS

Para la determinación de las concentraciones hormonales basales, los reactivos fueron donados por el Programa Especial de Investigación, Desarrollo y Entrenamiento en Investigación en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ginebra, Suiza). Las concentraciones de LH y FSH, fueron determinadas mediante radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo y los resultados se encuentran expresados en mUI/ml de acuerdo con la 2ª preparación de referencia internacional (2º IRP-HMG). Los coeficientes de variación inter e intra análisis fueron de 11% y 6% para LH y de 10% y 7% para FSH respectivamente. Los coeficientes de variación inter e intra análisis para testosterona fueron menores al 7.0% y al 8.0 % mientras que para estradiol fueron menores al 7.0% y al 7.5%.

Cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se coagulase. Posteriormente, fueron centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 15 minutos. Con el fin de evaluar el patrón de distribución de las diversas isoformas de FSH, tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90 µg de GnRH, se constituyeron tres pozas por separado para cada sujeto, correspondientes a las dos horas basales (poza 1), las cuatro horas pos 10 µg de GnRH (poza 2), y las cuatro horas pos 90 µg de GnRH (poza 3). El suero resultante de cada poza se congeló a -20°C, hasta el día en que se llevó a cabo el análisis correspondiente. Cada una de las pozas fue transferida a bolsas de diálisis con una permeabilidad de 12,000-14,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA), dializándose 24 horas inicialmente con agua bidestilada desionizada y posteriormente con carbonato de amonio 0.01 M durante 24 horas más. Finalmente, cada una de las pozas fue liofilizada con el fin de ser resuspendida en el menor volumen posible para su separación por el cromatoenfoco (Figura 1).

PROTOCOLO DE ESTUDIO

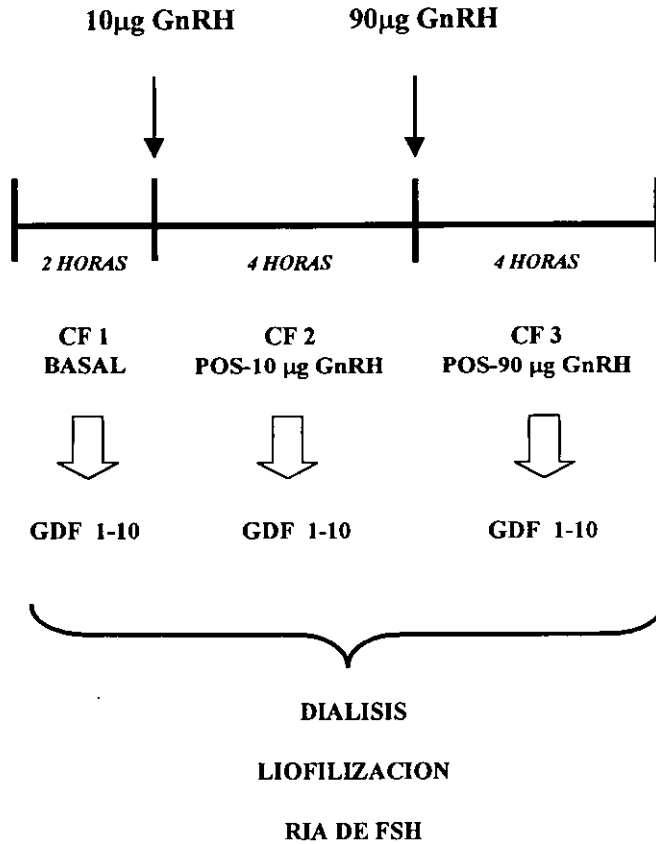


FIGURA 1: Protocolo experimental y procesamiento de las muestras llevado a cabo en 25 varones (5 en cada estadio de Tanner) normales.

CF: Cromatofoco

GDF: Grupo de Fracciones (condiciones experimentales)

Cromatofoco de FSH

El CF es un método mediante el cual las proteínas son separadas al interactuar la carga de superficie de la molécula con un soporte de carga inmovilizado. Las isoformas son recuperadas en el eluato cuando el pH del gradiente de elución iguala al punto isoelectrico (pI) de la proteína. El CF ofrece la ventaja adicional sobre los otros métodos, en que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo de pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y sometidas nuevamente al procedimiento a través de diferentes gradientes de pH (Ulloa-Aguirre *et al*, 1990a). En este estudio se utilizó un gradiente de pH de 7.5 a 3.0.

El CF de FSH se realizó de acuerdo al método descrito por Ulloa-Aguirre y *cols.*, (1990a,b) (Figura 2). Se empleó como intercambiador iónico la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en columnas de 20 x 1 cm, equilibradas con 15 volúmenes del amortiguador de partida (imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4). Cada una de las series de sueros liofilizados, fueron resuspendidas en el menor volumen posible (2.5-5.0 ml) del amortiguador Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:8 v/v) pH 2.98. Antes de depositar los extractos en la superficie de la columna se corrieron 4 ml del amortiguador de corrimiento, con el fin de evitar la exposición de la muestra a valores extremos de pH. Tanto el intercambiador iónico como los amortiguadores empleados en el CF, se degasificaron durante 30 minutos antes de su utilización, para así evitar que los iones de bicarbonato causasen fluctuaciones en el gradiente de pH.

La muestra fue depositada en la columna, y una vez completada su incorporación, se agregó el amortiguador de corrimiento (Polybuffer-74, pH=2.98). Posteriormente, se colectaron de 110 a 120 fracciones de 2 ml cada una a 4°C. El amortiguador de corrimiento fue sustituido por una solución de NaCl 1 M al detectar en alguna de las fracciones un valor de pH menor o

igual a 3.0. Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de recuperar el material que no eluyó dentro del rango de pH 7.4 a 3.0 (pico de sal). Hecho ésto, se colectaron 20 fracciones adicionales y se procedió a medir el pH de cada una de las mismas. Las fracciones se agruparon en intervalos de 0.5 unidades de pH [en total 10 grupos de fracciones (GDF)]: mayores de 7.0 (GDF 1), de 6.99 a 6.5 (GDF 2), de 6.49 a 6.0 (GDF 3), de 5.99 a 5.5 (GDF 4), de 5.49 a 5.0 (GDF 5), de 4.99 a 4.5 (GDF 6), de 4.49 a 4.0 (GDF 7), de 3.99 a 3.5 (GDF 8), de 3.49 a 3.0 (GDF 9) y el pico de sal (GDF 10), $\text{pH} < 3.0$. Cada uno de estos grupos, fue dializado por separado durante 48 horas a 4°C con agua bidestilada y desionizada y posteriormente, con una solución de carbonato de amonio 0.01M durante 24 horas más. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas para ser resuspendidas en el menor volumen posible de agua bidestilada desionizada y de esta forma determinar su concentración de FSH por medio del RIA.

RIA de FSH

El RIA para determinar las concentraciones de FSH en cada uno de los grupos de fracciones, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Ulloa-Aguirre *y cols.*, (1992a) (Figura 3). Los resultados fueron expresados en mUI/ml en relación con la segunda preparación de referencia internacional de FSH (2^o IRP-HMG). Con el fin de que no existieran variaciones interanálisis para un mismo sujeto, todas las muestras de un individuo se incluyeron en un mismo ensayo. Para analizar las variaciones interanálisis se utilizaron los mismos "pooles" de control de calidad en cada uno de los ensayos. Para determinar las variaciones intra análisis se utilizaron controles de calidad [Immunoassay Tri-level control, Lot. 012, Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, CA] al principio, a la mitad y al final de cada uno de los ensayos.

Se utilizaron reactivos donados por el National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and

Kidney Diseases (NIADDK, Bethesda, MD, EUA) utilizándose como estándar de FSH a la preparación LER-907 a concentraciones de 4.6 ng a 615.2 ng de FSH inmunoreactiva, diluída en amortiguador de fosfatos (PBS)-Gel. El anticuerpo policlonal fue el anti-hFSH-6 (dilución final 1:200,000) y como trazador se utilizó el estándar hFSH-1-3 radiomarcado con NaI^{125} (Amersham International Limited, Reino Unido) por el método de la Cloramina-T (Greenwood *et al*, 1963). El procedimiento del RIA consistió en agregar 100 μl de amortiguador PBS 0.05 M, gelatina 0.1%, pH de 7.4 (PBS-Gel), 100 μl de la muestra problema o de la dosis de la curva estándar, 100 μl de hFSH- I^{125} (15,000 cpm), 100 μl de anti-hFSH a una dilución de trabajo 1:100,000 (final 1:400,000) preparado en PBS 0.05 M, EDTA 0.05 M (PBS-EDTA) y suero normal de conejo (SNC) al 2%, pH 7.4. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Posteriormente se añadieron a cada tubo 100 μl del 2° anticuerpo (suero de carnero inmunizado con gamma globulina de conejo) a una dilución de 1:10 (con la finalidad de precipitar los complejos inmunológicos) y se incubaron por 18 a 24 horas más a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 2 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y se determinó la radioactividad unida al anticuerpo presente en los precipitados empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, II, EUA). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de recuperación de FSH total agregada al cromatofenque.

CROMATOENFOQUE DE FSH

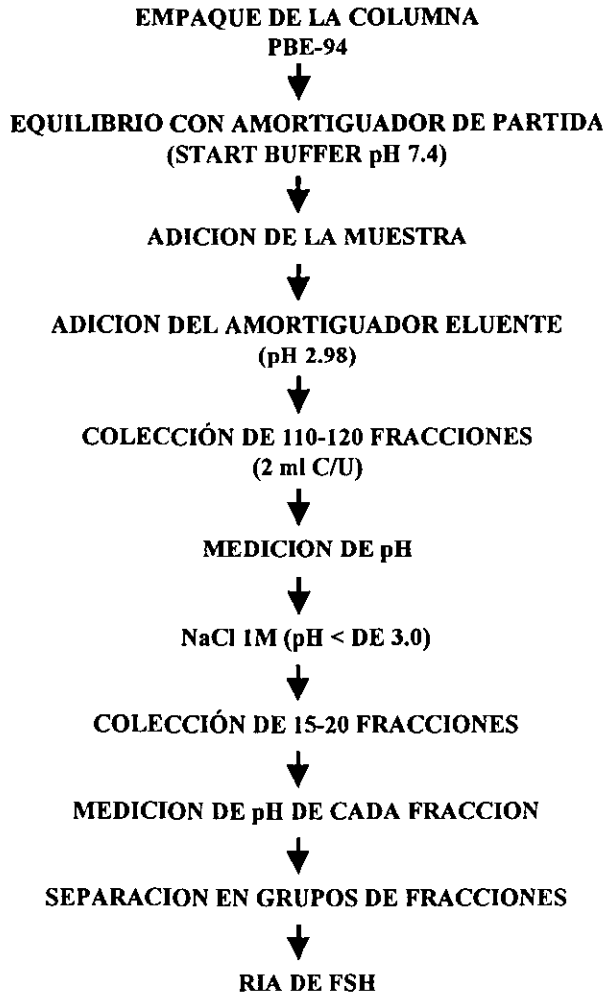


FIGURA 2: Técnica de cromatoenfoque seguida para la separación de las isoformas de las muestras problema.

RIA DE FSH

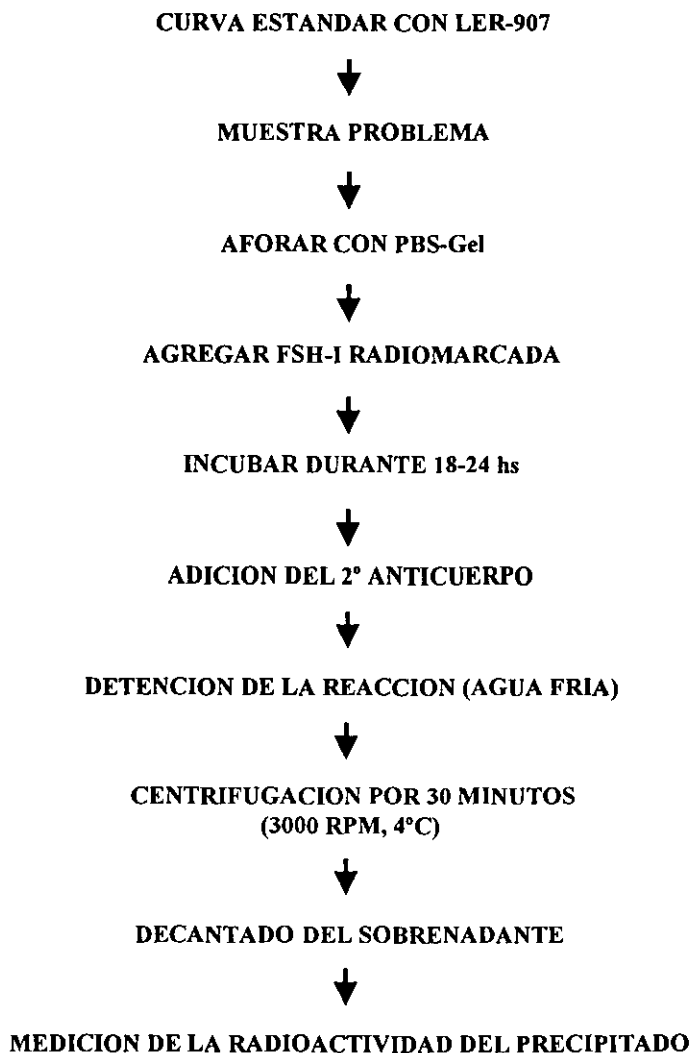


FIGURA 3: Técnica de radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de las isoformas de FSH luego de su separación por cromatoenfoque.

ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión paramétrica y no paramétrica según la distribución del grupo en estudio.

Asimismo, para valorar las diferencias entre los grupos tanto en condiciones basales como después del uso de 10 y 90 μg de GnRH se empleó prueba de t , o suma de rangos de Mann-Whitney así como prueba de rangos con signos de Wilcoxon, según fuese el resultado de la prueba de normalidad inicialmente aplicada.

Finalmente, para las comparaciones entre todos los grupos de estudio se utilizó análisis en varianza en rangos de una vía, de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

La exploración física de los sujetos estudiados siempre fue realizada por los mismos dos observadores entre los cuales existió concordancia, en todos los casos, en relación con el estadio de Marshall y Tanner al que pertenecía cada individuo. Las características clínicas más relevantes, así como la edad ósea de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio, se encuentran detalladas en la Tabla 2. En ninguno de los casos, se observó reacción adversa alguna a la GnRH durante la prueba de estimulación, ni tampoco ningún tipo de complicación durante el desarrollo del estudio. Todos los sujetos presentaron concentraciones basales de LH, FSH, testosterona y estradiol dentro de los límites establecidos como normales, de acuerdo con el estadio de Tanner en el que habían sido clasificados. Los valores de dichas determinaciones se encuentran detallados en la Tabla 3.

El análisis de las muestras de suero por CF demostró que todos los individuos estudiados, en las 3 condiciones experimentales (basal, pos 10 μg y pos 90 μg de GnRH), presentaron múltiples isoformas de FSH inmunorreactiva. Estas se encontraron en un intervalo de pH de 7.5-3.0, así como en aquellas fracciones recuperadas después de añadir 1.0 mol/L NaCl a las columnas de CF (pico de sal), con el propósito de obtener aquel material que no logró eluir dentro del intervalo de pH antes mencionado. Con el fin de cuantificar a las isoformas según su pH específico, se procedió a agruparlas por intervalos de pH de 0.5 [en total 10 condiciones experimentales (GDF)]. En todos los sujetos estudiados, así como en las diversas fases del estudio, las isoformas de la gonadotropina fueron recuperadas predominantemente en aquellos valores de pH que se encontraron por debajo de 4.5, incluyéndose el pico de sal. Más aún, el mayor porcentaje de isoformas recuperadas en los diferentes grupos de pacientes y en las 3 condiciones experimentales, se encontró agrupado en el intervalo de pH de los GDF 7 y 8 que corresponde a un intervalo de pH entre 4.49 y 3.5 (Figura 4).

Con el fin de evaluar las diferencias existentes en los patrones de distribución de las isoformas de FSH entre los diferentes grupos de sujetos, así como entre las diferentes fases del estudio experimental, cada patrón de CF fue dividido en dos regiones específicas de pH, considerándose el pH de 4.5 como el punto de corte específico para el valor de pH. Este punto de corte fue elegido con base en hallazgos previos en los cuales se había demostrado que las isoformas de FSH hipofisaria que poseen valores de pH por debajo de 4.5, presentan una vida media plasmática mayor, además de una potencia biológica *in vitro* menor que sus análogos menos ácidos (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a). Los cambios existentes en el patrón de distribución de las isoformas de FSH fueron expresados como el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de FSH con valores de pH de elución menores a 4.5, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores a 4.5.

Las comparaciones entre los diferentes grupos de sujetos estudiados demostraron que en condiciones basales, los sujetos que se encontraban en estadio 1, 4 y 5 de Tanner presentaron una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas que aquellos sujetos en estadios 2 y 3 de Tanner. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.016$) al comparar todos los grupos entre sí, excepto entre aquellos sujetos en estadio 2 de Tanner *versus* los sujetos en estadio 5 de Tanner (Tabla 4, Figura 4). La mayor proporción de las isoformas con $\text{pH} \geq 4.5$ se encontró en los individuos en estadio 5 de Tanner; de hecho, en el único caso en el que se encontró una proporción mayor al 5% en isoformas con un $\text{pH} \geq 4.5$ fue en el GDF 6 de los sujetos Tanner 5 ($p = 0.002$) (Figura 4). Al llevar a cabo la comparación entre grupos después del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH se pudo observar que los sujetos en estadio 1, 2 y 5 de Tanner presentaron una mayor abundancia de las isoformas menos ácidas, que aquellos individuos pertenecientes a los estadios 3 y 4 de Tanner. Esta misma diferencia en la distribución de las isoformas entre los diversos grupos

estudiados, fue observada después del estímulo con 90 μg de GnRH. Sin embargo, ni en la fase pos 10 μg , ni en la pos 90 μg de GnRH, se observó significancia estadística (Tabla 4, Figura 4).

Al aplicar el estímulo con 10 μg del decapeptido se observó, en los sujetos de todos los grupos (salvo en el Tanner 4), un incremento en el porcentaje de las formas menos ácidas, al hacerse la comparación con los porcentajes obtenidos en condiciones basales. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas en los sujetos Tanner 1 ($p = 0.001$) y Tanner 2 ($p < 0.001$). Posterior al estímulo con 90 μg de GnRH existieron pequeñas diferencias en la distribución de las isoformas más ácidas y menos ácidas, en relación con la distribución existente después del estímulo con 10 μg . Ninguna de estas diferencias (entre 10 y 90 μg de GnRH) fueron estadísticamente significativas (Tabla 4, Figura 4).

Los cambios en la distribución de las isoformas de FSH fueron expresados como el cociente de la cantidad de isoformas de FSH con valores de pH de elución menores a 4.5 entre aquellas con valores por arriba de dicho pH. Las comparaciones entre los diferentes estadios de Tanner en condiciones basales, demostraron un incremento de este índice entre los sujetos en estadio 2 en relación con aquellos que se encontraban en estadio 1, así como un decremento paulatino de dicho índice a partir del estadio 3. Luego del estímulo con 10 μg de GnRH se observó que este índice, en los estadios 1, 2 ó 3 de Tanner disminuía considerablemente en relación con lo encontrado en condiciones basales, mientras que en los estadios 4 y 5 de Tanner el índice se mantenía en valores similares. Posterior al estímulo con 90 μg de GnRH, el índice se mantuvo en valores similares a los encontrados después del estímulo con 10 μg (Figura 5).

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS

PACIENTE	EDAD (años)	E.O. (años)	TALLA (cm)	PESO (kg)	GONADA (izq-der) (ml)	PENE (cm)
Tanner 1						
1	11	11	135	32	3.2-3.2	4.5
2	9	9.5	134	27	2.8-2.3	4.7
3	8	8.5	133	29	2.3-2.3	5.7
4	9	9	135	35	4.0-3.5	5.5
5	10	9.5	130	36	3.2-3.5	4.3
Tanner 2						
1	10	10	139	35	4.5-4.7	5.0
2	13	13.0	148	41	8.5-8.5	5.5
3	11	10.5	141	34	5.2-6.3	5.5
4	10	10	140	33	6.3-6.3	5.0
5	12	11.5	139	38	8.5-8.5	5.7
Tanner 3						
1	12	12	146	43	9.5-9.5	4.5
2	13	12.5	151	44	9.5-9.5	6.5
3	13	13.5	152	47	11.0-11.0	7.0
4	12	13	153	44	9.5-9.5	6.8
5	13	13	154	45	9.5-9.5	4.2
Tanner 4						
1	15	15	161	51	14.0-14.0	8.2
2	16	16	157	48	11.5-14.0	8.0
3	13	14	155	49	12.0-14.0	9.1
4	14	14	160	52	12.0-12.0	10.3
5	12	13	160	54	12.0-12.0	6.6
Tanner 5						
1	24	>18	171	62	19.9-25.0	7.5
2	20	>18	173	63	25.0-25.0	8.5
3	26	>18	169	59	15.0-19.0	8.5
4	25	>18	176	70	19.7-22.9	8.7
5	21	>18	170	64	19.7-19.7	7.9

E.O: Edad Osea

TABLA 3

CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES

PACIENTE	LH * (mIU/ml)	FSH * (mIU/ml)	T (ng/ml)	E2 (pg/ml)
Tanner 1				
1	2.9	0.8	0.6	22.3
2	0.3	2.1	0.3	<13
3	0.1	1.7	0.1	23.9
4	0.3	2.4	0.4	32.4
5	0.1	0.3	0.3	<13
Media ± EE	0.74 (0.54)	1.46 (0.39)	0.34 (0.08)	20.92 (3.66)
Tanner 2				
1	1.7	0.5	0.7	38.7
2	2.7	1.1	2.1	15.5
3	0.9	2.5	1.1	19.5
4	2.5	0.6	3.8	29.4
5	2.2	0.7	1.5	23.5
Media ± EE	2.0 (0.32)	1.08 (0.36)	1.84 (0.54)	25.32 (4.05)
Tanner 3				
1	1.3	0.8	0.3	13.7
2	2.8	2.2	2.9	20.9
3	1.3	0.8	1.2	<13
4	4.5	5.0	4.5	50.7
5	3.5	2.8	3.0	19.5
Media ± EE	2.68 (0.62)	2.32 (0.77)	2.38 (0.73)	23.56 (6.96)
Tanner 4				
1	1.8	0.5	4.8	21.5
2	8.2	4.7	4.7	40.7
3	1.3	1.9	5.0	35.6
4	3.9	4.3	4.8	46.6
5	4.5	3.2	4.8	41.0
Media ± EE	3.94 (1.22)	2.92 (0.77)	4.82 (0.04)	37.08 (4.26)
Tanner 5				
1	8.3	1.8	7.5	52.2
2	2.9	1.1	4.0	55.0
3	4.2	1.6	6.3	58.8
4	2.6	1.9	4.6	<13
5	3.5	2.0	6.3	43.4
Media ± EE	4.3 (1.03)	1.68 (0.15)	5.74 (0.63)	44.48 (8.26)

Valores normales:

Prepuberal	<3.0	<0.5	<3.0	0-60
Pospuberal	3-12	0.5-5.0	3-10	0-60

* Media de dos muestras basales tomadas a intervalos de 15 minutos.

TABLA 4

**DISTRIBUCION DE LAS ISOFORMAS DE FSH
RECUPERADAS EN VALORES MAYORES Y MENORES DE 4.5
EN LOS 5 ESTADIOS DE TANNER**

ESTADIO DE TANNER	BASAL (%)		POS 10 µg GnRH (%)		POS 90 µg GnRH (%)	
	≥ 4.5	< 4.5	≥ 4.5	< 4.5	≥ 4.5	< 4.5
1	7.5	92.5	14.0	86.0	16.4	83.6
2	2.6	97.4	8.8	91.2	8.6	91.4
3	3.5	96.5	8.2	91.8	5.8	94.2
4	8.5	91.5	8.0	92.0	10.1	89.9
5	10.4	89.6	12.7	87.3	13.9	86.1

ISOFORMAS DE FSH EN LOS CINCO ESTADIOS DE TANNER

PORCENTAJE DE RECUPERACION

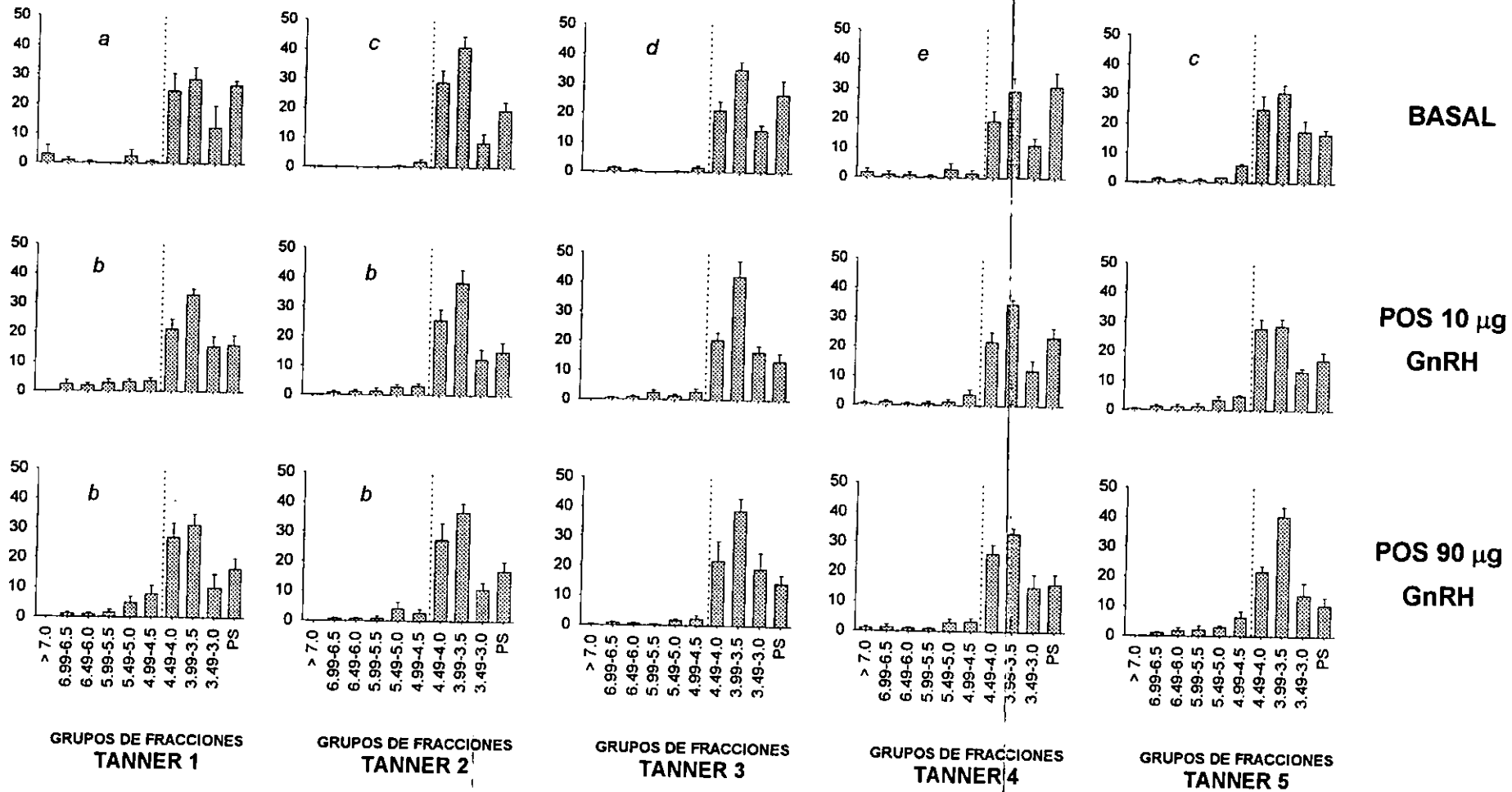


FIGURA 4: Distribución de las diversas isoformas de FSH ($\bar{X} \pm EE$) en 5 sujetos en cada uno de los estadios de Tanner, después de su separación por cromatofluoreografía. El panel superior demuestra la distribución de pH en aquellas muestras obtenidas en condiciones basales, el panel intermedio en las muestras obtenidas después del estímulo intravenoso con 10 µg de GnRH y el panel inferior en las muestras obtenidas después del estímulo con 90 µg de GnRH. La línea punteada separa a aquellas isoformas que eluyeron en un pH < 4.5 de aquellas que eluyeron en un pH > 4.5. Las letras distintas en una misma región de pH demuestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

INDICE DE ISOFORMAS DE FSH

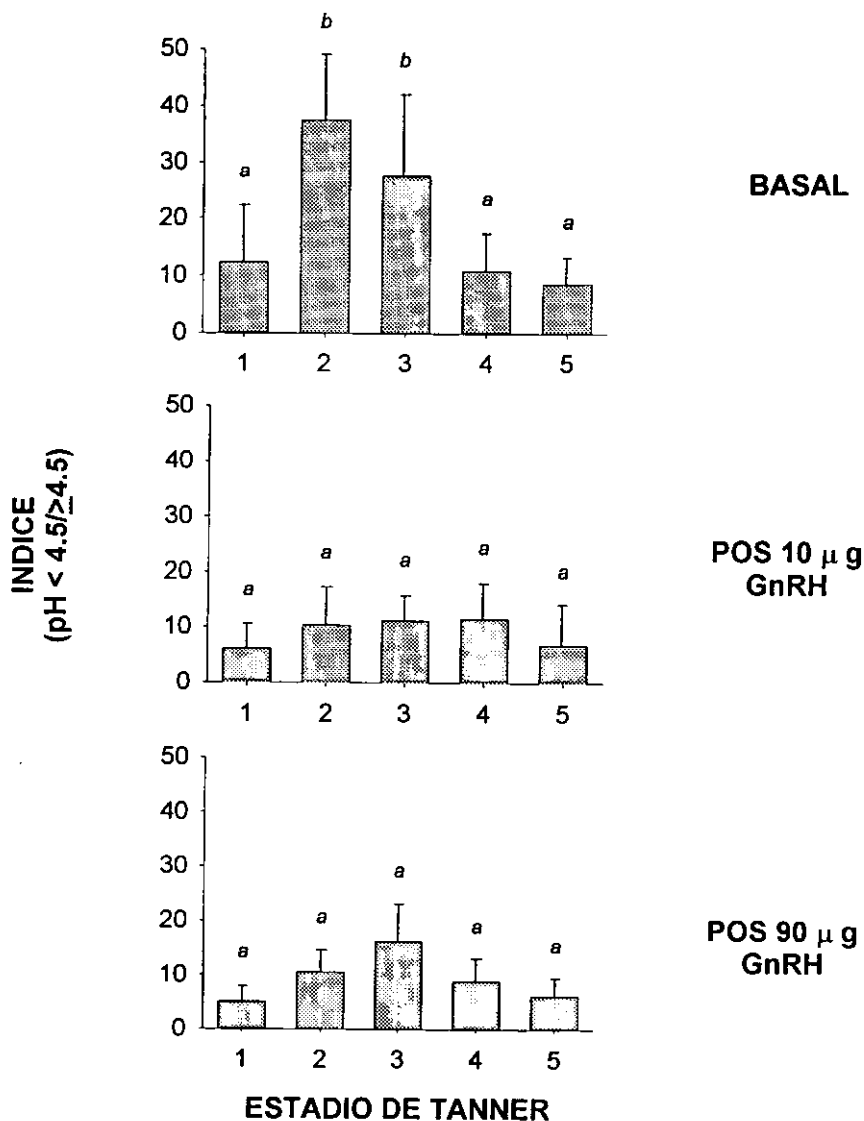


FIGURA 5: Índice de las isoformas de FSH con valores de pH < 4.5 entre aquellas con valores de pH ≥ 4.5. Las barras identificadas con distintas letras poseen diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

DISCUSION

Las concentraciones periféricas de ambas gonadotropinas se incrementan paulatinamente conforme avanza el desarrollo puberal a partir de valores sumamente bajos, característicos de la etapa prepuberal, hasta alcanzar concentraciones de adulto en las últimas etapas puberales. Diversos estudios han sugerido que además de los cambios cuantitativos, existen cambios cualitativos tanto de LH como de FSH a lo largo de la pubertad (Phillips y Wide, 1994; Phillips *et al*, 1997), ya que ha sido ampliamente demostrado que dichas glicoproteínas no son hormonas de estructura única sino que están constituidas por un grupo de isoformas. Cada isoforma posee características biológicas particulares como son su capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades *in vitro* e *in vivo*, características éstas que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas particulares (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). En humanos, se han llevado a cabo dos estudios en sujetos puberales, en los cuales se determinó la carga media de FSH (Phillips y Wide, 1994; Phillips *et al*, 1997); sin embargo, ambos estudios demuestran resultados parciales y poco generalizables debido a diseños experimentales limitados, además de que la metodología utilizada (electroforesis en columnas de agarosa al 0.1 %) fué de baja resolución y a que las determinaciones se realizaron por inmunofluoroensayo (IFMA), un método que puede subestimar a las isoformas menos sializadas (Observaciones no publicadas; Zambrano *et al*, 1996). Debido a esto, los resultados obtenidos solamente podrían demostrar fenómenos aislados, en cuanto a los cambios cualitativos de FSH, durante la pubertad.

En este trabajo hemos demostrado que la FSH en los varones y en todos los estadios puberales es altamente heterogénea y es liberada de la hipófisis como una mezcla de isómeros, ya que se observó la presencia de múltiples picos de FSH inmunorreactiva a lo largo de todo el intervalo de

pH estudiado. En los 5 grupos estudiados, así como en todas las fases del estudio, las isoformas séricas de la gonadotropina fueron predominantemente más ácidas (pH menor de 4.5). La predominancia de dichas isoformas en la circulación, también ha sido descrita en estudios realizados en humanos en la fase folicular y en la fase lútea del ciclo menstrual, (Zambrano *et al*, 1995), durante la menopausia (Wide y Hobson, 1983), así como en estudios en los cuales se ha manipulado experimentalmente el ambiente endócrino utilizándose agonistas de GnRH (Wide *et al*, 1996a) o el tratamiento con progestágenos (Wide *et al*, 1996b). Los hallazgos del presente trabajo demuestran que, independientemente de si el varón se encuentra en la fase prepuberal o ya es un adulto totalmente desarrollado, las isoformas más ácidas siempre predominarán, lo cual puede explicarse por la sobrevivencia selectiva en la circulación de las isoformas con mayor vida media (las más ácidas), así como por la producción y secreción disminuidas de las formas con menor vida media (las menos ácidas). (Wide, 1986; Wide y Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de que las formas más ácidas predominan en todas las condiciones, éstas lo hacen en menor proporción en los sujetos en estadio 5 que en aquellos en otros estadios de Tanner. Este hallazgo puede equipararse con lo encontrado en la mujer normal durante la fase periovulatoria (fase de mayor actividad hipotálamo-hipofisaria), ya que en dicha fase se secretan una mayor cantidad de formas moleculares menos ácidas en relación con las secretadas en las fases folicular y lútea, lo cual 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), a diferencia de la mayor abundancia de isoformas más ácidas durante la fase folicular temprana y la fase lútea, lo que podría relacionarse 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 FSH (Wide y Hobson, 1983; Padmanabhan *et al*, 1988; Zambrano *et al*, 1995).

En condiciones basales, los sujetos que se encontraban en los estadios 1, 4 y 5 de Tanner presentaron una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas en relación con los sujetos que se encontraban en estadio 2 ó 3 de Tanner, encontrándose diferencia significativa al comparar todos los grupos entre sí, salvo al hacer la comparación entre aquellos en estadio 2 *versus* los sujetos en estadio 5 (a pesar de que la diferencia numérica entre ambos estadios era la mayor, la no significancia entre estos dos grupos puede explicarse por la dispersión existente y el número de sujetos estudiados). Estos resultados contrastan con lo encontrado por Wide (1989) en donde la carga media de FSH hipofisaria en los prepúberes era más básica que aquellas encontradas en los adultos. Sin embargo, hay que considerar que estas diferencias pueden deberse a que en el trabajo previamente citado se estudió la carga media y a que se obtuvo una sola muestra. En el presente trabajo, la menor proporción de isoformas menos ácidas en aquellos sujetos en estadio 2 y 3, y el aumento en la proporción de las mismas en los estadios 4 y 5 de Tanner, pudiese deberse a los cambios en la síntesis de estos isómeros, promovida por el ambiente endocrinológico existente en las diferentes etapas del desarrollo puberal, ya que como se observa en la Tabla 3 las concentraciones de testosterona se incrementan paulatinamente a partir del estadio 2 de Tanner, lo que podría desviar la producción de las isoformas hacia las formas más ácidas, como se evidenció en lo encontrado en los estadios 2 y 3; sin embargo, el incremento progresivo en las concentraciones de estradiol así como en la exposición a GnRH, podría provocar que la proporción de las isoformas más sializadas disminuya y por ello en los estadios 4 y 5 de Tanner nuevamente predominen aparentemente las menos ácidas. Esta posibilidad concuerda con lo informado acerca de la actividad de algunas glicosiltransferasas, como las sialiltransferasas, N-acetilgalactosamina transferasa y galactosa-N-acetiltransferasa, las cuales pueden ser moduladas a nivel hipofisario por los estrógenos, lo que podría influir sobre el grado de sialización y sulfatación de las diferentes hormonas glicoproteicas (Smith y Baenzinger,

1988; Dharmesh y Baenzinger, 1993; Damián-Matsumura *et al.*, 1998).

Por otro lado, al igual que lo descrito por Phillips *y cols.*, (1997) la proporción relativa de las isoformas más ácidas es mayor en el estadio 2 que en el estadio 1 de Tanner. Sin embargo, estos autores encuentran que no existen cambios del estadio 3 en adelante, mientras que nuestro estudio revela que a partir del estadio 3 la proporción relativa de las isoformas más ácidas disminuye progresivamente, siendo incluso menor en los estadios 4 y 5 que en el estadio 1. Estas diferencias encontradas en condiciones basales son todavía más relevantes al observar los resultados expresados como el cociente entre las isoformas < 4.5 y ≥ 4.5 , ya que los sujetos en estadio 2 de Tanner presentan un índice 4.35 veces mayor que aquellos sujetos en estadio 5. Este índice disminuyó gradualmente a partir del estadio 2 hasta el estadio 5; sin embargo, los individuos en estadio 1 de Tanner presentaron un índice que se encontraba en valores entre aquellos individuos en estadio 3 y en estadio 4 de Tanner. En el único grupo de estudio en el que se encontró una proporción mayor al 5% en isoformas con un $\text{pH} \geq 4.5$ fue en el grupo de fracción 6 (pH 4.99-4.5) de los sujetos Tanner 5, lo que demuestra que el incremento en la proporción de las isoformas menos ácidas es un fenómeno relacionado con la maduración sexual.

En todos los grupos estudiados, los individuos presentaron variaciones en la proporción relativa de las isoformas mayores y menores a pH 4.5 después de los estímulos con GnRH. Luego del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH, en todos los grupos (salvo en el Tanner 4) aumentó la proporción de las isoformas menos ácidas, encontrándose cambios importantes en el índice $<4.5/ \geq 4.5$. Las proporciones relativas encontradas después del estímulo con $90 \mu\text{g}$ de GnRH fue similar a lo observado después del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH, incrementándose discretamente las isoformas mayores de 4.5 en aquellos individuos en estadio 1, 4 y 5, y disminuyendo en los individuos que se encontraban en etapas intermedias de la maduración. La respuesta al estímulo con GnRH concuerda

con diversos estudios llevados a cabo en modelos animales (Galle *et al*, 1983; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992c), así como en uno practicado en pacientes con hipogonadismo hipergonadotrópico (Wide y Albertsson-Wikland, 1990). Asimismo, estos hallazgos concuerdan con lo observado al estimular con GnRH a niños que se encontraban en la pubertad (Phillips y Wide, 1994). Al igual que lo observado al comparar a los diversos grupos estudiados en condiciones basales, podemos observar que luego del estímulo con 10 µg de GnRH, el incremento proporcional en la respuesta de los individuos en estadio 1 de Tanner se encuentra entre aquellos individuos en fases intermedias de la maduración sexual (estadios 2 y 3) y aquellos en las fases de mayor maduración (estadios 4 y 5). Los cambios observados en la distribución de las isoformas de FSH después de la estimulación con GnRH pudiesen deberse a cambios en la glicosilación inducida por GnRH, a la mayor detección de isoformas de vida media corta, a cambios en el ambiente esteroide o a una combinación de estos factores. Para interpretar estos resultados, hay que considerar que la administración del decapeptido, aún en dosis de 10 µg, constituye una prueba farmacológica y que los cambios observados no pueden ser totalmente extrapolables al considerar las condiciones fisiológicas existentes al inicio y durante la pubertad. La tendencia a sintetizar isoformas más básicas después de la administración de GnRH, puede ser debida a una secreción selectiva de dicho tipo de isoformas (Wide y Albertsson-Wikland, 1990; Zalesky y Grotjan, 1991) o a que determinadas isoformas poseen una sobrevida selectiva, ya que las isoformas más básicas de FSH tienen una vida media menor (Blum y Gupta, 1985; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992a; Wide, 1986). Consecuentemente, las isoformas menos ácidas encontradas en suero después del estímulo con GnRH representarían a las formas recientemente sintetizadas y la proporción de las mismas se vuelve más ácida cuando las isoformas menos ácidas desaparecen rápidamente de la circulación (Wide, 1986).

Todos estos hallazgos indican la existencia de diferencias en la síntesis y secreción de

isoformas observadas entre aquellos individuos que se encuentran en la fase de maduración sexual y aquellos que están por alcanzar o han alcanzado la maduración sexual completa. Parecería que la secreción de las isoformas más básicas en el adulto normal, es el resultado de una mayor síntesis de estos isómeros promovida por el ambiente endócrino existente en dicha fase del desarrollo.

Sumamente interesante es el hallazgo de que en todas las condiciones experimentales, los individuos en estadio 1 de Tanner presentan valores intermedios en relación con los dos grandes grupos (Tanner 2 y 3; Tanner 4 y 5) antes descritos. Hay que considerar que los niños en estadio 1 de Tanner se encontraban por iniciar la pubertad, ya que todos los sujetos pasaron a estadio 2 de Tanner antes de que se cumplieran 6 meses de haberse practicado el estudio. Es un hecho bien conocido que la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis a las bajas concentraciones de esteroides gonadales difiere durante la infancia en relación con lo observado en la pubertad y en la vida adulta, y la inmadurez en la síntesis o las bajas concentraciones de testosterona y estradiol pudiesen ser la explicación de la proporción de isoformas mayores de 4.5 observado en los sujetos en estadio 1 de Tanner (Sizonenko, 1978; Grumbach y Kaplan, 1990).

Las diferencias encontradas entre la proporción relativa de las isoformas de FSH en condiciones basales al compararse con lo encontrado después de los estímulos con 10 y 90 μg de GnRH en aquellos sujetos en estadio 1, 2 ó 3 de Tanner, pero no en los otros dos grupos, se podría explicar con base en que aquellos individuos que no han iniciado pubertad o se encuentran en las primeras fases de esta etapa, no tienen concentraciones suficientes de GnRH endógena, pero si responden de manera importante al estímulo farmacológico. Esto parecería indicar que conforme el estadio de Tanner en el que se encuentra cada individuo, lo que determina el incremento en las isoformas menos ácidas es la GnRH endógena y/o la sensibilidad que la hipófisis presenta a la misma, lo cual es altamente dependiente de los esteroides gonadales (Ulloa-Aguirre *et al*, 1992c).

Los mecanismos intrínsecos que regulan los cambios de las isoformas de FSH durante la pubertad en el humano no han sido bien definidos, y aunque nuestros resultados contribuyen a un mejor entendimiento de dichos mecanismos, no permiten aún definirlos con precisión. Las diferencias en carga observadas reflejan variaciones en el grado de sialización, y son significativas en lapsos cortos, lo que hace poco probable que los andrógenos o la inhibina sean los responsables de ello, debido a que estos factores reguladores se incrementan gradualmente a lo largo de todo el proceso puberal (Burger *et al*, 1988; Manasco *et al*, 1995; Yanovski y Cutler, 1995). Aún más, la castración de adultos no afecta a las isoformas de FSH (Wide, 1982) y la administración de testosterona no posee efectos en las isoformas en aquellos hombres con síndrome de Klinefelter (Harsch *et al*, 1993). Con base en estos trabajos, en los hallazgos de nuestro estudio y en el hecho de que el tratamiento con GnRH altera la glicosilación *in vitro* de la molécula de LH (Liu *et al*, 1976; Vogel *et al*, 1986; Ramey *et al*, 1987), podríamos postular, que de operar un mecanismo como este último en el caso de la FSH, existiría un efecto directo de la GnRH, modulado por los cambios en la concentración de estradiol circulante sobre la regulación de la microheterogeneidad.

En resumen, podemos concluir que con este trabajo hemos demostrado que existen variaciones en las isoformas de la FSH circulante a lo largo del proceso puberal; desde luego es deseable incrementar el tamaño de la muestra con el fin de poder confirmar las diferencias estadísticas existentes, lo cual permitirá definir con mayor precisión este delicado y fino proceso que controla las funciones reproductivas en el varón. Por último, hay que considerar que para atribuir un significado fisiológico a la regulación del pleomorfismo de FSH es necesario demostrar, como lo hemos hecho en este estudio, que las diversas isoformas son secretadas a la circulación y así alcanzan la célula blanco, y que la producción y secreción de las isoformas se encuentra hormonalmente regulada. Sin embargo, quedaría por demostrar en una etapa siguiente el que los cambios en la distribución de las

isoformas alteren la actividad biológica neta de la hormona y que por lo tanto tengan un impacto fisiológico en la maduración sexual del varón.

BIBLIOGRAFIA

Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 257:13306, 1982.

Baenzinger JU, Green DE. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of asparagine linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem Biophys Acta* 947:287, 1988.

Barracough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 3:91, 1982.

Beitins LZ, Dufau ML, O'Loughlin K, *et al.* Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone releasing (LHRH) in men. *J Clin Endocr Metab* 45:605, 1977.

Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102:1325, 1978.

Bishop LA, Nguyen TV, Schofield PR. Both of the β -subunit carbohydrate residues of follicle-stimulating hormone determine the metabolic clearance rate and in vivo potency. *Endocrinology* 136:2635, 1995.

Blum WFP, Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released *in vitro* and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol* 105:29, 1985.

Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, *et al.* A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 256:5121, 1981.

Boyar R, Finkelstein J, Roofwarg H, *et al.* Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med* 287:582, 1972.

Bremner WJ, Paulsen CA. Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: Evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocr Metab* 39:811, 1974.

Burger HG, McLachlan RI, Bangah M, *et al.* Serum inhibin concentration rise throughout normal male and female puberty. *J Clin Endocr Metab* 67:689, 1988.

Burr IM, Sizonenko PC, Kaplan SL. Hormonal changes in puberty. I. Correlation of serum luteinizing hormone and follicle stimulating hormone with stages of puberty, testicular size and bone age in normal boys. *Pediatr Res* 4:25, 1970.

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, *et al.* Interaction between prolactin and catecholamines on hypothalamic GnRH release in vitro. *J Endocrinol* 151:269, 1996.

Catt KJ, Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1:15, 1989.

Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2:186, 1981.

Conn MP. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: De Groot LJ, Besser GM, Cahill GF Jr, *et al.* (Eds). *Endocrinology*. Segunda edición. Philadelphia: WB Saunders, p.p.284, 1989.

Conn MP, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 324:93, 1991.

Conn MP, Janovick JA, Stanislaus D, *et al.* Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vit Hor* 50:151, 1995.

Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL. A diphasic pattern of gonadotropin secretion in patients with the syndrome of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocr Metab* 40:670, 1975.

Culler MD. Role of the Leydig cells and endogenous inhibin in regulating pulsatile gonadotropin secretion in the adult male rat. *Endocrinology* 127:2540, 1990.

Culler MD, Negro-Vilar A. 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, 1990.

Chappel SC. Heterogeneity of follicle-stimulating hormone: control and physiological function. *Hum Reprod Update* 1:479, 1995.

Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 4:179, 1983a.

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* 28:196, 1983b.

Dahl K, Bicsak TA, Hsueh AJW. Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with GnRH analog. *Science* 239:72, 1988.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, *et al.* The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125:917, 1989.

Damián-Matsumura P, Zaga V, Sánchez-Hernández C, *et al.* The changes in the α -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 th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA. Resumen OR-28.6. 1998.

Dharmesh SM, Baenzinger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferase that synthetize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11127, 1993.

Dunkel L, Alfthan H, Stenman U, *et al.* Pulsatile secretion of LH and FSH in prepubertal and early pubertal boys revealed by ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assays. *Pediatr Res* 27:215, 1990.

Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44:234, 1949.

Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet* 1:3, 1981.

Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Rec Prog Horm Res* 40:43, 1984.

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baensinger JU. 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, 1991.

Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol* 99:31, 1983.

Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, *et al.* 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, 1990.

Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J Clin Invest* 80:294, 1987.

Godine JE, Chin WW, Habener JF. 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, 1982.

Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* 7:679, 1988.

Grasso P, Deziel MR, Reichert LE. 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, 1995a.

Grasso P, Leng N, Reichert Jr LE. A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmatic 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, 1995b.

Green DE, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutotropin, follitropin and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 263:36, 1988.

Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation to ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114, 1963.

Grumbach MM, Kaplan SL. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenic perspective. En: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML, (Eds). *Control of the onset of puberty*. Baltimore. Williams and Wilkins. p.p.1, 1990.

Harsch IA, Simoni M, Nieschlag E. Molecular heterogeneity of serum follicle-stimulating hormone in hypogonadal patients before and during androgen replacement therapy and in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 39:173, 1993.

Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, *et al.* 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, 1997.

Hawes BE, Conn PM. Molecular mechanism of GnRH action: do G proteins and inositol phosphates have role?. En: Bouchard P, Caraty A, Coelingh Bennink HJT, Pavlou SN (Eds). GnRH, GnRH analogs, gonadotropins and gonadal peptides. Butler & Tanner, p.p. 63, 1993.

Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The receptor. *Endocr Rev* 9:379, 1988.

Kelton CA, Cheng SU, Nugent NP, *et al.* The cloning of the human follicle-stimulating hormone receptor and its expression in COS-7, CHO, and Y-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 89:141, 1992.

Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzma G. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 132:431, 1993.

Lacy PE, Klein JN, Fink JC. Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perfused rat islets. *Endocrinology* 92:1458, 1973.

Lalloz MRA, Detta A, Clayton RN. Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibit expression of the luteinizing hormone β -subunit gene "in vivo". *Endocrinology* 122:1689, 1988.

Laron Z, Arad J, Gurewitz R, *et al.* Age at first conscious ejaculation: a milestone in male puberty. *Helvet Paediatr Acta* 35:13, 1980.

Larrea F, Sandoval JL, Salinas E, *et al.* Evidence for an altered luteinizing hormone sensitivity to naloxone in pathological hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 43:591, 1995.

Laws SC, Webster JC, Miller WL. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology* 127:381, 1990.

Leong DA, Thorner MO. A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem* 266:9016, 1991.

- Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic GnRH on incorporation of radioactive glucosamine, and amino acids into LH and total protein by rat pituitaries "in vitro". *Endocrinology* 98:151, 1976.
- Manasco PK, Umbach DM, Muly SM, *et al.* Ontogeny of gonadotropin, testosterone, and inhibin secretion in normal boys through puberty based on overnight serial sampling. *J Clin Endocr Metab* 80:2046, 1995.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47:155, 1991.
- Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 315:1459, 1986.
- Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. En: Martin L, Ganong WF, (Eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, p.p. 239, 1988.
- Marshall WA, Tanner JM. Puberty. En: Flakner F, Tanner JM (Eds). *Human Growth*. New York: Plenum Press, p.p.117, 1986.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44:291, 1969.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13, 1970.
- Mason AJ, Berkemeir LM, Schmelzer CH, *et al.* Activin B: precursor sequence, genomic structure and "in vitro" activities. *Mol Endocrinol* 3:1352, 1989.
- Mason AJ, Hayflick JS, Ling S, *et al.* Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature* 318:659, 1985.
- Matera C, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Effect of chronic opioid antagonism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in hyperprolactinemic women. *J Clin Endocr Metab* 80:540, 1995.
- Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, *et al.* Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43:393, 1971.
- Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc* 104:432, 1960.

Means AR, Dodman JR, Tash JS, *et al.* Regulation of the testis Sertoli cell by follicle-stimulating hormone. *Annu Rev Physiol* 42:59, 1980.

Means AR, Fakunding JL, Huckins C, *et al.* Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 32:477, 1976.

Meunier H, Rivier C, Evans RM, Vale W. 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, 1988.

Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1244, 1994.

Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, *et al.* Cloning and sequencing of the human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 175:1125, 1991.

Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 100:81, 1994.

Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, *et al.* The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem* 246:1461, 1971.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, *et al.* Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocr Metab* 67:465, 1988.

Padmanabhan V, Micher D, Borondy M, *et al.* Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 131:213, 1992.

Parra A, Ramos-Galván C. La influencia de la privación psicosocial y la composición corporal sobre las gonadotropinas plasmáticas en niños y adolescentes. *Gaceta Médica de México* 128:7, 1992.

Petraglia F, Sawcheko P, Lim AT, *et al.* Localization, secretion and action of inhibin in human placenta. *Science* 237:187, 1987.

- Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocr Metab* 82:3103, 1997.
- Phillips DJ, Wide L. Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocr Metab* 79:814, 1994.
- Ramey JW, Highsmith RF, Wilfing WW, *et al.* The effects of gonadotrophin-releasing hormone, and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultures rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1503, 1987.
- Rebar R, Yen SSC, Vandenberg G, *et al.* Gonadotropin responses to synthetic LRF: dose-response relationship in men. *J Clin Endocr Metab* 36:10, 1973.
- Retter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 44:595, 1982.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev* 15:725, 1994.
- Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234:645, 1986.
- Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* 3:1915, 1989.
- Sardanons ML, Solano AR, Podesta EJ. Gonadotropin-releasing hormone action upon luteinizing hormone activity in pituitary gland: role of sulfation. *J Biol Chem* 262:11149, 1987.
- Sawchenko PE, Plotsky PM, Pfeoffer SW, *et al.* Inhibin beta neural pathways involved in the control of oxytocin secretion. *Nature* 334:615, 1988.
- Schally A, Arimura A, Baba Y, *et al.* Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334, 1971.
- Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, *et al.* Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol* 3:651, 1989.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739, 1997.

Sizonenko PC. Endocrinology in preadolescents. I. Hormonal changes during normal puberty. *Am J Dis Child* 132:704, 1978.

Smith PL, Baenzinger JU. A pituitary N-Acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones. *Science* 242:930, 1988.

Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, *et al.* Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 254:E658, 1988.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 125:133, 1996.

Stanton PG, Robertson DM, Burgon PG, *et al.* Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology* 130:2820, 1992.

Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, *et al.* 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, 1993.

Tay CC, Glasier AF, McNeilly AS. Effect of antagonists of dopamine and opiates on the basal and GnRH induced secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin during lactational amenorrhea in breast feeding women. *Hum Reprod* 8:532, 1993.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Ulloa-Aguirre A, *et al.* 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, 1998a.

Timossi CM, Damián-Matsumura P, Dominguez-Gonzalez A, Ulloa-Aguirre A. 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, 1998b.

Tsatsoulis A, Shalet SM, Robertson WR. Bioactive gonadotrophin secretion in man. *Clin Endocrinol* 35:193, 1991.

Turgeon JL, Waring DW. Differential changes in the rate and pattern of follicle-stimulating hormone secretion from pituitaries of cyclic rats superfused in vitro. *Endocrinology* 111:66, 1982.

Ulloa-Aguirre A, Conn MP. G-protein-coupled receptors and the G protein family. En: Conn, P.M. (Ed), *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, Oxford University Press, New York, p.p. 81, 1998.

Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol* 95:257, 1982.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matzumura P, *et al.* Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle stimulating hormone. *Human Reprod* 7:23, 1992a.

Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Espinoza R, *et al.* Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol* 126:323, 1990a.

Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, *et al.* Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum Reprod* 7:1371, 1992b.

Ulloa-Aguirre A, Diaz-Cueto L, Méndez JP. La pubertad. *Antología de la sexualidad humana. II.* En: Pérez Fernández C y Rubio Auriolés E, (Eds). Miguel Angel Porrúa. México D.F, p.p.515, 1994.

Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Cravioto A, *et al.* Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod* 5:661, 1990b.

Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Diaz-Sánchez V, *et al.* Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endocr Metab* 61:926, 1985.

Ulloa Aguirre A, Méndez JP, González A, *et al.* Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 29:17, 1988.

Ulloa-Aguirre A, Midgley R, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 16:1, 1995a.

Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, *et al*. Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol* 134:97, 1992c.

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

Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Timossi C, *et al*. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res* 26 Supl:219, 1995b.

Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V, *et al*. Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in humans. *J Androl* 12:27, 1991.

Vaitukaitis JL, Ross GT. Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J Clin Endocr Metab* 33:308, 1971.

Van Vliet G. Clinical aspects of normal pubertal development. *Horm Res* 36:93, 1991.

Veldhuis JD: Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En: Yen SSC, Jaffe RB (Eds): *Reproductive Endocrinology*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders.p.p.409, 1991.

Vogel DL, Magner JA, Sherms RJ, *et al*. Biosynthesis, glycosylation, and secretion of rat luteinizing hormone alpha and beta-subunits: differential effects of orchietomy and GnRH. *Endocrinology* 119:202, 1986.

Wang CF, Lasley BL, Yen SSC. Gonadotropin secretion in response to low and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (Functional disparity of the gonadotrophs). *J Clin Endocr Metab* 42:427, 1976.

Wheeler MD. Physical changes of puberty. *Endoc Metab Clin North America* 20:1, 1991.

Wide L, Albertsson-Wikland K. Change in in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocr Metab* 70:271, 1990.

Wide L, Albertsson-Wikland K, Phillips DJ. More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. *J Clin Endocr Metab* 81:216, 1996a.

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

Wide L, Hobson BM. 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, 1986.

Wide L, Hobson BM. Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in the pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. *J Clin Endocr Metab* 56:371, 1983.

Wide L. Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocr Metab* 55:682, 1982.

Wide L, Naessén T, Eriksson K, Rune C. Time-related effects of a progestogen on the isoforms of serum gonadotrophins in 17 β -oestradiol treated pos-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:651, 1996b.

Wide L. 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, 1986.

Winters SJ, Ishizaka K, Kithahara S, *et al.* Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130:726, 1992.

Winters SJ, Janick JJ, Loriaux DL, Sherins RJ. 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 Endocr Metab* 48:222, 1979.

Winters SJ, Troen P. Evidence for the role of endogenous estrogen in hypothalamic control of gonadotropin secretion in men. *J Clin Endocr Metab* 61:842, 1985.

Wu FC, Butler GE, Kelnar CJ, Sellar RE. Patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion before and during the onset of puberty in boys: a study using an immunoradiometric assay. *J Clin Endocr Metab* 70:629, 1990.

Wu FC, Butler GE, Kelnar CJ, *et al.* Patterns of pulsatile luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in prepubertal (midchildhood) boys and girls and patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome): a study using an ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay. *J Clin Endocr Metab* 72:1229, 1991.

Yang WH, Papkoff H. Effect of desyalilation 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, 1973.

Yanovski JA, Cutler Jr GB. The reproductive axis: pubertal activation. En: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, (Eds). *Reproductive endocrinology, surgery, and technology*. Lippincott-Raven; Philadelphia: Vol. 1, p.p.75, 1995.

Ying SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating secretion of FSH. *Endoc Rev* 9:267, 1988.

Zalesky DD, Grotjan HE. Comparison of intracellular and secreted isoforms of bovine and ovine luteinizing hormone. *Biol Reprod* 44:1016, 1991.

Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cardenas 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* 2:563, 1996.

Zambrano E, Olivares A, Méndez JP, *et al*. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 80:1647, 1995.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA