

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS SOBRE LA POTENCIA BIOLÓGICA IN VITRO DE  
LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO HUMANA  
CIRCULANTE, CAMBIOS DURANTE EL CICLO MENSTRUAL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A :

**BIOL. TERESA DE JESUS ZARIÑAN GARCIA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO ULLOA AGUIRRE

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MEXICO

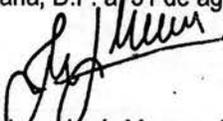
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de mayo del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Teresa de Jesús Zariñán García**, con número de cuenta 87157637 y número de expediente 3991114 con la tesis titulada: "Estudios sobre la potencia biológica *In Vitro* de la hormona estimulante del folículo humana circulante. Cambios durante el ciclo menstrual", bajo la dirección del(a) **Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre**

Presidente: Dr. Roberto Domínguez Casalá  
Vocal: Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales  
Secretario: Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre  
Suplente: M. en C. Juan Pablo Méndez Blanco  
Suplente: Dra. Cristina Aleida Olivares Segura

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 31 de agosto del 2004

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Teresa de Jesús Zariñán García  
FECHA: 21-OCT-04  
FIRMA: Zariñán

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi tutor el Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, por darme la oportunidad de superarme, por sus enseñanzas y por haber confiado en mí.
- ❖ A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Roberto Domínguez Casalá, así como al M en C. Juan Pablo Méndez Blanco, por su valiosa asesoría y sus comentarios siempre acertados.
- ❖ A las Doctoras Marcela Aguilar y Aleida Olivares por sus acertadas aportaciones para pulir mi trabajo de tesis.
- ❖ A mis amigos de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Gineco-Obstetricia no. 4 "Luis Castelazo Ayala", I.M.S.S.
- ❖ Al Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.) por la beca otorgada para la realización de la Maestría.

## DEDICATORIA

A mis padres, porque no tendré nunca con que agradecerles su apoyo durante estos últimos años, por el amor que le tienen a mi hija.

A mis hermanas y a mi hermano, así como a mis sobrinos porque siempre he sabido que puedo contar con ustedes en cualquier situación por mala que parezca.

A Cocotzin, Jorgelina, Aleida, Rocío, Rubén, José Manuel y Elena, porque cada uno de ustedes me ha enseñado que la investigación es muy difícil, pero que también es hermosa.

Pero sobre todo por aceptarme como soy.

A mi pequeña Pau, porque desde el momento que supe de tu existencia te convertiste en mi fuente de inspiración; porque eres lo más hermoso que me ha dado la vida; porque me has enseñado que la soy capaz de amar sin esperar nada a cambio; porque hace muy poco tiempo comenzaste una nueva etapa en tu pequeño mundo, y con esta tesis yo termino una etapa importante de mi vida, y porque sé que tal vez muy pronto iniciemos una nueva etapa juntas...  
Pero sobre todo mamacita porque TE AMO MUCHISIMO.

A DIOS, porque me permitió dar vida a un nuevo ser.

# INDICE

## INTRODUCCION

Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH)	1
Sistema generador de pulsos de GnRH	2
Estructura de la hormona folículo estimulante (FSH)	5
Regulación de la síntesis y secreción de la FSH	8
Secreción bifásica de gonadotropinas	2
Funciones de la FSH	13
Actividad Biológica <i>in vitro</i>	17

<b>OBJETIVOS</b>	22
------------------	----

<b>HIPOTESIS</b>	22
------------------	----

## SUJETOS Y METODOS

Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación	23
Obtención de las muestras	24
Métodos	24
Radioinmunoanálisis de FSH	25
Bioensayo <i>in vitro</i>	26
Radioinmunoanálisis de AMPc	28

<b>ANALISIS ESTADISTICO</b>	28
-----------------------------	----

## RESULTADOS

Respuesta de FSH al estímulos con GnRH	29
Cociente B/I de la FSH circulante	34

<b>DISCUSION</b>	39
------------------	----

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	46
---------------------	----

## RESUMEN

La FSH es la hormona responsable de la regulación de procesos relacionados con el desarrollo de las células germinales en las gónadas; promueve principalmente la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa del folículo ovárico. La FSH induce la expresión del gene que codifica para la P450aromatasa (P450<sub>AROM</sub>) lo cual da como resultado la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos producidos en las células de la teca interna por el estímulo de la LH, participa en la maduración del ovocito y de forma secundaria en la ovulación.

Para el análisis de la potencia de diferentes hormonas en bioensayos *in vitro* se considera habitualmente su actividad biológica y su inmunorreactividad; comparando estos parámetros se obtiene el cociente bioactividad/inmunorreactividad (B/I), la acción biológica de las hormonas no está necesariamente determinada por los niveles inmunorreactivos de las mismas, sino por la actividad biológica específica que tenga cada una de ellas. La determinación de la actividad biológica de una hormona es la que indica con mayor exactitud las acciones *in vivo* que tendrá dicha hormona.

Los carbohidratos incorporados en la molécula de las gonadotropinas son determinantes para su actividad biológica, ya que estas gonadotropinas son sintetizadas y secretadas en diferentes variantes moleculares. Estudios en el humano han demostrado que la FSH es secretada en diferentes formas moleculares durante el ciclo menstrual. Durante las fases folicular temprana y lútea del ciclo, predominan las formas altamente sializadas, de vida media circulante prolongada; durante la fase preovulatoria las formas menos sializadas se incrementan de manera significativa observándose simultáneamente una disminución en la vida media circulante de la hormona secretada en respuesta a la GnRH. Estos cambios en glicosilación sugieren que la actividad biológica de la hormona debe variar a lo largo del ciclo. El propósito de la presente tesis es explorar de una forma más detallada esta posibilidad. Para ello, se diseñó un modelo de estudio que explorará las características biológicas de la hormona secretada en condiciones basales así como después de estímulos provocadores de la secreción.

Se incluyeron 7 mujeres sanas y se estudiaron durante la fase folicular temprana (día -15 a -10), fase preovulatoria (día -3 a 0) y fase lútea (día +7 a +10), considerando como día 0 el día probable de ovulación. En cada fase del ciclo se realizó el protocolo de estudio que a continuación se describe: a cada voluntaria se le extrajo 1.5 ml de sangre cada 10 min durante 2 h en forma basal, seguido de la administración (i.v.) de 10µg de GnRH sintética, para inducir la secreción de la hormona madura y se extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 4 h. Inmediatamente después, se administraron 90 µg de GnRH para inducir la síntesis y secreción de nueva hormona y se efectuó el muestreo antes descrito por 4 h más. La actividad inmunológica de la FSH se determinó en las 61 muestras obtenidas en cada fase del ciclo, mediante un Radioinmunoanálisis (RIA); para la determinación de la actividad biológica *in vitro* se constituyeron 5 pozas para cada voluntaria en cada fase del ciclo (poza 1: 2 h basales; poza 2: primeras 2 h pos 10µg; poza 3: siguientes 2 h pos 10µg; poza 4: primeras 2 h pos 90µg y poza 5: últimas 2 h pos 90 µg de GnRH). Cada una de estas pozas fue analizada mediante un bioensayo que cuantifica la producción de AMPc en células HEK-293 derivadas de riñón fetal humano, transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para la FSH humana.

La determinación de la actividad inmunológica demostró que en condiciones basales, la cantidad de FSH secretada en la fase preovulatoria es mayor comparada con la fase folicular temprana y lútea del ciclo, asimismo durante las fases preovulatoria y lútea del ciclo, la administración de 90µg de GnRH provocó una respuesta significativamente mayor que cuando se administraron 10µg de GnRH. Por otro lado la actividad biológica representado por el cociente B/I en todas las condiciones estudiadas (basal, post 10µg y post 90µg de GnRH), fue significativamente mayor durante la fase lútea del ciclo comparado con la fase folicular temprana y la fase preovulatoria. Este hallazgo concuerda con los resultados de un estudio previo, en el cual los cocientes B/I elevados de la FSH fueron detectados durante la fase lútea media y tardía de mujeres con ciclos normales. Estos resultados sugieren que durante la fase lútea media se secretan moléculas de FSH que poseen una capacidad mayor para desencadenar la transducción de señal a nivel del receptor de FSH humano, esto podría representar un mecanismo a través del cual la hipófisis puede regular la maduración del conjunto de folículos destinados a ovular durante el siguiente ciclo.

## Abstract

The Follicle-Stimulating Hormone (FSH) is responsible of the processes related with the development of the germ cells in the gonads, it promotes the proliferation and differentiation of granulosa cells of the ovarian follicle mainly. The FSH induces the gene expression that codes for the P450arom (P450arom) which gives as a result the synthesis of the estrogens starting from androgens produced in the internal theca cells for the LH stimulus like result; it also participates in the oocyte maturation and of secondary form in the ovulation.

In the present study the immunological and biological activity *in vitro* of the human FSH were determined.

Seven healthy females were included and studied during the early follicular phase (days 15 to 10), preovulatory phase (days -3 to 0) and luteal phase (days +7 to +10), considering as reference point day 0 the probable day of ovulation. In each phase of the cycle was performed the following protocol of study: 1.5 ml of blood were obtained from each volunteer every 10 minutes for 2 hours in baseline form, the successive 10 µg synthetic GnRH administration (i.v. ) provokes the secretion of the mature hormone as well as 1.5 ml of blood were obtained every 10 minutes for 4 hours. Immediately later, they were administered 90 µg of GnRH in order to induce the secretion of the hormone newly synthesized in addition it was performed the sampling as previously described for 4 hours more. The immunological activity of the FSH was determined in the 61 samples obtained in each phase of the cycle employing a radioimmunoassay (RIA); to determine the *in vitro* biological activity was constituted 5 pools for each volunteer in each phase of the cycle (pool 1: 2 h at baseline, pool 2: first 2 hours after 10 µg; pool 3: next 2 hours after 10 µg; pool 4: first 2 hours after 90 µg; and pool 5: last 2 hours after 90µg GnRH administration). Each one of the pools was analyzed employing a bioassay that quantifies the production of cAMP in human embryonic kidney-derived HEK-293 cells, transfected with the of the human recombinant FSH receptor cDNA.

At the baseline, the immunological activity determination demonstrated that the amount of secreted FSH in the preovulatory phase is larger than in the early follicular and luteal phases of the cycle, the 90 µg GnRH administration produced a response significantly larger than the 10 µg GnRH administration. On the other hand, the biological activity represented by the B / I ratio in all the studied conditions (at baseline, after 10 µg and 90 µg GnRH administration ), was significantly higher during the luteal phase of the cycle than during the early follicular and preovulatory phase. This finding is in agreement with the results of a previous study, in which the high B / I FSH ratios were detected during mid and late luteal phases of women with normal cycles. These results suggest that during the mid-luteal phase the secreted FSH molecules contain a greater capability in order to evoke the signal transduction at the human FSH receptor level, this could represent a mechanism through which the pituitary could regulate the maturation of the group of follicles destined to ovulate during the coming menstrual cycle.

# INTRODUCCION

Una de las características de los seres vivos es su capacidad para reproducirse. En los mamíferos, la reproducción comprende una serie de mecanismos complejos en los que están relacionados dos sistemas: el nervioso y el endócrino, cada uno con funciones específicas. Un órgano neuroendócrino que juega un papel muy importante en la regulación del fenómeno reproductivo, es el hipotálamo, el cual sintetiza y secreta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)<sub>(Conn y Crowley, 1991)</sub>. Una vez que esta hormona alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportada hacia la hipófisis anterior en donde estimula la síntesis y secreción de las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)<sub>(Pierce y Parson, 1981)</sub>.

## Hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

El factor hipotalámico que controla la secreción de las gonadotropinas hipofisiarias es el GnRH, el cual es un decapeptido que tiene una vida media corta, entre 2 y 4 minutos<sub>(Conn y Crowley, 1991)</sub>. El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en neuronas especializadas localizadas en el hipotálamo anterior y basal<sub>(Marshall et al., 1988)</sub> y es secretado en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar que rodea a la eminencia media; una vez que alcanza la circulación del sistema porta-hipofisiario es transportada hacia la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH por el gonadotropo<sub>(Gharib et al., 1990)</sub>.

La acción de la GnRH en la hipófisis anterior se inicia con la unión de la hormona a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. El receptor de la GnRH pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y la unión de la GnRH a su receptor estimula la activación de las proteínas Gq/11, las cuales activan a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) lo

que provoca la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y la consecuente formación del segundo mensajero, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>); éste difunde a través del citoplasma induciendo el incremento en la concentración de calcio intracelular y promoviendo de esta forma la secreción de las gonadotropinas (Hawes y Conn, 1993). Otro segundo mensajero, el diacilglicerol (DAG), activa a la enzima cinasa C de proteínas (PKC), lo que inicia una cascada de eventos de fosforilación de proteínas (Figura 1) (Hawes *et al.*, 1994).

### **Sistema generador de pulsos de GnRH**

La secreción e interacción del GnRH con su receptor ocurre de manera pulsátil e intermitente gracias a la actividad de un sistema oscilador o generador de pulsos localizado en el hipotálamo basomedial (Knobil, 1990; Ördög y Knobil, 1995; Hall *et al.*, 1992). Aparentemente, el sistema generador de los pulsos espontáneos del GnRH está constituido por las mismas neuronas que sintetizan el decapeptido. Desde el punto de vista funcional, esta intermitencia en la liberación del GnRH de las terminales nerviosas de la eminencia media hacia los capilares portales es sumamente importante, ya que por un lado evita la desensibilización o refractariedad en la respuesta del gonadotropo provocada por la exposición continua al decapeptido y por el otro permite que la magnitud de la síntesis y secreción de la LH y FSH provocada por la exposición al GnRH ocurra de manera diferencial, dependiendo de los cambios en la frecuencia de los pulsos del péptido liberador (Moenter, *et al.*, 1992).

La disminución en la frecuencia fisiológica (un pulso aproximadamente cada 60 a 90 minutos) de los pulsos del GnRH incrementa las concentraciones circulantes de FSH y disminuye las de LH (Fillicori *et al.*, 1986). La síntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) también es regulada por la frecuencia del estímulo pulsátil del GnRH. En general, la síntesis del ARNm de la subunidad- $\alpha$  es estimulada por pulsos de frecuencia alta o media, en tanto que el de la subunidad- $\beta$  (LH $\beta$ ) es favorecido por pulsos de frecuencia intermedia; el ARNm de FSH $\beta$  y el del receptor del GnRH se incrementan con la exposición a pulsos de baja frecuencia. La actividad del sistema generador de pulsos es regulada por

**Falta página**

**N°** 3

varios factores, incluyendo los esteroides gonadales y algunos neurotransmisores (Barraclough y Wise, 1982). Aparentemente, la norepinefrina estimula y la dopamina y los opioides, como la  $\beta$ -endorfina, inhiben la actividad del sistema (Genazzani *et al.*, 1993). La inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal de la rata desencadena la liberación de GnRH y consecuentemente de LH y FSH, mientras que los bloqueadores alfa adrenérgicos previenen la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y pueden alterar la ovulación en las mujeres. Por otro lado, la administración de naloxona (antagonista opioide) induce la ovulación en pacientes con diagnóstico de hiperprolactinemia, amenorrea o anorexia nervosa (Cook *et al.*, 1991; Matera *et al.*, 1995). Los esteroides gonadales (estradiol y progesterona) regulan la secreción de las gonadotropinas actuando directamente en la hipófisis y posiblemente también en el hipotálamo (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).

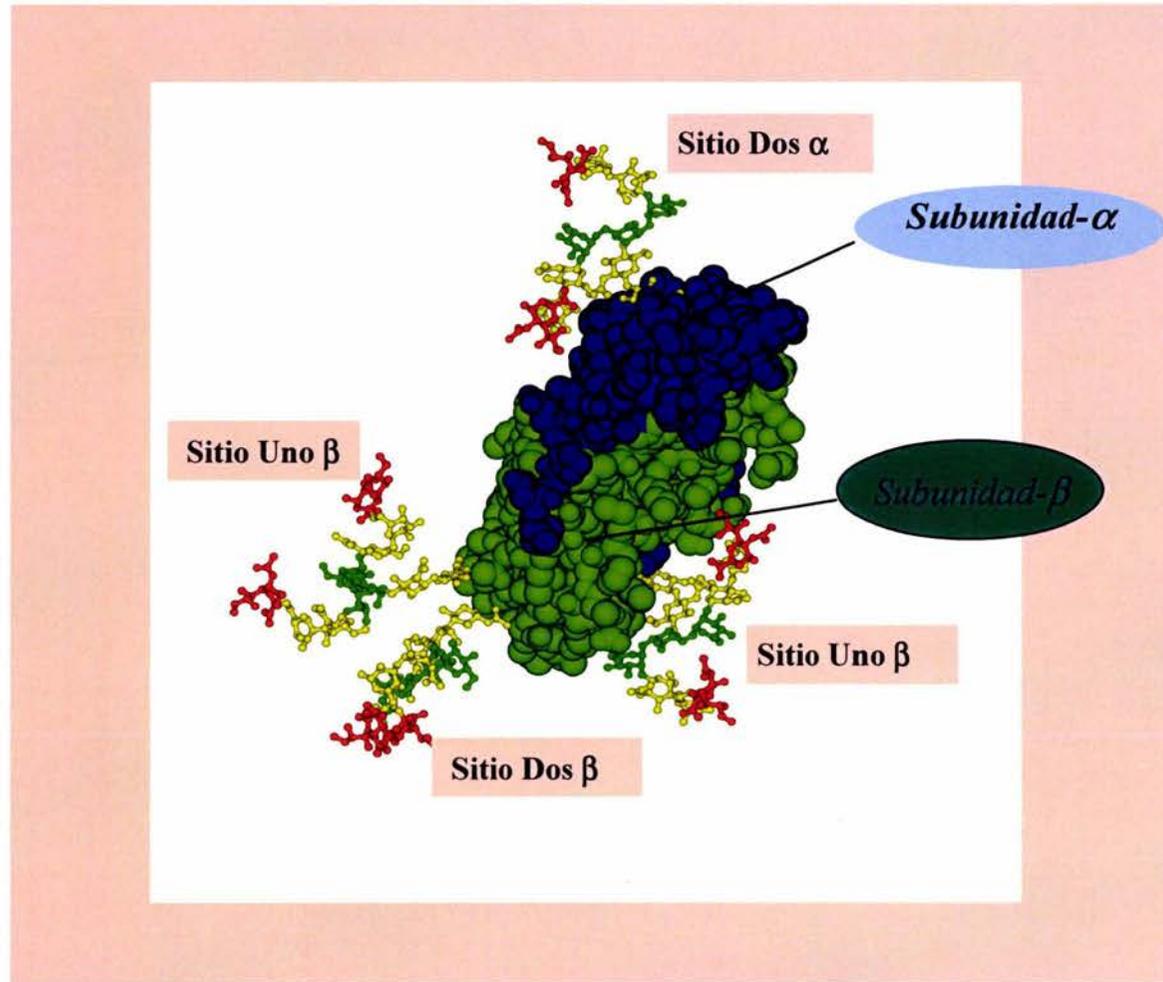
El análisis de las características en la secreción pulsátil del GnRH durante el ciclo menstrual ha mostrado la ocurrencia de variaciones importantes en la frecuencia de los pulsos de secreción del decapeptido; la fase folicular del ciclo se caracteriza por pulsos de alta frecuencia, la cual disminuye progresivamente durante la fase lútea. Durante el ciclo menstrual, la secreción de LH (y de FSH) muestra variaciones importantes en la frecuencia y amplitud; desde pulsos de LH de alta frecuencia y baja amplitud en la fase folicular temprana hasta pulsos de muy baja frecuencia con amplitudes alternantes bajas y altas en la fase lútea (Filicori *et al.*, 1986). A la mitad del ciclo ha sido posible detectar la ocurrencia de pulsos de alta amplitud, sin alteraciones importantes en la frecuencia. El aumento en la amplitud de los pulsos de la LH en esta fase del ciclo es provocado principalmente por el efecto de los estrógenos en el gonadotropo, cuya síntesis y secreción se incrementa progresivamente durante la fase folicular (Filicori *et al.*, 2001; Marshall, 1991).

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, por ejemplo durante la fase preovulatoria, exista una respuesta mayor de la glándula a la estimulación con GnRH (Laws *et al.*, 1990).

## Estructura de la hormona folículo estimulante (FSH)

Las hormonas hipofisarias FSH, LH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), así como la gonadotropina coriónica (CG) proveniente de la placenta, pertenecen a una misma familia de glicoproteínas (Pierce y Parsons, 1981; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Estas glicoproteínas están formadas por dos cadenas polipeptídicas, la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ , asociadas de manera no covalente por puentes disulfuro, 5 en la  $\alpha$  y 6 en la  $\beta$ ; dicha unión es de alta afinidad, lo que le da estabilidad a la estructura cuaternaria del dímero (Pierce y Parsons, 1981; Wilson *et al.*, 1989; Zerfaoui y Ronin, 1996). La cadena  $\alpha$  es idéntica en las 4 hormonas y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos (aa) para una misma especie (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Timossi *et al.*, 1999), mientras que la  $\beta$  es única para cada hormona y es la que le confiere especificidad biológica e inmunológica (Gharib, 1990). La asociación entre la subunidad  $\alpha$  y la  $\beta$  es indispensable para la expresión de la actividad biológica de la hormona, ya que cuando se encuentran separadas no presentan ninguna actividad biológica detectable (Pierce y Parsons, 1981; Sairam *et al.*, 1985; Combarnous, 1992). Las gonadotropinas hipofisarias son moléculas complejas con un peso molecular entre 28 y 38 kDa. En el caso de la FSH el peso molecular es de aproximadamente 30 kDa (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

Existen numerosos estudios sobre la secuencia de aa de la FSH en diversas especies animales, incluyendo la humana, la cual está conformada por 92 aa en la subunidad  $\alpha$  con dos sitios de N-glicosilación localizados en la posición Asparagina (Asn) 52 y Asn 78, mientras que la subunidad  $\beta$  está compuesta por 111 aa y tiene dos sitios de glicosilación en las posiciones Asn 7 y Asn 24 (Green y Baenzinger 1988; Gharib *et al.*, 1990; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). La estructura de los oligosacáridos en la FSH es altamente variable y estos juegan un papel importante en la determinación de las características y propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de la hormona; esta variabilidad en la presencia de carbohidratos constituye la base de su heterogeneidad molecular (Figura 2) (Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988, 1995a; Simoni, 1994; Bousfield *et al.*, 1995; Stanton *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Modelo homólogo de la FSH humana totalmente glicosilada y sializada, después de la sustitución de la secuencia primaria de la hCG $\beta$  por la de la FSH $\beta$  en la estructura de la hCG mostrada por rayos-X y de la minimización de la estructura resultante empleando el programa RASMOL. Los carbohidratos son representados por las esferas y bastones pequeños. Las esferas rojas representan el ácido siálico, las amarillas a las moléculas de GalNac y GlcNAc y las verdes a las unidades de manosa. Las esferas azules compactadas muestran a la subunidad- $\alpha$  y las verdes a la subunidad- $\beta$  del dímero. (Reproducida con la autorización de Ulloa-Aguirre y cols (1999) *Endocrine* 11,205 y de Human Press, Inc) (La reproducción original fue cortesía del Dr. James A.Dias, David Axelrod Institute for Public Health, Wadsworth Center, Albany, NY, EUA).

Las gonadotropinas ejercen sus efectos a través de su unión con receptores específicos, que se encuentran en la membrana plasmática de las células blanco. El receptor de la FSH es una glicoproteína que pertenece a un subgrupo de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas que unen nucleótidos de guanina, también llamadas proteínas G (Minegishi *et al.*, 1991; Kelton *et al.*, 1992; Simoni *et al.*, 1997; Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). La proteína G es una molécula heterotrimérica formada por 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En su forma inactiva la subunidad  $\alpha$  está unida al difosfato de guanosina (GDP) (Guderman *et al.*, 1995). El cambio de GDP por una molécula de trifosfato de guanosina (GTP) promueve la disociación de la subunidad  $\alpha$  del complejo  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  activa (unida al GTP), así como el complejo  $\beta\gamma$ , son los responsables de la modulación de la actividad de distintos efectores intracelulares, como son la adenilato ciclasa (Selvaraj y Amsterdam, 1997), así como los canales de diferentes iones. La hidrólisis del GTP por una GTPasa ocasiona la reasociación de la subunidad  $\alpha$  con el complejo  $\beta\gamma$  y la subsecuente inactivación de la proteína G (Leung *et al.*, 1992). Los receptores acoplados a proteínas G se caracterizan por tener una región extracelular amino terminal, una región con 7 dominios transmembranales unidos por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares y una parte intracelular carboxilo terminal (Braun *et al.*, 1991; Simoni *et al.*, 1997). En conjunto, las siete regiones transmembranales forman estructuras tridimensionales semejantes a cilindros, los cuales se encuentran orientados perpendicularmente al plano de la membrana celular (Ulloa Aguirre y Conn, 1998; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999a).

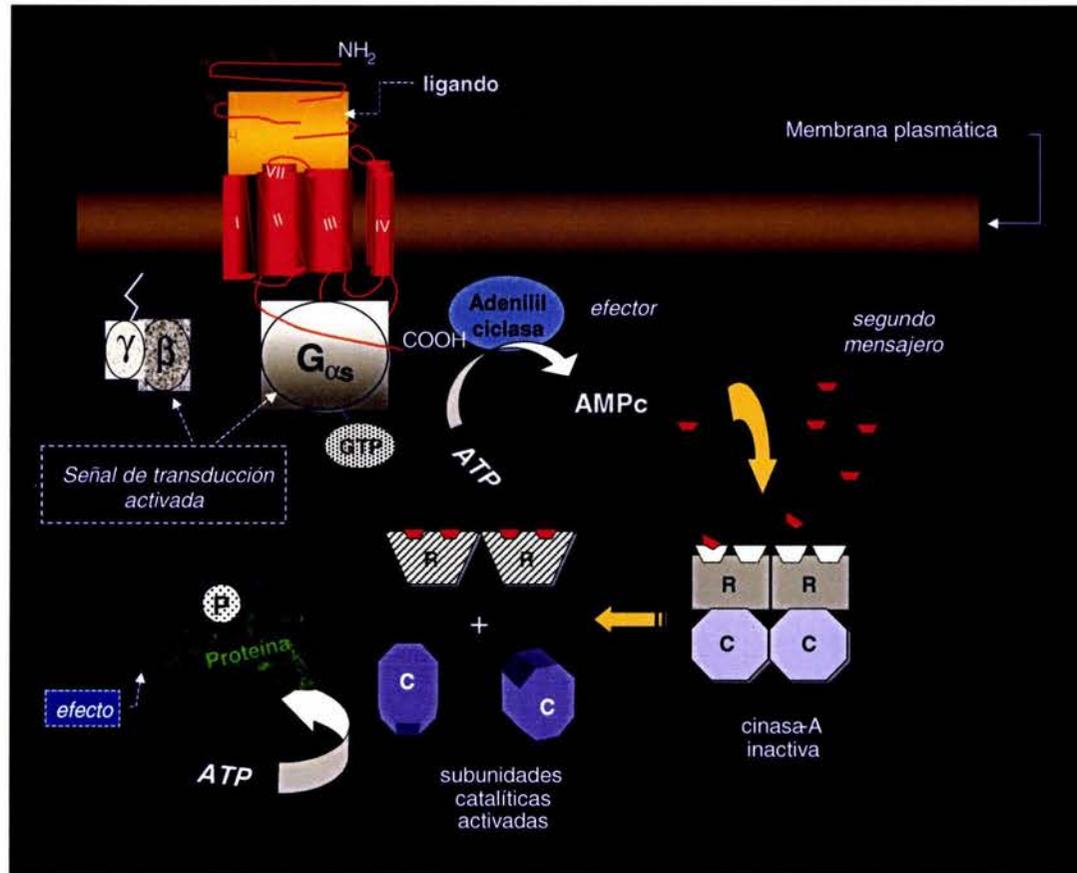
Cuando se forma el complejo FSH-receptor, el receptor presenta un cambio conformacional que se traduce en la activación de la proteína  $G\alpha_s$  con la subsecuente activación de la adenilato ciclasa. Cada molécula de la ciclasa, cataliza la conversión de un número elevado de moléculas de ATP en 3' 5'-monofosfato de adenosina (AMPc), cuyo aumento activa a la cinasa A de proteínas (PKA). Esta cinasa está conformada por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. El AMPc se une a la subunidades reguladoras y esta unión provoca la disociación de la subunidad reguladora y en consecuencia la activación de la subunidad catalítica de la enzima. (Reichert y Dattatreyaumurty, 1989).

La activación de la cinasa da lugar a la fosforilación de proteínas y a una cascada de interacciones proteína-proteína que resultan en uno o varios efectos biológicos determinados, incluyendo la síntesis de proteínas, la proliferación celular y la desensibilización del receptor (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). Las concentraciones intracelulares elevadas de AMPc persisten por poco tiempo, ya que la fosfodiesterasa transforma el AMPc en su forma inactiva 5'AMP. El principal mecanismo de acción de la FSH y la LH es a través de la vía AMPc-PKA (Figura 3) (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).

### **Regulación de la síntesis y secreción de la FSH**

La secreción cíclica y pulsátil de la FSH es el resultado de la acción del GnRH y de varios factores de naturaleza esteroidea (estrógenos, progestágenos y andrógenos) y polipeptídicas (Pezzani *et al.*, 2000). Los esteroides gonadales regulan directamente la síntesis y secreción de la FSH a nivel hipofisiario, influyendo en la transcripción de los diferentes genes de sus subunidades y del receptor para el GnRH, en tanto que su efecto en el hipotálamo se lleva a cabo de manera indirecta regulando la actividad de las neuronas cuya actividad incide en aquellas productoras de GnRH (Winters *et al.*, 1992).

Los estrógenos pueden provocar efectos inhibitorios o estimulantes en la síntesis de la FSH, dependiendo de su dinámica de secreción y de las concentraciones alcanzadas durante el ciclo menstrual. Por ejemplo, durante la fase folicular media, el incremento progresivo en las concentraciones sanguíneas de estradiol (y de inhibina B) provocan un efecto inhibitorio temporal en la síntesis y secreción de la FSH. Este efecto de retroalimentación inhibitoria se revierte cuando las concentraciones se incrementan a 200-300 pg/ml durante al menos un periodo de 48 horas, tal y como ocurre durante la fase folicular tardía y preovulatoria del ciclo, en la que el estradiol provoca un efecto de retroalimentación estimulante temporal que lleva al aumento significativo en la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas particularmente de la LH; el efecto estimulante de los estrógenos durante esta fase es amplificado por el incremento



**Figura 3.** Señal de transducción mediada por la vía de la proteína G $\alpha$ s en respuesta al estímulo gonadotrópico (ligando). Después de la activación del receptor por la señal proveniente del gonadotropo, la subunidad G $\alpha$ s activada (unida a GTP) estimula a la enzima efectora, la adenilato ciclasa, y la producción de un segundo mensajero, el AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc activa subsecuentemente a la cinasa A de proteínas, iniciándose de esta manera una cascada de fosforilación (P) y activación de proteínas intracelulares. R, subunidad regulatoria de la cinasa A; C, subunidad catalítica

paralelo en las concentraciones circulantes de la progesterona provenientes de las células diferenciadas de la granulosa. Por el contrario durante la fase lútea el estradiol junto con la progesterona (y la inhibina A) disminuyen significativamente la secreción de FSH, y por ende su concentración. La involución del cuerpo lúteo, principal fuente de producción de los esteroides sexuales y de inhibina en esta fase del ciclo, resulta en la reducción significativa de las concentraciones circulantes de todos estos factores, contribuyendo así al inicio del incremento en la producción y secreción de FSH observada durante la transición lútea-folicular y al reclutamiento de nuevos folículos antrales tempranos. La inhibición de la síntesis y secreción de las gonadotropinas provocada por la progesterona requiere de un estímulo estrogénico previo. Este efecto inhibitorio es estimulado por un aumento en el tono opioide hipotalámico, el cual conlleva a la disminución en la frecuencia de los pulsos de GnRH.

Otras hormonas diferentes a los esteroides gonadales que también se han relacionado con el control de la síntesis y secreción de la FSH son las proteínas ováricas: las inhibinas, la activina y folistatina (Ying, 1988). La inhibina es un heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  y una de dos subunidades  $\beta$  ( $\beta A$  ó  $\beta B$ ) dando origen a la inhibina A e inhibina B (Ying y Murata, 1993; Petraglia *et al.*, 1999). Su función es la supresión selectiva de la síntesis y secreción de la FSH tanto *in vivo* como *in vitro* (Mather *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 1998).

Por otro lado se ha demostrado que la inhibina se secreta de diferente manera a lo largo del ciclo menstrual, ya que durante la fase folicular las concentraciones de inhibina A se mantienen bajas, teniendo un incremento previo al pico preovulatorio de LH. Las concentraciones de este dímero disminuyen inmediatamente después de la ovulación y posteriormente alcanzan su máxima concentración durante la fase lútea. Por otro lado las concentraciones de inhibina B aumentan durante la fase folicular temprana, alcanzando un "pico" (elevación de la concentración sanguínea de la hormona) alrededor del día 5 del ciclo. Otro "pico" en las concentraciones de este dímero se observa 2 días antes de la ovulación, disminuyendo gradualmente durante la fase lútea (Groome *et al.*, 1996;

Muttukrishna *et al.*, 2000). Durante la transición lúteo-folicular, se ha observado una elevación de la inhibina B<sub>(Welt *et al.*, 1997)</sub>.

Las activinas están formadas por dos cadenas  $\beta$  de inhibina, unidas por puentes disulfuro, existiendo la posibilidad de originarse 3 tipos de activina la A, la B y la AB, constituídas por la unión de 2 subunidades ( $\beta A$  ó  $\beta B$  o por la unión de una subunidad de cada tipo) respectivamente; éstos dímeros tienen un efecto opuesto a la inhibina, ya que incrementan la síntesis de FSH<sub>(Moore *et al.*, 1994; Muttukrishna *et al.*, 1991)</sub>. La concentración de activina A disminuye durante la fase folicular temprana y aumentan durante la fase folicular media, alcanzando su máxima concentración durante la fase lútea media; esto lleva a sugerir que la Activina A puede tener un efecto sinérgico al aumentar la producción de FSH<sub>(Muttukrishna *et al.*, 1996; Muttukrishna *et al.*, 2000)</sub>.

Otro péptido gonadal supresor de la FSH es la folistatina, la cual es una glicoproteína formada por una cadena única<sub>(Ying, 1988)</sub>. La folistatina neutraliza la acción de la activina por su asociación con ésta y con cadenas de heparán sulfato de la membrana plasmática, favoreciendo la unión de activina a su receptor y eventualmente su captación intracelular y su degradación por enzimas lisosomales<sub>(de Winter *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2000; Mather *et al.*, 1997)</sub>.

Otro mecanismo de regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas es la prolactina, que inhibe la secreción de GnRH<sub>(Calogero *et al.*, 1996)</sub>, Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar en el hipotálamo al modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) y a su vez la GnRH puede influir directamente sobre su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación)<sub>(Marshall *et al.*, 1988)</sub>.

Por otro lado, 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 de los receptores de la hormona<sub>(Lalloz *et al.*, 1988; Conn y Crowley, 1991)</sub>. La fase temprana de la desensibilización celular ocurre rápidamente, después de segundos o minutos de exposición a la hormona e

involucra la fosforilación de residuos localizados en los dominios intracelulares del receptor, con el subsecuente desacoplamiento del receptor de sus proteínas G respectivas; la fase tardía se presenta después de varias horas e involucra la disminución en la biosíntesis del receptor. El resultado final de la desensibilización es una reducción importante en el número de receptores funcionales en la membrana que puedan interactuar con la hormona y activar una señal (Ascoli, 1982).

### **Secreción bifásica de gonadotropinas**

Al igual que otras hormonas glicoproteicas, las gonadotropinas son almacenadas en gránulos secretorios liberándose en forma bifásica (Bremmer y Paulsen, 1974). Esta secreción se caracteriza por un aumento agudo inicial, seguido de un período de estabilización y de una segunda fase de incremento en la secreción. El fenómeno de la secreción bifásica se ha explicado por la existencia de dos pozas metabólicas de hormona liberable (Wang, et al, 1976b). 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 Thomer, 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).

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 limitada (5-10  $\mu\text{g}$ ), el incremento inicial de la concentración sérica indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisaria requiere de una duración del estímulo más prolongada o de una mayor cantidad de GnRH (90-100  $\mu\text{g}$ ). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje, la cual puede incluir al componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100-150  $\mu\text{g}$ ), no se pueden distinguir los dos componentes de sensibilidad y reserva, ya que un estímulo potente ocasiona la liberación de ambas pozas de manera conjunta (Wang *et al.*, 1976a, b).

## **Funciones de la FSH**

### ***Función en el ovario***

La FSH actúa en las células de la granulosa en el ovario. La principal acción de la FSH es promover la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa del folículo (Yong *et al.*, 1992) y la estimulación de la aromatización de andrógenos, la maduración del ovocito y de forma secundaria la ovulación (Hillier, 1994). Asimismo estimula la producción de inhibina, activina y del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1) (Magoffin, 1990). También hay evidencia de que la FSH estimula la división celular de las células de la granulosa (Reichert y Hillier, 1992; Bleuy *et al.*, 1992). La FSH induce la expresión del gene que codifica para la enzima citocromo P450aromatasa (P450<sub>AROM</sub>) (Richards, 1994), lo cual da como resultado la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca interna bajo el estímulo de la LH. Conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos (Adashi, 1996). Además, la

FSH estimula la producción de un mayor número de receptores de FSH y de receptores para la LH. La LH es necesaria para el crecimiento final del folículo y la ovulación, actuando específicamente sobre las células de la teca y la granulosa. La FSH y los estrógenos (principalmente el estradiol), ejercen una acción mitogénica, estimulan aún más la proliferación de las células de la granulosa e inducen la síntesis progresivamente mayor de receptores para FSH por célula, lo que aumenta la sensibilidad de éstas a la gonadotropina estimulando su proliferación. Es necesaria la presencia de estradiol y de FSH para el crecimiento folicular, así como para la maduración del ovocito (Fauser y Van Heusden, 1997).

### ***Ciclo menstrual***

El ciclo menstrual es la expresión repetitiva de la función del sistema hipotálamo-hipófisis-ovario, con cambios estructurales y funcionales en los tejidos blancos: útero, oviductos y vagina (tracto reproductivo). El primer día que marca el inicio del ciclo es el comienzo del sangrado menstrual. El promedio de duración de cada ciclo es de 28 días aproximadamente (Yen, 1991).

### ***Fase folicular***

La fase folicular, que tiene una duración aproximada de 13 días, es el período en el cual ocurre el desarrollo de un folículo preovulatorio, mientras que los demás sufren atresia. Durante la fase folicular, la FSH promueve el desarrollo de los folículos antrales a preovulatorios y la maduración del ovocito, induciendo la proliferación celular y la síntesis de su receptor y de varios factores que de forma autócrina y/o parácrina regulan la función de la célula de la granulosa, potenciando o contrarrestando los efectos de la gonadotropina (Fauser y Van Heusden, 1997; Yen, 1991). Los andrógenos producidos por las células de la teca por el efecto trófico de la LH, son aromatizados a estrógenos en las células de la granulosa gracias a la acción de la FSH, la cual induce la transcripción del gene de la P450<sub>AROM</sub> (Misrahi *et al.*, 1998).

La selección del folículo destinado a ovular está asociada con la alta capacidad de biosintetizar y secretar andrógenos, estrógenos, progestágenos e inhibina (Tesarik y Mendoza, 1995). La integridad de la producción de estas hormonas es

dependiente de la interacción entre las células de la teca y de la granulosa; la actividad de cada una está modulada por cambios en las enzimas esteroidogénicas, del citocromo P450<sub>AROM</sub> y por una variedad de factores de crecimiento que operan por medio de mecanismos autócrinos y parácrinos (Zelevnik y Benyo, 1994; Sullivan, 1999).

A su vez, los estrógenos promueven la proliferación de las células de la granulosa y conjuntamente con la FSH, la síntesis de receptores para la LH. La presencia de LH durante la fase folicular es indispensable para proveer a la célula de la granulosa de sustratos (andrógenos) para la aromatización; su ausencia en esta fase no inhibe el crecimiento folicular pero sí su maduración y la capacidad del ovario para llevar a cabo completamente el proceso de esteroidogénesis (Hillier et al, 1994).

### ***Fase ovulatoria***

#### ***Ovulación***

La ovulación en una mujer que presenta un ciclo menstrual normal de 28 días ocurre aproximadamente 14 días después del comienzo de la menstruación. La LH es indispensable para la producción de progesterona y la luteinización del folículo preovulatorio así como para completar la maduración del ovocito, la reanudación de su meiosis (evento en el cual también la FSH juega un papel importante) y la ruptura folicular. Estos últimos eventos ocurren en el medio ciclo, durante el cual la secreción de la LH se incrementa significativa y temporalmente durante aproximadamente 48 horas (Hillier et al., 1994). Durante esta fase del ciclo tanto la LH como la FSH actúan de forma sinérgica lo que favorece que el folículo crezca rápidamente en los días previos a la ovulación (Fillicori, 1999). La tasa de secreción de estrógeno comienza a disminuir aproximadamente un día antes de la ovulación, a la vez que comienzan a secretarse pequeñas cantidades de progesterona (Yen, 1991).

Con el pico preovulatorio de LH, hay una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, que culminan con la ruptura folicular y la ovulación. El folículo presenta un aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad capilar,

lo que lleva a que el líquido intersticial y folicular sean ricos en proteínas plasmáticas, entre ellas el plasminógeno. Por otro lado, la LH estimula la síntesis de proteínas responsables de la diferenciación de las células de la granulosa a células luteínicas, de la secreción de esteroides, así como del activador de plasminógeno. La teca interna también responde a la estimulación de LH, aumentando la secreción de progesterona, andrógenos y activador de plasminógeno (PA). El PA convierte el plasminógeno del líquido folicular e intersticial en plasmina, la cual activa a la colagenasa, que junto con otras proteasas de serina, completan la proteólisis de la colágena. Finalmente, disminuye la tensión de la pared folicular, hasta que ocurre la ruptura del folículo y por consiguiente la ovulación (Espey y Lipner, 1994).

### ***Fase lútea***

Durante las primeras horas tras la expulsión del óvulo del folículo, las células de la granulosa interna y de la teca se convierten rápidamente en células luteínicas. Aumentan su diámetro dos veces o más y se llenan de inclusiones lipídicas. Este proceso se denomina luteinización, y el conjunto de la masa de células se denomina cuerpo lúteo.

En la fase lútea, las concentraciones plasmáticas de FSH alcanzan los niveles más bajos. No se requiere de FSH para mantener el cuerpo lúteo. La combinación de inhibina con estrógenos y progesterona, suprime la secreción de FSH y previene la iniciación de foliculogénesis. Por otro lado la LH es indispensable para la síntesis de las hormonas sexuales, principalmente progesterona, así como de la inhibina.

Cuando en la fase lútea empieza a decaer la concentración de estrógenos y progesterona, ocurre un incremento temporal en los pulsos de la GnRH, el cual se va incrementando progresivamente a lo largo de los primeros días de la fase folicular (Yen, 1991).

### ***Transición Lúteo-folicular***

La foliculogénesis comienza en la fase lútea tardía del ciclo previo y continúa durante la transición lúteo-folicular. En este punto, la declinación del cuerpo lúteo asociado con el rápido descenso en la concentración plasmática de estradiol,

resulta en el incremento de la secreción de FSH (aproximadamente 2 días antes de la menstruación). Esta etapa representa una secuencia de cambios dinámicos que envuelven la terminación de la función lútea y la reactivación del sistema GnRH-gonadotropinas.

### **Actividad Biológica *in vitro***

Para el análisis de la potencia biológica de las diferentes hormonas glicoproteicas se han empleado diversos tipos de bioensayos *in vitro*; en el caso de la FSH, los más utilizados son aquellos que valoran la capacidad de esta hormona para inducir la aromatización de estrógenos, ya sea en células de la granulosa de ratas inmaduras pretratadas con dietil-etil-bestrol<sup>(Hsueh *et al.*, 1984; Jia *et al.*, 1986a)</sup> o en células de Sertoli de ratón<sup>(Padmanabhan *et al.*, 1991)</sup>. Para expresar la respuesta biológica *in vitro* de las hormonas se considera habitualmente su efecto biológico, su unión al receptor y su inmunorreactividad, de cuyos valores se obtienen los cocientes bioactividad/inmunorreactividad (B/I) y unión al receptor/inmunorreactividad (RRA/I). Para tener una adecuada interpretación de estas mediciones se deben considerar cuidadosamente la fuente y pureza del receptor o preparado celular, el estándar utilizado para su cuantificación, la especificidad del antisuero empleado en el inmunoensayo, el efecto medido (en el caso de los bioensayos) y la presencia de paralelismo entre el estándar y la muestra desconocida<sup>(Dahl y Stone, 1992; Simoni y Nieschlag, 1991)</sup>

Hasta ahora al referirme a las concentraciones de FSH lo he hecho tomando en consideración las concentraciones inmunorreactivas de la hormona. Sin embargo, el efecto biológico de las hormonas no está necesariamente determinado por las concentraciones inmunorreactivas, sino por la actividad biológica específica que tenga cada una de ellas. Sobre esta base, se puede afirmar que la determinación de la actividad biológica y de la vida media plasmática de una hormona es la que finalmente indicará con mayor exactitud las acciones *in vivo* que tendrá dicha hormona. Los primeros ensayos para determinar la actividad biológica de FSH fueron realizados *in vivo*<sup>(Steelman y Pohley,</sup>

1953), y consistían en analizar el incremento del peso ovárico en respuesta a la inyección de FSH. Sin embargo, el realizar este tipo de ensayos tiene la desventaja de requerir dosis altas de la hormona y de que su sensibilidad es relativamente baja. Se han empleado diversos bioensayos *in vitro* que intentan analizar la actividad biológica de la FSH. Entre los bioensayos más sensibles y específicos se encuentra el desarrollado por Tilly y cols (1992) y Albanese y cols (1994), en el cual se utilizan líneas celulares transfectadas con el receptor recombinante de FSH humano (hFSHR). Estos bioensayos tienen la ventaja de que responden de una manera dosis dependiente a la FSH, son especie-específico, no requieren de un cultivo primario y se puede concluir en 24 horas después de la adición de la hormona (Tano *et al.*, 1995; Christin-Maitre *et al.*, 1996 a,b; D'Antonio *et al.*, 1999). La desventaja del uso de estos bioensayos es que evalúan un efecto temprano (producción de AMPc).

Los estudios realizados hasta ahora sobre los cambios en la actividad biológica de la FSH circulante durante el ciclo menstrual han sido contradictorios. Empleando el bioensayo de la aromatización de andrógenos por células de la granulosa de rata, Jia y cols (1986b) y Fauser y cols (1989) encontraron que no existía cambio significativo en el cociente B/I de la FSH circulante a lo largo del ciclo menstrual. Con el mismo sistema, Reddi y cols (1990) detectaron, por el contrario, un incremento en la actividad biológica durante la fase folicular temprana del ciclo. Por otro lado, Padmanabhan y cols, en 1988 empleando el bioensayo de aromatización en células de Sertoli de ratón concluyeron que existe un incremento significativo en el cociente B/I durante la fase folicular tardía. Finalmente, utilizando un sistema recombinante homólogo Guderman y cols (1994), encontraron un aumento del cociente B/I en la fase folicular tardía y el medio ciclo, y Christin-Maitre y cols (1996a) detectaron este incremento durante la fase lútea tardía. Estos resultados contradictorios podrían ser debido a las diferentes sensibilidades de los bioensayos empleados, así como por diferencias en los tipos celulares y en los receptores (naturales vs recombinantes) (Ulloa-Aguirre *et al* 2003); ya que la hormona circula en concentraciones relativamente bajas en mujeres en edad reproductiva.

Por otro lado, la FSH se sintetiza y secreta en múltiples formas moleculares o isoformas, las cuales se han identificado en la hipófisis anterior, el suero y la orina de diversas especies animales, incluyendo la humana (Wide, 1985a; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992b, 1995; Stanton, 1992; Simoni 1994; Zambrano *et al.*, 1996). Las variaciones en la distribución de los carbohidratos terminales, principalmente del ácido siálico y de sulfatos, constituye la principal base química de las diferencias entre las isoformas de la FSH (Baenziger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Los oligosacáridos desempeñan una función importante en el plegamiento, ensamblaje de las 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 (Fiete *et al.*, 1991; Manzella *et al.*, 1995; Timossi *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b, 1999b). Como consecuencia de su diversidad estructural, la FSH presenta variaciones en su capacidad de unión al receptor así como en su vida media plasmática. De hecho, la respuesta biológica final de cada isoforma es diferente tanto *in vitro* como *in vivo* (Zambrano *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999a).

El ácido siálico protege a la molécula de la acción degradativa de las enzimas hepáticas, por lo que su presencia es de gran importancia en la regulación de la vida media de la hormona en la circulación (Baenziger y Green, 1988). La deglicosilación total de la FSH mediante tratamientos químicos, no altera la capacidad de la hormona para unirse a su receptor, pero sin embargo, reduce su potencia para estimular la producción de 3'-5' adenosín monofosfato cíclico (AMPC), y por lo tanto, disminuye sus efectos biológicos. Se ha observado que si la subunidad  $\alpha$  es deglicosilada y la  $\beta$  se mantiene intacta, ocurre la producción de AMPC, lo que demuestra la importancia de los carbohidratos en la subunidad  $\beta$  para la inducción de la respuesta (Hsueh *et al.*, 1989). 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 (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992a, 1995a,b, 1999). Las variantes más ácidas, aquellas con mayor contenido de ácido siálico, presentan una vida media plasmática prolongada y una mayor bioactividad *in vivo*. 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 (Cerpa-Poljak, 1993; Wide *et al.*, 1993; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992b, 1995; Zambrano *et al.*, 1999). Los

cambios en la actividad biológica de FSH a consecuencia de su glicosilación, se expresan según el cociente actividad biológica/actividad inmunológica (B/I), el cual varía discretamente según el sistema celular utilizado para valorar ambas actividades (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a; Zambrano *et al.*, 1999).

La utilización de variantes de FSH recombinantes carentes de residuos de ácido siálico terminal ha permitido corroborar que estas isoformas, 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 FSH natural (Galway *et al.*, 1990). Valove y cols (1994), demostraron que ambos residuos de carbohidratos en la cadena  $\alpha$  de la hormona, (particularmente los unidos al aa 52) tienen un papel importante en la determinación de la actividad biológica *in vitro* de esta gonadotropina

La incorporación de ácido siálico en los oligosacáridos de la FSH podría estar regulada por los esteroides sexuales y el GnRH, ya que éste último además de ser el factor más importante en la regulación y síntesis de gonadotropinas, también modula su glicosilación (Ramey *et al.*, 1987; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992c; 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 un cociente B/I reducido, probablemente debido a la alteración en la glicosilación (Dahl *et al.*, 1988).

Por otro lado, en estudios realizados en ratas, se ha demostrado que la expresión del ARNm de la enzima  $\alpha$ 2,3-sialiltransferasa está estrechamente relacionada con los cambios en las concentraciones de estrógenos circulantes. En la rata hembra intacta, la expresión del ARNm de esta enzima disminuye significativamente a partir de la tarde del diestro 1, alcanzando sus concentraciones más bajas durante la mañana del proestro. En la rata ovariectomizada, la administración de benzoato de estradiol disminuye la expresión de este ARNm, efecto que es contrarrestado mediante la administración subsecuente del antiestrógeno ICI182,780 (Damián-Matsumura *et al.*, 1999)

Se ha demostrado que las mujeres con ciclos menstruales normales, liberan a la circulación casi todas las isoformas de FSH intrahipofisarias; sin embargo, la

proporción relativa de esas isoformas secretadas cambia en relación con la fase del ciclo menstrual. Se ha demostrado que durante la fase folicular tardía y el medio ciclo, se presenta un incremento relativo de las formas menos ácidas de la FSH (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide y Bakos., 1993; Zambrano *et al.*, 1995; Anobile *et al.*, 1998). Este incremento podría ser el resultado del aumento en la concentración circulante de estradiol, de una exposición mayor al GnRH, o de la acción concertada de ambos factores, lo que podría tener impactos fisiológicos importantes al reducir la vida media circulante de las moléculas secretadas y proveer a la célula blanco de una señal gonadotrópica breve pero de alta potencia biológica (Zambrano *et al.*, 1995). Estos cambios en la glicosilación podrían tener algún efecto en la actividad biológica de la hormona a nivel de la célula blanco, y así mismo variar a lo largo del ciclo menstrual.

El propósito de la presente tesis fue explorar de una forma más detallada esta posibilidad. Para ello se diseñó un estudio que exploró las características biológicas de la hormona secretada en condiciones basales así como después de estímulos provocadores de la secreción (dosis bajas de GnRH) y de la síntesis (dosis altas del decapeptido) de la FSH durante los diferentes ambientes hormonales determinados por las diferentes fases del ciclo menstrual. El planteamiento experimental contempló por lo tanto la posibilidad de analizar indirectamente los cambios estructurales en la actividad biológica de la hormona presente en diferentes pozas intracelulares y en la circulación.

## OBJETIVO

Determinar la actividad inmunológica y la actividad biológica *in vitro* de la FSH circulante durante el ciclo menstrual, tanto en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH.

## HIPOTESIS

Las actividades inmunológica y biológica (cociente B/I) de la hormona estimulante del folículo sintetizada y secretada por la hipófisis anterior en condiciones basales y después de estímulos repetidos con GnRH varía a lo largo del ciclo menstrual de la mujer, siendo mayores en la fase preovulatoria que en la fase folicular temprana y la fase lútea media.

## SUJETOS Y METODOS

Se estudiaron un total de 12 mujeres sanas en edad reproductiva (21 a 27 años de edad), con ciclos menstruales regulares. Para determinar los días de estudio del ciclo en cada mujer, se registraron las duraciones de al menos 3 ciclos menstruales previos, estableciendo un promedio de la duración del ciclo en cada donadora. El estudio se realizó con la aprobación del Comité de Estudios en Humanos (Instituto Mexicano del Seguro Social, Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala"), y de las voluntarias participantes.

### ***Criterios de inclusión***

1. Mujeres de 20 a 30 años de edad
2. Que presenta al menos 3 ciclos menstruales regulares precedentes, documentados por registro de sangrado menstrual
3. Que no hubieran estado bajo tratamiento hormonal durante al menos dos meses previos al estudio
4. Que presenta tres días antes del estudio concentraciones de hemoglobina mayores de 14 gr/dl y hematocrito mayor del 40%

### ***Criterios de exclusión***

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 durante el estudio
3. Irregularidad en los ciclos menstruales
4. Presencia de cualquier tipo de enfermedad durante la semana del estudio

### ***Criterios de eliminación***

1. Decisión de no continuar en el estudio.
2. Alteración de los signos vitales durante la obtención de las muestras.
3. Reacción de cualquier tipo atribuible a la GnRH administrada durante la prueba.

### **Obtención de las muestras**

A cada una de las participantes se le instaló un catéter corto (aguja nº 21) en una vena antecubital media hora antes de iniciar el estudio. La recolección de las muestras de sangre siempre se inició a las 0800 hrs. Cada mujer fue estudiada durante la fase folicular temprana (día -15 a -10), preovulatoria (día -3 a 0) y lútea (día +7 a +10), considerando como día 0 el día probable de la ovulación. En cada fase se realizó el protocolo de estudio que a continuación se describe. En un inicio se extrajeron 3 ml de sangre para la cuantificación de FSH, LH, progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ). Posteriormente a cada donadora se le extrajo 1.5 ml de sangre cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal, seguido de la administración (i.v.) 10  $\mu$ g de GnRH sintética (Serono de México S.A. de C.V.) para inducir la secreción de la hormona madura y se extrajo sangre (1.5 ml) cada 10 minutos durante 4 horas. Inmediatamente después, se administraron 90  $\mu$ g de GnRH (i.v.) para inducir la síntesis y secreción de nueva hormona y se efectuó el muestreo antes descrito por 4 hrs más. Durante todo el estudio, las participantes permanecieron en posición de decúbito e ingirieron una dieta baja en grasas a las 0900 hrs y a las 1400 hrs, y no se les permitió dormir.

## **METODOS**

Cada muestra de sangre permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 1000 x g a 8°C, durante 15 minutos. El suero de cada muestra se separó en dos alícuotas diferentes:

- 1) 400  $\mu$ l para la cuantificación de FSH por medio de radioinmunoanálisis (RIA) de la serie completa de muestras de cada voluntaria.

2) 400  $\mu$ l para constituir 5 pozas que se utilizaron en el bioensayo *in vitro*.

Los sueros se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día en que se llevaron a cabo los análisis.

Las concentraciones circulantes de FSH se determinaron mediante un RIA utilizando como estándar la preparación hipofisiaria LER-907 (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK), Bethesda, MD, EUA). Las concentraciones de LH, fueron determinadas mediante un ensayo inmunométrico<sup>(Zambrano et al, 1996)</sup> empleando reactivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, Londres, Reino Unido). Los resultados de FSH y LH se encuentran expresados en UI/L según la 2ª preparación de referencia internacional (2º IRP-HMG; 1 mg de LER 907=53 UI de FSH y 277 UI de LH). Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron de 4% y 6% para FSH y de 6% y 9% para LH respectivamente. La progesterona y el estradiol fueron cuantificados por un RIA descrito previamente<sup>(Zambrano et al, 1995)</sup> utilizando reactivos proporcionados por la OMS (Ginebra, Suiza). Los coeficientes de variación intra e interanálisis para progesterona y estradiol fueron <5% y <8%, respectivamente.

### **Radioinmunoanálisis de FSH**

La cuantificación de FSH tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90  $\mu$ g de GnRH se llevo a cabo siguiendo el método descrito por Ulloa-Aguirre y cols., (1992). Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar de FSH la preparación LER-907 (NIADDK), a concentraciones de 2.6 a 666.6 ng de FSH inmunoreactiva diluida en PBS 0.05 M y gelatina al 0.1% (PBS-Gel). El anticuerpo utilizado fue el anticuerpo policlonal anti-hFSH-6, y como trazador se utilizó el estándar hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcado con  $\text{NaI}^{125}$  (Amersham International Limited, Reino Unido) por el método de la Cloramina T<sup>(Greenwood et al., 1963)</sup>. El procedimiento del RIA consistió en agregar 100  $\mu$ l de amortiguador PBS-Gel, 100  $\mu$ l de la muestra problema o de la dosis de la curva estándar, 100  $\mu$ l de hFSH-I<sup>125</sup> (15,000 cpm), 100  $\mu$ l de anti-hFSH a una dilución de trabajo 1:50,000 (final 1:200,000) preparado con PBS 0.05M, EDTA 0.05M (PBS-

EDTA) y suero normal de conejo al 1%. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas. Posteriormente se añadieron a cada tubo 200  $\mu$ l de segundo anticuerpo, y se incubaron por 24 horas más a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 2 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y se determinó la radiactividad unida al anticuerpo presente en los precipitados empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, EUA). Los resultados fueron expresados en UI/L en relación a la segunda preparación de referencia internacional de FSH (2° IRP-HMG). Para evitar variaciones interanálisis entre las muestras provenientes de una misma donadora, todas las muestras se analizaron en un solo ensayo. Para analizar las variaciones interanálisis se utilizaron los mismos controles de calidad en cada uno de los ensayos.

### **Bioensayo *in vitro***

Para determinar la actividad biológica *in vitro* de la FSH circulante se constituyeron 5 pozas correspondientes a las 2 horas basales (poza 1); primeras 2 horas pos10  $\mu$ g de GnRH (poza 2); siguientes 2 horas pos10  $\mu$ g de GnRH (poza 3); primeras 2 horas pos90  $\mu$ g de GnRH (poza 4) y últimas 2 horas pos90  $\mu$ g de GnRH (poza 5) (Fig. 4)

La actividad biológica *in vitro* de cada una de las pozas se determinó mediante un bioensayo en células fetales humanas de riñón (HEK-293) transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para la FSH humana, siguiendo la técnica descrita por Zambrano y cols, (1996, 1999). El origen, manejo, especificidad del ligando y las propiedades bioquímicas del receptor de hFSH humano expresado por esta línea celular han sido descritas por Tilly y cols (1992) y Albanese y cols (1994). Las células fueron cultivadas en cajas Petri con Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, BRL NY, EUA) bajo en glucosa complementado con 5% de suero fetal de ternera (SFT) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO EUA), 100 mg/ml de geneticina, 100 UI/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (Gibco), a un pH de 7.2-7.3. Previo al análisis de la bioactividad

de cada una de las pozas, cada muestra se inactivó por calentamiento durante 10 minutos a 56°C<sub>(Gudermann et al., 1994)</sub>. Se ha demostrado que con este tratamiento no se altera la inmunoreactividad ni la bioactividad de la hormona. Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de evitar el efecto inhibitor de factores presentes en el suero en la formación de AMPc provocado por la FSH<sub>(Lee et al., 1990; Sluss y Schneyer, 1992)</sub>.

Cuando las células alcanzaron su confluencia, se resuspendieron y sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pozo. A los pozos de cultivo correspondientes a la curva estándar se les agregaron 300 µl de medio DMEM complementado con suero fetal de ternera (SFT 2.5%), 0.2 M de 3-isobutil-1-metilxantina (MIX) (Sigma); 50,000 células en 100 µl de medio y 100 µl de la dosis estándar (FSH recombinante (FSHrec) Org32489, Organon International BV, Oss, Holland; 1 ng de FSHrec= 3.29 ng LER-907, de acuerdo a curvas de calibración preliminares), la cual fue preparada en suero libre de gonadotropinas (SHLG) que contenía <3 UI/L, proveniente de una mujer sana bajo tratamiento con anticonceptivos orales. A cada pozo de las muestras desconocidas se le agregaron 300 µl de medio y 50, 75 ó 100 µl de cada una de las pozas de suero aforados a 100 µl con SHLG por triplicado. De esta forma todos los pozos del bioensayo contenían 20% de suero humano y 2.5% de suero fetal de ternera

El medio y las células fueron extraídos después de 24 horas de incubación a 37°C, en un incubador húmedo con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. El producto se calentó a 95°C por 3 minutos y posteriormente se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación del contenido de AMPc total (intra y extracelular) por RIA.

Alícuotas de 50 ó 100µl de cada una de las pozas analizadas en el bioensayo, fueron posteriormente analizadas para la cuantificación de FSH inmunorreactiva por RIA, pero empleando FSHrec para la construcción de la curva estándar. La actividad biológica relativa *in vitro* de la FSH fue expresada como el cociente actividad biológica/actividad inmunológica (B/I).

### Radioinmunoanálisis de AMPc

Cada sobrenadante y extracto celular procedente del cultivo fueron analizados en su contenido de AMPc por RIA (Zambrano y cols, 1999). El RIA se llevó a cabo utilizando como estándar, AMPc (81c-0220) (Sigma). El anticuerpo empleado fue el anti-AMPc CV-27 del NIADDK a una dilución final de 1:75,000. Como trazador se utilizó 2-O-monosuccinil tirosil-metiléster de AMPc (Sigma) radiomarcado con  $\text{NaI}^{125}$  (Amersham) por el método de la Cloramina T (Greenwood *et al*, 1963). Tanto la curva estándar como las muestras problema fueron previamente acetiladas con 25  $\mu\text{l}$  de trietilamina-anhidrido acético (2:1 v/v) y diluidas en acetato de sodio 5 mM, pH=4.75, con el fin de incrementar la sensibilidad del ensayo. El método consistió en agregar 100  $\mu\text{l}$  de muestra o dosis estándar, 100  $\mu\text{l}$  de trazador (10,000 cpm) y 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo. Posteriormente, los tubos fueron incubados a 4° C durante 24 horas y la reacción fue detenida agregando 3 ml de etanol frío; los tubos se centrifugaron a 2000 x g durante 30 minutos a 4°C. La radiactividad unida al anticuerpo se cuantificó con un contador para radiaciones gamma (Packard). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y la sensibilidad del ensayo fue de 4.0 fmol/tubo.

### Análisis estadístico.

Las áreas bajo la curva (aFSH) fueron calculadas por el método del trapecioide (Tai, 1994). La respuesta máxima al estímulo con una dosis baja y alta (10  $\mu\text{g}$  y 90  $\mu\text{g}$ ) de GnRH( $\Delta 1$  y  $\Delta 2$ ) fue definido como la diferencia entre la concentración máxima de FSH y la concentración precedente a cada uno de los estímulos con GnRH, (concentraciones de FSH a los 120 y 360 minutos). Con el fin de analizar las diferencias entre aFSH,  $\Delta$ FSH, cociente B/I y concentraciones basales de FSH, LH,  $\text{P}_4$  y  $\text{E}_2$  dentro de y/o entre cada fase del ciclo se utilizó una prueba de ANOVA seguido de una prueba de T pareada. Para evaluar la existencia de paralelismo entre la curva estándar y la muestra desconocida, la respuesta máxima y la dosis efectiva al 50% ( $\text{ED}_{50}$ ), se utilizó el método de DeLean y cols. (1978). Los valores son informados como la media  $\pm$  EE. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

Cinco voluntarias fueron excluidas del estudio por presentar alguna irregularidad en el ciclo, ya sea alargamiento o acortamiento en su duración, o bien por presentar valores hormonales basales diferentes a los valores de referencia establecidos.

En la tabla I se muestran las concentraciones circulantes de  $E_2$ ,  $P_4$ , FSH y LH en las muestras basales obtenidas en los diferentes días del ciclo menstrual. En todos los casos las concentraciones circulantes de dichas hormonas se encontraron dentro de los valores de referencia. El ciclo se normalizó al día probable de la ovulación. Se contaron en retrospectiva 14 días, tomándose éste como el día 0. La proximidad fisiológica del medio ciclo fue corroborado por las concentraciones basales de LH, los cuáles fueron significativamente mayores a los de la fase folicular. Por otro lado un incremento significativo en las concentraciones de  $P_4$  en suero, confirmó que la ovulación ocurrió en todas las mujeres estudiadas.

### **Respuesta de FSH al estímulo con GnRH.**

Con el fin de analizar la actividad inmunológica de cada una de las muestras obtenidas en cada voluntaria estudiada durante las diferentes fases del ciclo, se llevó a cabo el RIA de FSH. Todas las voluntarias presentaron respuestas significativas tanto al estímulo con 10  $\mu\text{g}$  como al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH; en todos los casos se observó una mayor respuesta al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  que al estímulo con 10  $\mu\text{g}$ . Los picos máximos de respuesta después de la dosis de 10  $\mu\text{g}$  de GnRH, se encontraron entre los 30 y los 100 minutos (mediana de 40 minutos) en la fases folicular temprana y periovulatoria; y entre los 40 y 70 minutos (mediana de 50 minutos) en la fase lútea. Posterior al estímulo con 90  $\mu\text{g}$  de GnRH, los picos máximos de respuesta se observaron entre los 20 y los 130 minutos (mediana de 50 minutos) en las fases folicular temprana y lútea y entre los 40 y 110 minutos (mediana de 100 minutos) en la fase preovulatoria.

TABLA I

Concentraciones basales de Estradiol, Progesterona, FSH y LH ( $X \pm EE$ ) en las fases Folicular Temprana, Preovulatoria y Lútea del ciclo menstrual.

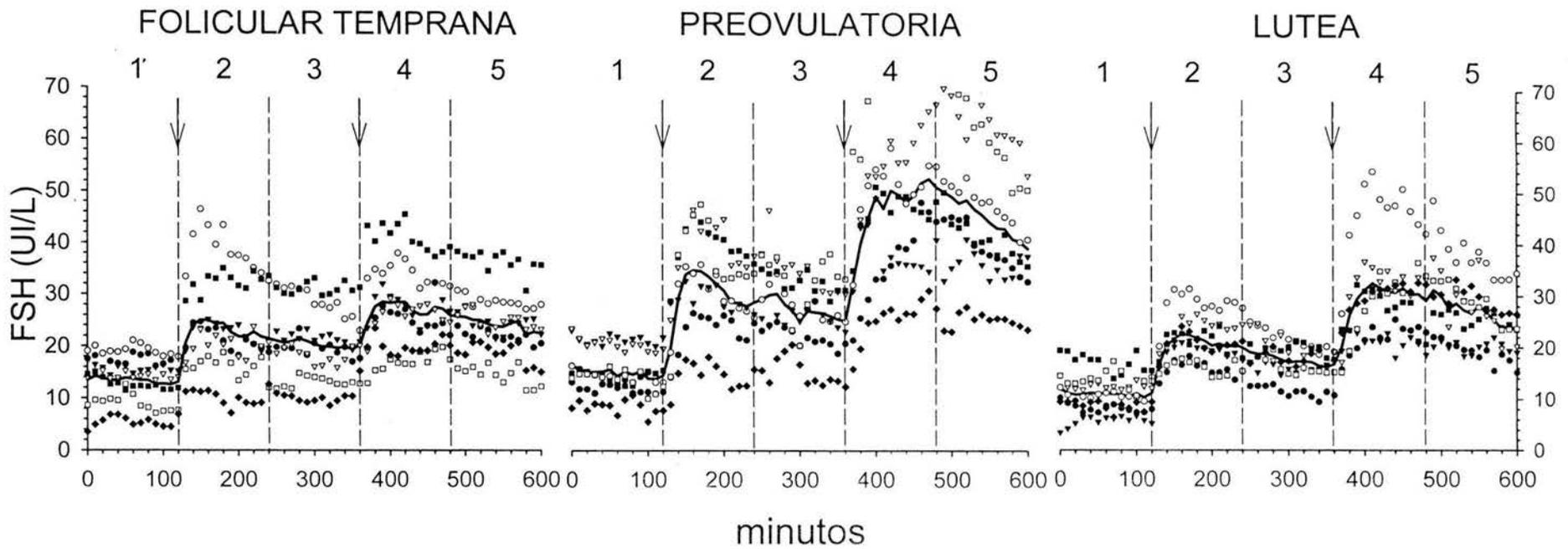
Fase del ciclo	Día del ciclo*	<u>ESTRADIOL</u> (pmol/L)	<u>PROGESTERONA</u> (nmol/L)	<u>FSH</u> (UI/L)	<u>LH</u> (UI/L)
Folicular temprana	-15 a -10	139±7 <sup>a</sup>	4±0.3 <sup>a</sup>	13±0.4 <sup>a</sup>	7±0.2 <sup>a</sup>
Preovulatoria	-3 a 0	712±51 <sup>b</sup>	5±0.3 <sup>a</sup>	19±1.2 <sup>b</sup>	32±2 <sup>b</sup>
Lútea	+7 a +10	521±51 <sup>b</sup>	27±3.4 <sup>b</sup>	12±0.8 <sup>a</sup>	10±0.4 <sup>c</sup>

\*Normalizado de acuerdo al día probable de la ovulación

Diferentes letras en cada columna indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las fases del ciclo.

En la figura 4 se muestran los patrones de respuesta de la FSH en suero en forma basal y después de los estímulos con 10 y 90  $\mu\text{g}$  de GnRH en las diferentes fases del ciclo menstrual.

Con el fin de evaluar las diferencias en la cantidad de secreción total de FSH entre las diferentes fases del ciclo, se analizaron las áreas bajo la curva de la producción de FSH, utilizándose para ello el modelo matemático descrito por Tai (1994). Para ello, se dividieron las 10 horas totales del procedimiento experimental en 3 grupos diferentes: área 1 (2 horas basales); área 2 (4 horas post-10  $\mu\text{g}$  de GnRH) y área 3 (4 horas post-90  $\mu\text{g}$  de GnRH). Asimismo se analizó la respuesta máxima al estímulo con una dosis baja y alta (10 $\mu\text{g}$  y 90 $\mu\text{g}$ ) de GnRH (TABLA II). Al hacer las comparaciones de cada una de las áreas bajo la curva y de los incrementos máximos en las diferentes fases del ciclo menstrual se encontró que: a) las áreas bajo la curva de las muestras basales fueron similares a lo largo del ciclo menstrual; b) después de la administración de 10 $\mu\text{g}$  y 90 $\mu\text{g}$  de GnRH, se observó que tanto el área bajo la curva como el incremento máximo fueron mayores durante la fase preovulatoria. Las diferencias encontradas al comparar las áreas bajo la curva y el incremento máximo en una misma fase fueron: durante las fases preovulatoria y lútea del ciclo, la administración de 90  $\mu\text{g}$  de GnRH provocó una respuesta significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que cuando se administraron 10  $\mu\text{g}$  de GnRH ; sin embargo en la fase folicular temprana éste incremento sólo se observa cuando se analiza el área bajo la curva.



**Figura 4.** Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógena en las diferentes fases del ciclo menstrual. Los diferentes símbolos representan a las diferentes donadoras, la línea continua en cada gráfica es el promedio de las concentraciones de FSH, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto la segunda indica la inyección de la dosis de 90 µg de GnRH.

TABLA II  
 Actividad Inmunologica de la FSH  
 Areas Bajo la Curva e Incremento Máximo de Respuesta de la FSH  
 (X±EE)

Fase del ciclo	Condición				
	<u>Basal</u>	<u>10 µg de GnRH</u>		<u>90 µg de GnRH</u>	
	AREA 1 aFSH (UI/L/2h)	AREA 2 aFSH (UI/L/4h)	ΔFSH (UI/L)	AREA 3 aFSH (UI/L/4h)	ΔFSH (UI/L)
Folicular	1353±181 <sup>a</sup>	4891±725 <sup>a,b</sup>	13.6±2.6 <sup>a</sup>	6344±709 <sup>a</sup>	10.69±1.0 <sup>a</sup>
Preovulatoria	1506±172 <sup>a</sup>	6704±700 <sup>a</sup>	21.4±3.0 <sup>b</sup>	11194±1374 <sup>b*</sup>	32.0±4.6 <sup>b*</sup>
Lútea	1098±144 <sup>a</sup>	4504±334 <sup>b</sup>	12.6±1.7 <sup>a</sup>	6909±651 <sup>a*</sup>	18.0±3.0 <sup>a*</sup>

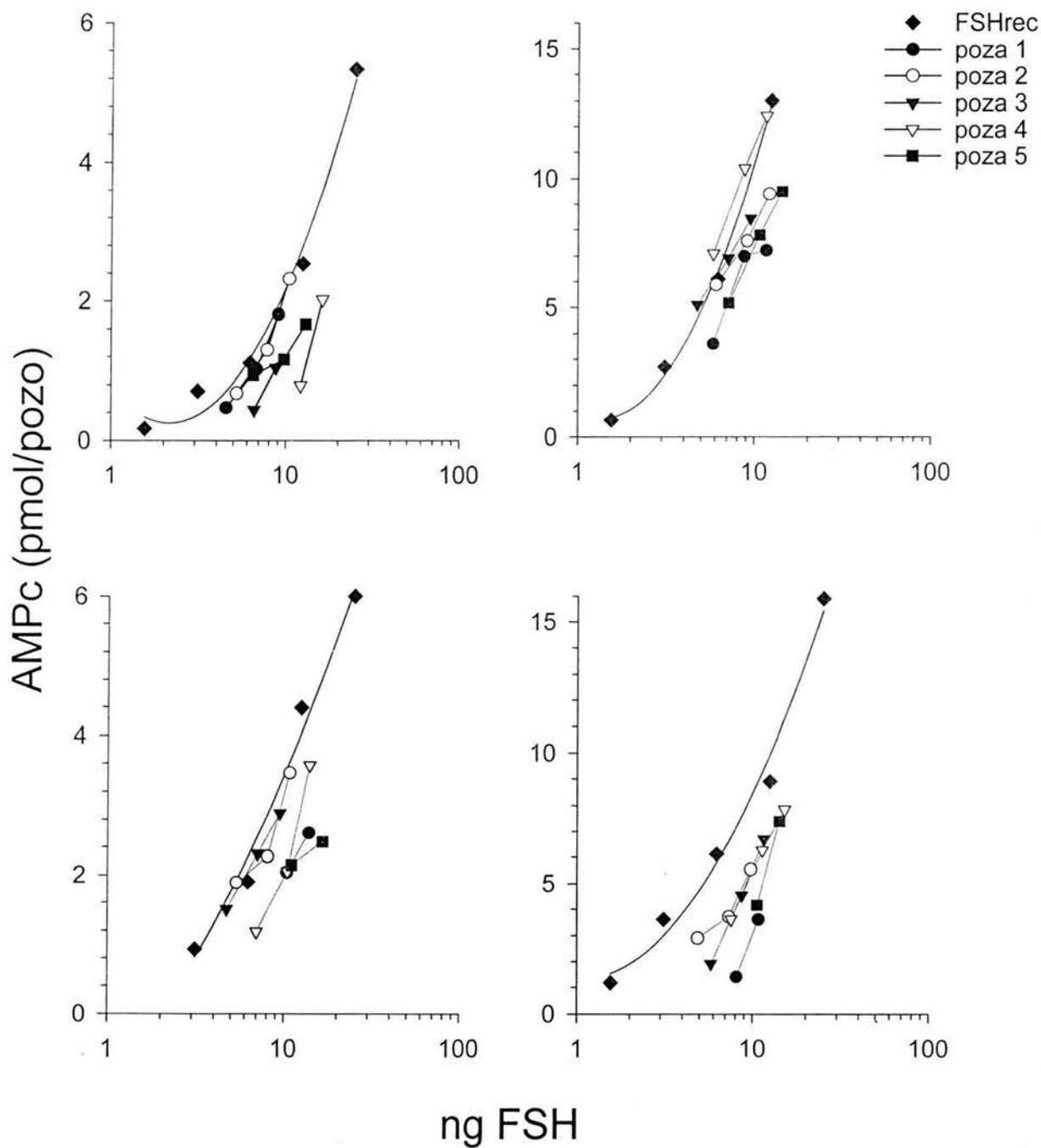
\*P<0.05 vs 10 µg GnRH

Diferentes letras en cada columna indican la existencia de diferencias significativas (p<0.05) entre las fases del ciclo.

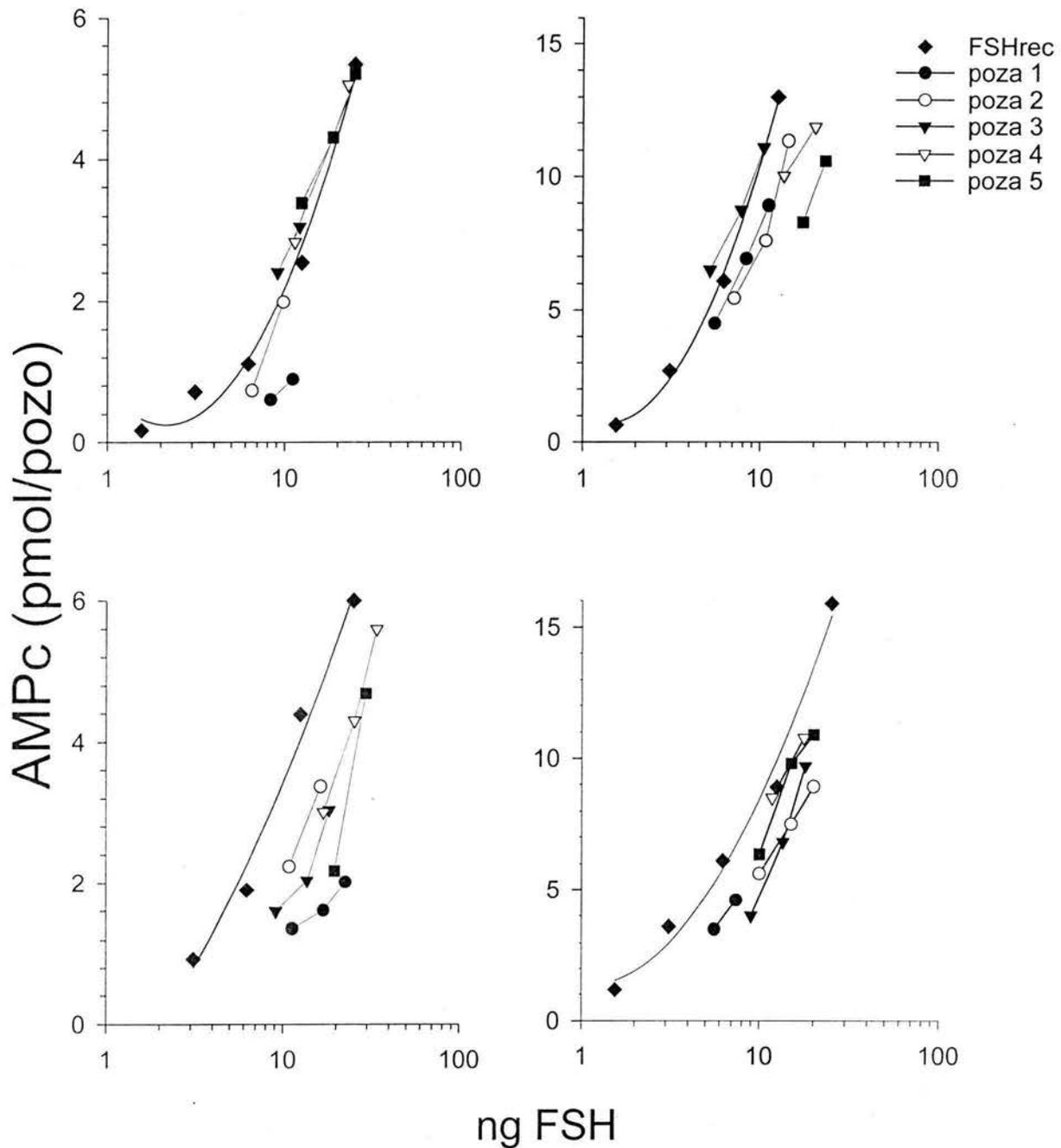
### **Cociente B/I de la FSH circulante**

La actividad biológica relativa *in vitro*, fue calculada considerando cada dosis de suero analizada (50, 75 ó 100  $\mu$ l), y esto fue expresado como el cociente de la actividad biológica/actividad inmunológica (B/I). Cada una de las pozas (1 a 5) fue capaz de inducir la producción de AMPc de forma dosis dependiente en células HEK-293 establemente transfectadas con el DNAc del receptor de la hFSH (Figuras 5-7)

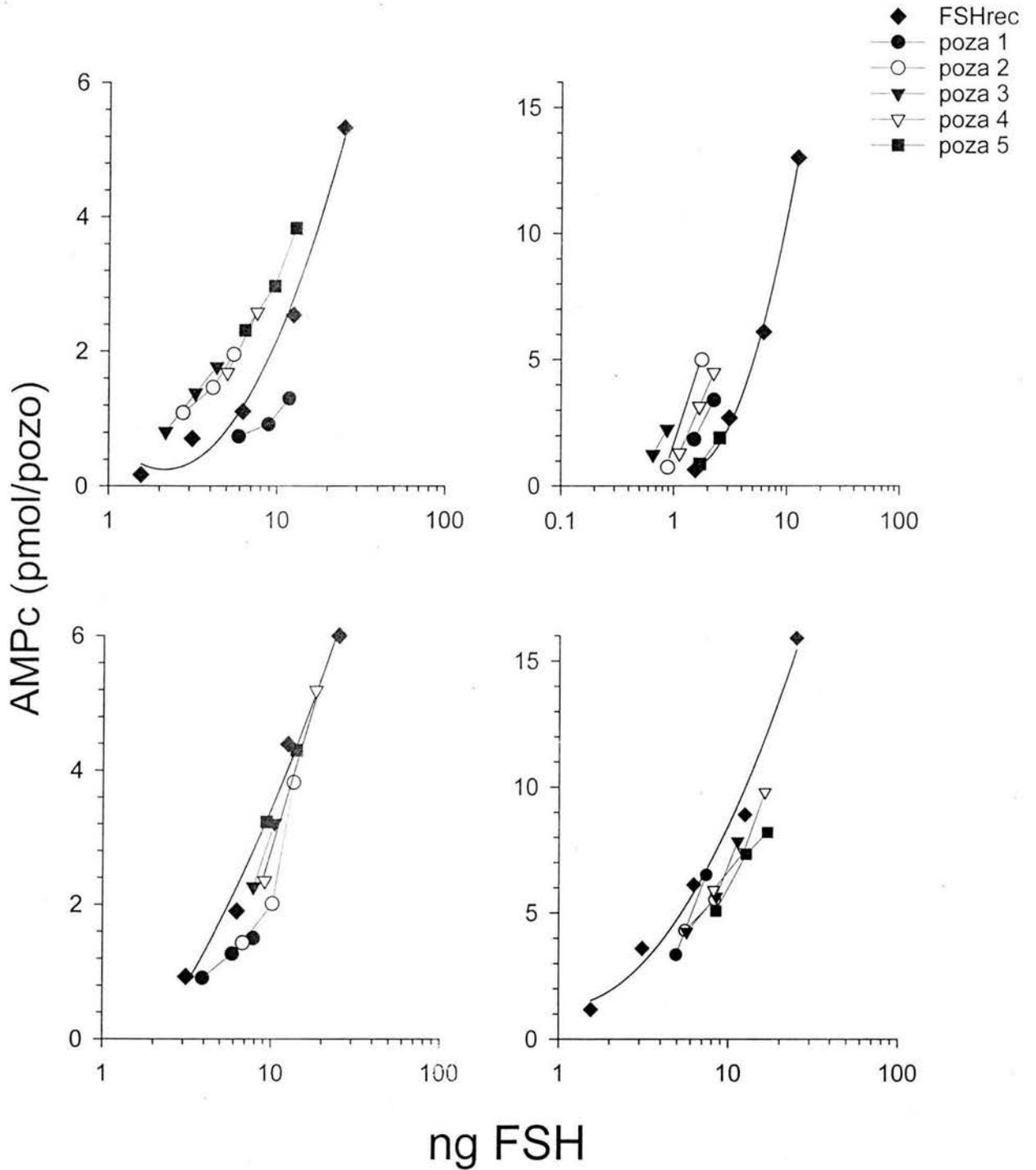
Al hacer las comparaciones del cociente B/I entre las diferentes fases del ciclo (TABLA III), se observó que tanto en condiciones basales (poza 1), como después de los estímulos con 10 $\mu$ g de GnRH (pozaz 2 y 3) y con 90 $\mu$ g de GnRH (pozaz 4 y 5) no existieron diferencias estadísticas significativas. Los cocientes B/I obtenidos durante la fase folicular temprana, después del estímulo con 90 $\mu$ g de GnRH (pozaz 4 y 5) fueron significativamente menores ( $P < 0.05$ ) que los cocientes obtenidos después del estímulo con 10 $\mu$ g de GnRH. En todas las condiciones estudiadas (basal, post-10 y post-90  $\mu$ g de GnRH) los cocientes B/I fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) (de 1.5 a 2.2 veces) durante la fase lútea del ciclo comparados con la fase folicular temprana y la fase preovulatoria.



**Figura 5.** Gráficas representativas de las curvas dosis-respuesta de cuatro mujeres con ciclos menstruales normales en la fase folicular temprana. Cada una de las pozas (1-5) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293



**Figura 6.** Gráficas representativas de las curvas dosis-respuesta de cuatro mujeres con ciclos menstruales normales en la fase preovulatoria. Cada una de las pozas (1-5) fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293



**Figura 7.** Gráficas representativas de las curvas dosis-respuesta de cuatro mujeres con ciclos menstruales normales en la fase lútea. Cada una de las pozas (1-5) fue capaz de inducir la producción de AMPC de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293

TABLA III  
 Actividad Biológica de la FSH  
 Cociente Actividad Inmunológica/ Actividad Biológica (B/I)  
 (X±EE)

Fase del ciclo	POZA				
	1	2	3	4	5
Folicular	0.55±0.06 <sup>a</sup>	0.65±0.04 <sup>a</sup>	0.62±0.06 <sup>a</sup>	0.47±0.04 <sup>a*</sup>	0.43±0.02 <sup>a**</sup>
Preovulatoria	0.49±0.05 <sup>a</sup>	0.54±0.02 <sup>a</sup>	0.62±0.05 <sup>a</sup>	0.53±0.03 <sup>a</sup>	0.50±0.05 <sup>a</sup>
Lútea	0.83±0.07 <sup>b</sup>	1.22±0.20 <sup>b</sup>	1.35±0.30 <sup>a</sup>	1.09±0.26 <sup>b</sup>	0.83±0.13 <sup>b</sup>

\* p<0.05 vs poza 2

\*\* p<0.05 vs poza 3

Diferentes letras en cada columna indican la existencia de diferencias significativas (p<0.05) entre las fases del ciclo.

## DISCUSION

La GnRH liberada de manera pulsátil por el hipotálamo, estimula la secreción de las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH, las cuáles son liberadas de manera pulsátil a lo largo del ciclo menstrual (Fauser y Van Heusden, 1997). Estas glicoproteínas estimulan a las gónadas en sus funciones gametogénica y esteroidogénica (Bousfield *et al.*, 1994). La FSH al igual que otras hormonas peptídicas, es almacenada en gránulos de los gonadotropos y éstos las liberan de manera bifásica. La secreción inicial que sigue a un estímulo submáximo con 10 µg de GnRH (sensibilidad) se debe a que la hormona que es fácilmente liberable se encuentra almacenada en gránulos cercanos a la membrana celular, mientras que la liberación tardía, que ocurre al estimular con una dosis farmacológica de 90 µg de GnRH (reserva), posiblemente requiere de la síntesis de novo y de la activación del sistema de microtúbulos y microfilamentos (Bremmer *et al.*, 1974; Beitins *et al.*, 1977; Conn *et al.*, 1995).

En la presente tesis se analizó de una manera más precisa la secreción de FSH inmunológica y biológicamente activa, durante el ciclo menstrual, así como sus cambios después de estímulos repetidos con GnRH (sensibilidad y reserva hipofisarias). Con este fin se estudiaron 7 mujeres sanas en edad reproductiva. En todas las donadoras, las concentraciones de la FSH a lo largo de las 2 horas basales presentaron fluctuaciones, lo que se puede explicar por la secreción pulsátil y la vida media de la hormona, como ha sido demostrado previamente (Marshall *et al.*, 1991). El haber cuantificado la hormona de manera basal (únicamente durante 2 horas), no permitió determinar y caracterizar la presencia de pulsos, ya que la vida media plasmática de la FSH es de 4 horas aproximadamente (Manzella *et al.*, 1995).

Todos las voluntarias respondieron significativamente al estímulo tanto con 10 µg de GnRH, como al estímulo con 90 µg de GnRH, habiendo sido siempre la respuesta mayor al segundo estímulo (Figura 1). La liberación de una cantidad menor después del primer estímulo indica que el tamaño de la primera poza metabólica es menor, además de que la hipófisis tiene la capacidad de sintetizar una mayor cantidad de hormona después de una segunda administración de

GnRH. Este patrón de respuesta apoya el concepto de la presencia de 2 componentes diferentes en la síntesis y secreción de FSH liberable en la hipófisis anterior; uno que se libera inmediatamente y el otro que se libera de manera tardía (Wang *et al.*, 1976a).

Los carbohidratos en la FSH y en las otras hormonas glicoproteicas juegan un papel muy importante en la estructura y función de la molécula. Los oligosacáridos influyen no sólo en procesos intracelulares como el plegamiento intracelular de las subunidades y la secreción del heterodímero de la glicoproteína, sino también en su sobrevivencia en la circulación y en su capacidad para inducir la señal de transducción a nivel de su receptor en la célula blanco (Sairam, 1989; Bishop *et al.*, 1994, 1995; Fares *et al.*, 1996; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999b). Existe evidencia de que la FSH es producida y liberada en múltiples formas moleculares (Baenziger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Stanton *et al.*, 1992, 1996). Existen numerosos estudios en animales experimentales y en humanos que demuestran que la abundancia relativa de las isoformas en circulación cambia dependiendo del ambiente endócrino que prevalezca en el donador al momento del estudio (Padmanabhan *et al.*, 1988; Dharmesh y Baenziger, 1993; Wide y Naessén, 1994; Wide *et al.*, 1995; Zambrano *et al.*, 1995; Anobile *et al.*, 1998; Damián-Matsumura *et al.*, 1999). En el presente estudio, se utilizó un bioensayo homólogo para estudiar la actividad biológica *in vitro* de la FSH, analizándose también como las variaciones en la abundancia relativa de las glicofomas de FSH secretadas bajo la influencia del ambiente hormonal endógeno cambiante del ciclo menstrual (Padmanabhan *et al.*, 1988; Wide y Bakos, 1993; Zambrano *et al.*, 1995; Anobile *et al.*, 1998) puede afectar la capacidad de la mezcla de las isoformas de FSH circulantes para desencadenar la señal de transducción intracelular al nivel del receptor de FSH humano.

Los resultados mostraron que el cociente B/I de las moléculas de FSH secretadas bajo la influencia de la GnRH endógena (es decir, en condiciones basales) o después de la exposición de la hipófisis a dosis suprafisiológicas de GnRH, incrementaron significativamente durante la fase lútea del ciclo. Este hallazgo concuerda con los resultados de un estudio previo, en el cual los cocientes B/I elevados de la FSH fueron detectados en muestras colectadas

durante la fase lútea media y tardía de mujeres con ciclos normales, esto mediante la utilización de un bioensayo *in vitro* homólogo similar al empleado en el presente estudio (Christin-Maitre *et al.*, 1996a). Sin embargo, los resultados contrastan con algunas observaciones derivadas de la aplicación de sistemas de estudio heterólogos, en los que se utilizaron células de la granulosa de rata, y en los cuales los cocientes B/I no variaron a lo largo del ciclo menstrual (Jia *et al.*, 1986b), o por el contrario, se observó un aumento en el cociente B/I durante la fase folicular temprana (Reddi *et al.*, 1990). Por otro lado, utilizando un bioensayo de aromatización de andrógenos en células de Sertoli de ratón, se observó que el cociente B/I fue más elevado en muestras colectadas durante la fase folicular tardía (Padmanabhan *et al.*, 1988). Estas discrepancias aparentes pueden deberse al uso de diferentes sistemas celulares (heterólogo vs homólogos) y/o puntos finales para evaluar la respuesta o a diferencias en la sensibilidad entre los ensayos. Es importante enfatizar que los resultados derivados del empleo de bioensayos *in vitro* (ya sea heterólogos u homólogos) deben ser interpretados con precaución ya que estos sistemas pueden ser potencialmente alterados por numerosos factores, que aunque no estén relacionados con el ligando, pueden eventualmente modificar la variable analizada. Por ejemplo, en el caso de los sistemas heterólogos podrían existir diferencias entre las especies, lo que haría su extrapolación al humano cuestionable. Además, es bien conocido que en los sistemas naturales la respuesta a un estímulo determinado puede ser modulada por factores endócrinos, parácrinos y autócrinos, cuya influencia en la respuesta determinada en condiciones *in vitro* es sumamente difícil de controlar y por lo tanto es habitualmente ignorada. Por otro lado, en los sistemas celulares homólogos, a pesar de no estar provistos con toda la maquinaria intracelular que puede estar potencialmente involucrada en las vías alternas de señalización (Padmanabhan *et al.*, 1991; Sairam *et al.*, 1996; González-Robayna *et al.*, 2000), poseen una mayor especificidad del receptor hacia su ligando (Zambrano *et al.*, 1999). Por otro lado, aunque la generación de AMPc es considerado generalmente como un indicador confiable de que la activación del sistema receptor-proteína Gs se ha llevado a cabo (Reichert y Dattatreymurty, 1989), éste sólo representa un paso temprano en la transducción de señal intracelular y no

siempre se correlaciona con una respuesta celular final (Padmanabhan *et al.*, 1991; Timosi *et al.*, 2000). Sin embargo, en estudios recientes se ha observado que al excluir la variante de FSH más básica [la cual se comporta como un antagonista de la acción de FSH en bioensayos con sistemas *in vitro* heterólogos, pero no en los homólogos (Dahl *et al.*, 1988; Timosi *et al.*, 1998)], hay una buena correlación entre la respuesta de los estrógenos y la producción de AMPc inducidas por las isoformas en bioensayos celulares heterólogos y homólogos, respectivamente (Zambrano *et al.*, 1999).

El hallazgo de que los cocientes B/I obtenidos de las muestras agrupadas que contenían altas concentraciones de FSH en suero (como las colectadas durante la liberación de FSH provocada por la GnRH exógena) fueron similares a aquellos detectados en las condiciones basales, no apoyan la posibilidad, sugerida previamente, de que la sensibilidad de los inmuno- y/o bioensayos pueda ser la causa de las diferencias detectadas entre los cocientes a lo largo del ciclo menstrual (Reddi *et al.*, 1990; Simoni y Nieschlag, 1991). Más aún, aunque diversas líneas de evidencia sugieren que las diferencias en glicosilación pueden afectar la reactividad de la glicoproteína hacia ciertos anticuerpos (Zerfaoui y Ronin, 1996) y en consecuencia alterar el cociente B/I de la hormona, se ha demostrado, que al menos para las isoformas naturales de FSH, las discrepancias potenciales entre diferentes (policlonal, monoclonal, y policlonal/monoclonal) inmunoensayos son en realidad menores y no alteran significativamente el cociente B/I calculado *in vitro* de las glicofomas de FSH humanas (Zambrano *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1999).

Tomando en consideración lo descrito previamente, se puede concluir que la mezcla de moléculas de FSH liberadas de la hipófisis durante la fase lútea media a tardía del ciclo menstrual contiene formas que poseen una capacidad mayor para desencadenar la señal de transducción a nivel del receptor de FSH humano. Los resultados del presente estudio, sin embargo, no permiten descartar por completo la posibilidad de que la secreción incrementada de isoformas de FSH menos ácidas/sializadas que se presentan durante las fases folicular tardía y preovulatoria del ciclo (Padmanabhan *et al.*, 1988; Zambrano *et al.*, 1995; Anobile *et al.*, 1998) pudo tener algún impacto en la respuesta neta al estímulo gonadotrópico de la célula blanco,

en términos de una respuesta final como la síntesis de estradiol o el activador de plasminógeno tipo tisular (cuya producción es importante para la apropiada maduración del folículo preovulatorio y la ruptura de la pared folicular) o la proliferación de células de la granulosa (Barrios de Tomasi *et al.*, 2001). Con respecto a esto, recientemente se encontró que en estudios *in-vitro* las diferentes glicoformas de FSH pueden tener efectos diferenciales, donde las isoformas más ácidas exhiben una potencia mayor en la estimulación de la expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha$  de la inhibina y las menos ácidas una capacidad aumentada para inducir la P450<sub>AROM</sub> y la producción de ARNm del PA (Timosi *et al.*, 2000). Se requieren estudios adicionales para determinar si la secreción incrementada de isoformas de FSH más ácidas [con una gran capacidad para desencadenar la transducción de señal intracelular (Christin-Maitre *et al.*, 1996a; presente estudio)] durante la fase lútea media a tardía, contribuye a la elevación de inhibina-B observada durante la transición lútea-folicular (Welt *et al.*, 1997). La observación de que la microheterogeneidad de la FSH circulante es similar en muestras tomadas durante la fase folicular temprana a media y la fase lútea del ciclo (Padmanabhan *et al.*, 1988; Zambrano *et al.*, 1995), lleva a sugerir que otros factores, además de la sialización terminal, pueden estar involucrados en la capacidad incrementada de la FSH durante la fase lútea para inducir la señal de transducción. En esta misma línea, recientemente se encontró que las isoformas por carga de la FSH contienen especies con estructuras internas variantes de la cadena de carbohidratos, que pueden influir profundamente en la capacidad de la molécula de la gonadotropina para desencadenar una respuesta biológica en sistemas *in-vitro* (Creus *et al.*, 2001).

Los mecanismos por los que la FSH incrementa su potencia para activar el receptor e inducir señalización intracelular durante la fase lútea del ciclo, no son claros. La exposición de la hipófisis anterior a factores gonadales y/o hipotalámicos, incluyendo esteroides sexuales, inhibina A y GnRH durante esta fase del ciclo en particular, podría estar involucrada en este proceso. La observación en animales experimentales y en humanos de que la progesterona puede bloquear parcialmente los cambios provocados por GnRH o por estradiol en la distribución por carga de las isoformas de FSH secretadas *in-vitro* o *in-*

*vivo* (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992c; Wide *et al.*, 1995), y que la administración de estrógenos reduce la actividad y la expresión de RNAm de algunas enzimas involucradas en la sialización y sulfatación terminales de las gonadotropinas hipofisarias (Dharmesh y Baenziger, 1993; Damián-Matsumura *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999), lleva a pensar que una pluralidad de factores participa en la regulación de la glicosilación de la FSH y, por tanto, en la capacidad de la gonadotropina de inducir la expresión de un efecto biológico cuantificable a nivel de la célula blanco. Respecto a esto, es interesante notar que la administración aguda de dosis bajas o altas de GnRH no modificó el cociente B/I de FSH sérica *in vitro* durante las fases preovulatoria o lútea del ciclo, observación que contrasta con algunos datos que muestran que este péptido liberador favorece la liberación *in vivo* de moléculas de LH bioactivas, particularmente en condiciones asociadas con un ambiente hormonal enriquecido con estrógenos (Veidhuis *et al.*, 1989; Urban *et al.*, 1991). Más aún, se ha observado que la administración de GnRH a dosis similares a las empleadas en el presente estudio, no modifica significativamente la distribución por carga de la FSH secretada a lo largo del ciclo menstrual (Zambrano *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos en el presente estudio lleva a sugerir que cualquiera que sea la naturaleza de las modificaciones estructurales promovidas por el GnRH, ésta no modifica la actividad biológica intrínseca de la FSH a ser liberada de los diferentes pozos funcionales, al menos como se demostró mediante bioensayos con sistemas homólogos. Aunque el cociente B/I de FSH en las mezclas de muestras colectadas después de la administración de 10 µg de GnRH durante la fase folicular temprana no fue diferente del presentado por las muestras en el estado basal, la administración de una dosis suprafisiológica (90 µg) de GnRH se asocian con una ligera disminución en el cociente B/I; esta reducción puede ser secundaria a una reserva limitada de la hipófisis para sintetizar formas bioactivas de la gonadotropina bajo condiciones relativamente hipoestrogénicas altamente demandantes (como las impuestas por la dosis farmacológica de GnRH exógena).

En resumen, usando un bioensayo homólogo *in vitro* del receptor de FSH humano, se detectó que durante la fase lútea media a tardía del ciclo menstrual, la hipófisis libera moléculas de FSH que poseen una capacidad aumentada para

estimular su receptor y activar la transducción de señal intracelular. El incremento selectivo en la potencia de la mezcla de isoformas de FSH circulante durante esta fase del ciclo en particular, podría representar un mecanismo adicional a través del cual la hipófisis puede regular la maduración del conjunto de folículos destinados a ovular durante el siguiente ciclo.

## BIBLIOGRAFIA

Adashi EY, The ovarian follicular apparatus. In : Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Reproductive endocrinology, surgery, and technology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 7-40, 1996.

Albanese C, Christin-Maitre S, Sluss PM, Cowley WF, Jameson JL. Development of a bioassay for FSH using the recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. Mol Cell Endocr 101:211, 1994.

Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ. et al. Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal satate. Mol Hum Reprod, 4:631, 1998.

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.

Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E. et al. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. FASEB J 12:11, 1998.

Baenziger JU y Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides : structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. Biochim Biophys Acta, 947:287, 1988.

Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and folliclestimulating hormone secretion. Endocr Rev 3:91, 1982.

Barrios de Tomassi J, Timossi C, Merchant H. et al. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating hormone isohormones. Mol Cell Endocrinol, 186:189, 2002.

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

Bishop LA, Robertson DF, Cahir N et al. Specific roles for the asparagines-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. Mol Endocrinology, 8:722, 1994.

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

Bleuy MA, Simon JC, Estabez AG, et al. Effect of follicle-stimulating hormone on insulin growth factor-1 stimulated rat granulosa cell desoxyribonucleic acid synthesis. Endocrinology,

131:1223, 1992.

Bousfield GR, Perry WM, Ward DN: Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. En: Knobil E, Neill JD (Eds): The physiology of reproduction, Vol. 2, ed 2. New York, Raven Press LTD, pp 1749-1792, 1994

Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR. et al. Structural features of mammalian gonadotrophins. *Mol Cell Endocrinology* 125:3, 1996.

Braun T, Schofield PR, Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotrophin receptors determine hormone selectivity. *Embo J* 10 :1885, 1991.

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.

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

Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ. et al. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology*, 132:351, 1993.

Combarrous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 13:670, 1992.

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.

Cook CB, Nippoldt TB, Kletter GB, et al. Naloxone increases the frequency of LH (GnRH) pulsatile secretion in hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1099, 1991

Christin-Maitre S, Taylor AE, Khoury RH, et al. Homologous in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) reveals increased FSH biological signal during the mid- to late luteal phase of the human menstrual cycle. 81:2080, 1996a.

Christin-Maitre S, Bouchard P. Bioassays of gonadotrophins based on cloned receptors. *Mol Cell Endocrinol* 125:151, 1996b.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari E. et al. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinology*, 174:41, 2001.

D'Antonio M, Borrelli F, Datola A, et al. Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Hum Reprod* 14:5, 1999.

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

Dahl KD, Stone MP. FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays and their significance. *J Androl*, 13:11, 1992.

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, Maldonado A, et al. Oestrogens regulate pituitary (2-3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinology*, 23:153, 1999.

DeLean A, Munson PJ y Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 235(2):97, 1978.

De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, et al. Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 116:105, 1996.

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

Espey LL, Lipner H. Ovulation. In: Knobil E, Neil JD (Eds.). *The physiology of reproduction*. Vol. 1. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York, pp 711, 1994.

Fares FA, Gruener N, Kraiem Z. The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha-subunit in human thyrotropin bioactivity. *Endocrinology*, 137:555, 1996.

Fauser BCJM Soto S, Czekala NM. et al. Granulosa cell aromatase bioassay: changes of bioactive FSH levels in the female. *J Steroid Biochem*, 33:721, 1989.

Fauser BCJM y Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*, 18:71, 1997.

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, et al. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNac ( $\alpha$  1,2 Man ( that mediates rapid clearance of lutropin). *Cell* 67:1103, 1991.

Filicori M, Santoro N, Merriam GR, et al. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocr and Metab* 62:1136, 1986.

Filicori M y Cognigni GE. Roles and novel Regimens of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Ovulation Induction. *J Clin Endocrin Metab*, 86: 1437, 2001.

Foster CM, Phillips DJ, Wyman T, et al. Changes in serum inhibin, activin and follistatin

concentrations during puberty in girls. *Hum Reprod*, 15:1052, 2000.

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.

Genazzari AR, Genazzari AD, Volpogni C, et al. Opioid control of gonadotrophin secretion in humans. *Hum Reprod* 8(2):151, 1993.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, et al. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11:117,1990.

González-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S. Et al. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/AKT) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinology*, 14:1283, 2000.

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

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

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 81:1401, 1996.

Gudermann T, Brockmann H, Simoni M. et al. In vitro bioassay for human serum follicle-stimulating hormone (FSH) based on L cells transfected with recombinant rat FSH receptor: validation of a model system. *Endocrinology*, 135:2204, 1994.

Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* 73:51, 1995.

Hall, JE, Schoenfeld DA, Martin DA, et al. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 74:600, 1992.

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.

Hawes BE, Luttrell LM, Exum ST, et al. Inhibition of G protein-coupled receptor signaling by expression of cytoplasmic domains of the receptor. *J Biol Chem* 269:15776, 1994.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Hayes F, Hall J, Boepple P, Crowley W. Differential control of gonadotropin secretion in the human: Endocrine role of inhibin, *J Clin Endocrinol Metab*, 83:1835, 1998.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: The "Two cell, Two gonadotrophin" model revised. *Mol Cell Endocrinol*. 100:51, 1994.

Hotchkiss y Knobil E. The menstrual cycle and its control. In: Knobil E, Neil JD (Eds.). *The physiology of reproduction*. Vol. 2. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York, pp 711, 1994.

Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5:76, 1984.

Hsueh AJW, Bicsak TA, Jia XC, et al. Granulosa cell as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Horm Res*, 45:209, 1989.

Jia XC, Hsueh AJW. Granulosa cells aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 119:1570, 1986a.

Jia XC, Kessel B, Yen SSC. Serum bioactive follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle and in hyper- and hypogonadotropic states: application of a sensitive granulosa cell aromatase bioassay. *J Clin Endocr Metab* 62:1243, 1986b.

Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) Action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 18:46, 1997.

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.

Knobil E. The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 163:1721, 1990.

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.

Lee DW, Sheldon RM, Reicher LE. Identification of low and high molecular-weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitors in human follicular fluid. *Fertil Steril* 53:830, 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.

Le Nestour E, Marraoui J, Lahlow N, et al. Role of estradiol in the luteal-follicular transition. *J*

Clin Endocrinol Metab, 77:439, 1993.

Leung PCK, Stell GL. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 13:476, 1992.

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

Manzella SM, Dharmesh SM, Beranek MC. et al. Evolutionary conservation of the sulfated oligosaccharides on vertebrate glycoprotein hormones that control circulatory half-life. *J Biol Chem* 270:21665, 1995.

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 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, Eagleson CA, McCartney CR. Hypothalamic dysfunction. *Moll Cell Endocr* 183:29, 2001.

Mather JP, Moore A, Li Rong Hao. Activins, inhibins and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Cell Biology* 215: 209, 1997.

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.

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

Misrahi M, Beau I, Meduri G *et al.* Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 12:35, 1998.

Moenter SM, Brand RM, Midgley AR *et al.* Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology* 130:503, 1992.

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.

Muttukrishna S, Fowler PA, George L *et al.* Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3328, 1996.

Muttukrishna S, Child T, Lockwood GM *et al.* Serum concentrations of dimeric inhibins, activin A, gonadotrophins and ovarian steroid during the menstrual cycle in older women, *Hum Reprod* 15:549, 2000.

Oliver RL, Kane JW, Waite A *et al.* Do immunoassays differentially detect different acicity glycoforms of FSH? *Clin Endocrinol (Oxf)* 51:681, 1999.

Örgög T, Knobil E. Estradiol and the inhibition of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:5813, 1995

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, Sairam MR, Hassing JM *et al.* Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, 79:119, 1991.

Petraglia F, Zanin E, Faletti A *et al.* Inhibins: paracrine and endocrine effects in female reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11:241, 1999.

Pezzani I, Reis FM, Leonardo Di *et al.* Influence of non-gonadotrophic hormones on gonadal function. *Mol Cell Endocrin*, 161:37, 2000

Pierce JG, Parson TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50:465, 1981.

Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger 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.

Reddi K, Wickings EJ, McNeilly *et al.* Circulating bioactive follicle stimulating hormone and immunoactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *Clin Endocrinol*, 33:547, 1990.

Reichert Jr LE y Dattatreymurty B. The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction and properties of the purified receptor. *Biol Reprod*, 40:13, 1989.

Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endo Rev*, 15:725, 1994.

Sairam MR, Bhargavi GN. A role for glycosylation of the alpha-subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, 229:65-67, 1985

Sairam MR. Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J*, 3:1915, 1989.

Sairam MR, Jiang LG, Yarney TA *et al*. Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of the receptor which inhibits hormone action. *Biochem Biophys Res Commun*, 226:717, 1996.

Selvaraj N, Amsterdam A. Modulation of FSH receptor phosphorylation correlates with hormone-induced coupling to the adenylate cyclase system. *Endocrine*, 6:179, 1997.

Simoni M, Nieschlag E. *In vitro* bioassays of follicle-stimulating hormone: methods and clinical applications. *J Endocrinol Invest*, 14:983, 1991.

Simoni N, Jockenhövel F y Nieschlag E. Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J Endocrinology* 141:359, 1994.

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

Sluss PM, Schneyer AL. Low molecular weight follicle-stimulating hormone receptor binding inhibitor in sera from premature ovarian failure patients. *J Clin Endocr Metab* 74:1242, 1992.

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

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW *et al*. Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cel Endocrinol*, 125:133, 1996.

Steelman SL, Pohley FM. Assay of follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 53:604, 1953.

Stojilkovic SS, Chang JP, Ngo D *et al*. Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem*, 33:693, 1989

Sullivan Mw, Stewart-Akers A, Krasnow JS *et al*. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): A role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocr Metab* 84:228, 1999.

Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves 17:152, 1994.

Tano M, Minegishi T, Nakamura K *et al*. Application of Chinese hamster ovary cells transfected with the recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor for measurement of serum FSH. *Fertil Steril* 64: 1120, 1995.

Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 betaestradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab*, 80:1438, 1995

Tilly JL, Aihara T, Nishimori K *et al.* Expression of recombinant human follicle-stimulating hormone receptor: species-specific ligand binding signal transduction, and identification of multiple ovarian messenger ribonucleic acid transcripts. *Endocrinology* 131:799, 1992.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, Zambrano E *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*, 67:157, 1998.

Timossi CM, Matsumura PD, Ulloa-Aguirre A. Aspectos estructurales y funcionales de la hormona estimulante del folículo. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 36:39, 1999

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, González-Suárez R *et al.* Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocr* 165:193, 2000.

Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P *et al.* Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod* 3:491, 1988.

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

Ulloa-Aguirre A, Schawall 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 Endocr* 134:97, 1992c.

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

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

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

Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA *et al.* Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arc Med Res* 30:420, 1999a.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P *et al.* Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 11:205, 1999b.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropins. *Rep BioMed Online* 1:48, 2000

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios de Tomasi J *et al.* Impact of carbohydrate heterogeneity in function of Follicle-Stimulating Hormone: Studies derived from *in vitro* and *in vivo* models. *Biol Reprod*, 69:379, 2003.

Urban RJ, Veldhuis JD, Dufau ML. Estrogen regulates the gonadotropin-releasing hormone-stimulated secretion of biologically active luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 72:660, 1991.

Valove FM, Finch C, Anasti JN *et al.* Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 135:2657, 1994.

Veldhuis JD, Urban RJ, Beitins IZ *et al.* Pathophysiological features of the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Steroid Biochem* 33:739, 1989

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, Lein A *et al.* The functional changes of the pituitary gonadotrophs during the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 42:718, 1976a

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

Welt C, Martin KA, Taylor AE *et al.* Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 82:2645, 1997.

Wide L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol (Copenh)* 109:181, 1985

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, 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 y Bakos O, More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J Clin Endocrinol and Metab*, 76:885, 1993.

Wide L, Naessén T. 17  $\beta$ -estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocr (Oxf)*, 40:783, 1994.

Wide L, Naessén T, Phillips DJ. Effect of chronic daily oral administration of 17(-oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42:59, 1995.

Wilson CA, Leigh AJ y Chapman AJ. Gonadotrophin glycosylation and function. *J Endocrinol* 125; 1990.

Yen SCC. The human menstrual cycle: In: Yen SCC, Jaffe RB (Eds). *Reproductive endocrinology*. 3rd ed. WB Saunders. Eds. Philadelphia, 1991

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

Ying SY, Murata T. Molecular biology of the gonadal proteins-Inhibin, activin and follistatin. *Genes in Mamm Reprod* 207, 1993,

Yong EL, Baird DT, Yates R *et al*. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function fo human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 74:342, 1992.

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.

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, Zariñán T, Olivares A *et al*. Receptor binding activity and *in vitro* biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems. *Endocrine* 10:113, 1999.

Zeleznik AJ, Fairchild-Benyo D. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In: Knobil E, Neil JD (Eds.). *The physiology of reproduction*. Vol. 2. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York, pp 711, 1994.

Zerfaoui M y Ronin C. Glycosylation is the structural basis for changes in polymorphism and immunoreactivity of pituitary glycoprotein hormones. *Eur J Clin Chem Biochem* 34:749, 1996.