

133
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SIGNIFICANCIA FISIOLÓGICA DE LA
HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA
HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
CRISTINA ALEIDA **L**OLIVARES SEGURA



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Olivares Segura Cristina Aleida

con número de cuenta 8852653-9 con el Título: Significancia Fisiológica de la Heterogeneidad Molecular de la Hormona Estimulante del Folículo.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGA

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Alfredo Antonio	Ulloa Aguirre	<i>[Firma]</i>
Director de Tesis			<i>[Firma]</i>
Dra.	Ma. Eugenia	Gonsebatt Bonaparte	
Biól.	Miguel Angel	Palomino Garibay	
Biól.	Victor M.	Coffe Ramirez	<i>[Firma]</i>
Suplente			
M. en C.	Juan Pablo	Méndez Blanco	
Suplente			

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio "Mecanismo de Acción hormonal II" del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"; bajo la dirección y asesoría del Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, Investigador titular C de esta institución e Investigador Nacional Nivel III, SEP-CONACyT.

DEDICATORIA

- A mis padres, por dejarme formar parte de su existencia, y porque los amo.
- A mis hermanos, Elena, Alfonso, Joaquín, Ana, Pedro, porque son un punto de apoyo muy importante para seguir adelante.
- A mis grandes amigas Nancy y Lety con las que comparto los grandes momentos de mi vida.
- A Alejandra, Patricia, Concepción, María Luisa, Lorena, Hilda, Cathy y Salvador por formar un grupo de amigos inolvidable.
- A Vero por su motivación incansable
- A Angeles, Rosa, y Gloria por mantener la amistad, espaciada pero sincera.
- A todos mis amigos que en un momento dado formaron parte de la carrera que hasta ahora he recorrido.
- A Carlos, por su invaluable compañía y amor.
- A la memoria de Alfredo y Fernando que aunque lejos siempre están presentes.

AGRADECIMIENTOS

El primer agradecimiento lo dirijo sinceramente al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre por haberme asesorado en mi formación académica así como en la realización de este trabajo.

Asimismo quiero darle las gracias a mis compañeros del laboratorio MAH-II, quienes me enseñaron a disfrutar de la investigación y de ahora en adelante, forman parte de mis grandes amigos; a la Dra. Laura Díaz, a los biólogos, Jorgelina Barrios, Pablo Damián, Manuel Jiménez y a la Dra. Patricia Canto.

En particular quiero agradecer de sobremanera a la M en C Elena Zambrano por todo el apoyo brindado, que me sirvió no solo para terminar esta trabajo, sino para continuar en este campo, además le quiero agradecer que me haya permitido conocer a la gran persona que lleva dentro.

También quiero agradecer a todas las personas del departamento de Biología de la Reproducción, especialmente a Silvia por su ayuda incondicional.

Finalmente quiero extender mi agradecimiento al Programa Universitario de Investigación en Salud, por su apoyo económico durante el desarrollo de esta etapa.

INDICE

I.INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	3
1. ESTRUCTURA DE LA FSH	3
2. SINTESIS Y SECRECION	5
3. CONTROL DE LA SECRECION	7
4. FUNCIONES DE LA FSH	11
5. ACCION EN OVARIO	12
6. ACCION EN TESTICULO	14
7. CICLO MENSTRUAL	15
8. HETEROGENEIDAD DE LA FSH	19
III. OBJETIVOS	24
IV. HIPOTESIS	25
V. MATERIAL Y METODOS	26
VI. RESULTADOS	33
VII. DISCUSION	38
VIII.CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFIA	43

I. INTRODUCCION

Los seres vivos se encuentran sujetos a diferentes modificaciones inducidas tanto por su entorno exterior como por su medio interno. Es por eso que cuentan con mecanismos de control que les permiten regular su equilibrio fisiológico. Dichos mecanismos constituyen parte del funcionamiento de dos sistemas sumamente importantes: el nervioso y el endócrino, cada uno con funciones muy específicas. Existe un órgano neuroendócrino que juega un papel muy importante en la regulación del fenómeno reproductivo, el hipotálamo, que tiene la característica de sintetizar y secretar neurohormonas, sustancias que tienen efectos estimulatorios ó inhibitorios sobre las hormonas de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Estos mensajeros, son los que hacen posible la comunicación neuroendócrina. La hormona hipotálamica que controla la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias, la hormona estimulante folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), es la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH. La GnRH es un péptido de vida media corta que se secreta a manera de pulsos, mismos que se reflejan en la secreción episódica de las gonadotropinas. Las hormonas hipofisarias FSH, LH, y la estimulante de la tiroides (TSH), así como la gonadotropina coriónica (CG) producida en la placenta (y en menor grado por otros órganos), pertenecen a una familia de glicoproteínas heterodiméricas compuestas por dos subunidades, la α y la β , unidas por enlaces no covalentes. La subunidad α es idéntica en las cuatro hormonas, mientras que la β es diferente para cada una de ellas y es lo que les confiere especificidad tanto biológica como inmunológica.

Las gonadotropinas juegan un papel central en el fenómeno reproductivo, ya que ejercen un control predominante sobre la función de las gónadas, con el fin de regular y mantener procesos esenciales para la reproducción, tales como la gametogénesis, la esteroidogénesis y

la ovulación. El control del ciclo reproductivo depende de la liberación de GnRH a manera de pulsos. Debe de existir una interrelación coordinada entre la GnRH, las gonadotropinas hipofisarias y los esteroides gonadales (estrógenos, progestágenos y andrógenos), dicha interrelación, es gobernada por efectos de retroalimentación tanto positiva como negativa.

La FSH no es una hormona de estructura única, pues está constituida por un grupo de isómeros o isoformas, y es producida y secretada en múltiples formas moleculares. Estructuralmente estas isohormonas difieren entre sí en el contenido de carbohidratos, principalmente de ácido siálico, siendo ésta la base química más importante para la existencia del pleomorfismo de la hormona (microheterogeneidad).

Se han caracterizado las isoformas de la FSH de diversas especies animales incluyendo a la humana. Cada uno de los isómeros presenta características fisicoquímicas y biológicas particulares, tales como punto isoeléctrico, carga media, unión al receptor, vida media plasmática y potencia biológica *in vitro* e *in vivo*. Los productos de secreción endógena de las gónadas regulan la distribución de las formas moleculares, por lo que la microheterogeneidad varía de acuerdo al estado endócrino del donador.

En la presente tesis se pretendió estudiar la influencia que ejercen los productos de secreción gonadal e hipotalámica (GnRH), sintetizados y secretados de manera cíclica ó tónica, en la heterogeneidad por carga de la FSH circulante.

II. GENERALIDADES

HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE

1.- ESTRUCTURA

La FSH es una glicoproteína heterodimérica que pertenece junto con la LH, la TSH y la CG a una familia de glicoproteínas constituidas de dos cadenas polipeptídicas, la subunidad α y la β . La cadena α de estas hormonas es idéntica, mientras que la β es diferente para cada una de ellas, lo que les confiere especificidad biológica e inmunológica. Ambas cadenas están unidas por enlaces no covalentes de alta afinidad que estabilizan la estructura de la molécula (1). La subunidad α tiene dos características principales, una es que contiene todos o parte de los sitios de reconocimiento necesarios para la unión de la hormona con el receptor en la célula blanco, la otra es que la conformación activa de la cadena β se logra únicamente después de su combinación con la α (2). En la actualidad se conocen las secuencias de aminoácidos para cada subunidad en diferentes especies animales, incluyendo la humana, la cual tiene 92 aminoácidos en la α y 118 en la β (2,3). Cada subunidad mantiene estable su estructura tridimensional mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteína (cinco en la α y seis en la β). Debido a estas uniones la FSH es altamente globular (4-5). A pesar de que la FSH está formada propiamente por dos cadenas peptídicas diferentes, se le considera como una molécula bien definida por su especificidad biológica, inmunológica y de unión al receptor en sus células

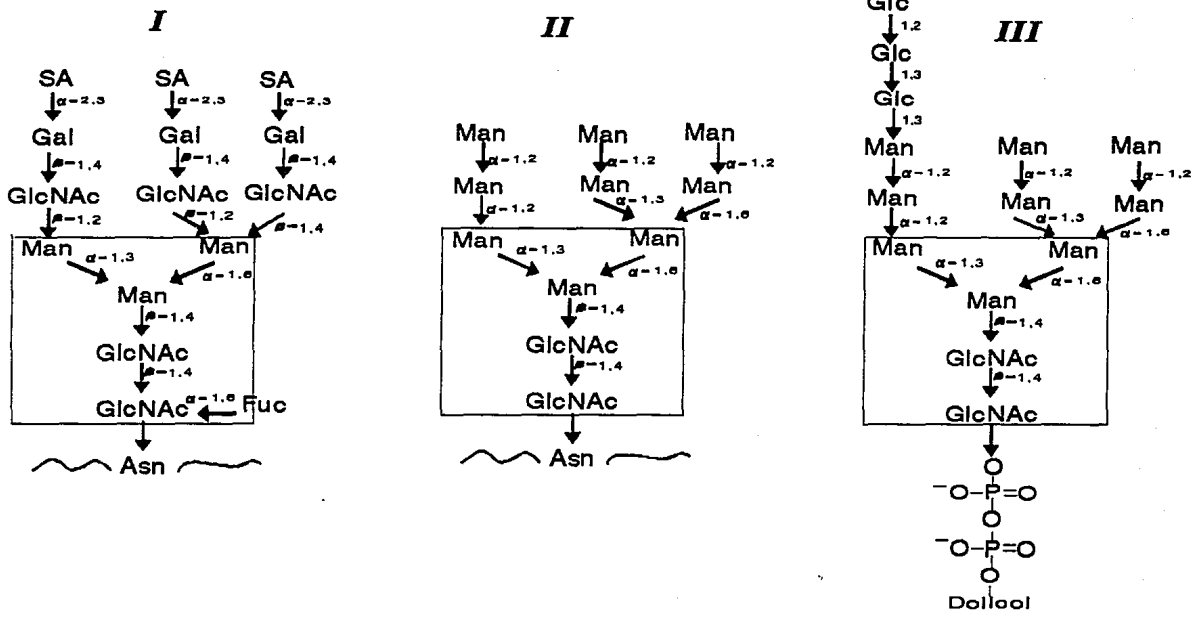


FIGURA 1

Estructura de oligosacáridos unidos a Asn de las glicoproteínas (I,II) y de un oligosacárido precursor unido al dolicol (III).

blanco. Las características químicas generales de la molécula de FSH incluyen además la localización de residuos de oligosacáridos en sitios específicos de ambas subunidades. La FSH humana (hFSH) posee cuatro cadenas laterales de carbohidratos que están unidos a residuos de asparagina (Asn); éstos se encuentran en las posiciones 52 y 78 de la subunidad α así como en las 13 y 30 de la β . Dichos residuos de oligosacáridos son: manosa, fucosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y ácido siálico o neuramínico. Cada oligosacárido está ramificado y es aparentemente heterogéneo en su periferia, con bifurcaciones que terminan principalmente en ácido siálico, así como en fucosa y galactosa (6). El peso molecular de la FSH es de aproximadamente 30,000 daltones; éste no se puede establecer de manera exacta debido a la variabilidad de carbohidratos unidos a la molécula (2). En todos los oligosacáridos unidos a Asn, existe una estructura central común, $(\text{Manosa})_3\text{-}(\text{N-acetil-glucosamina})_2$, Fig(1). Los oligosacáridos sulfatados que se han localizado más comúnmente en la hFSH, contienen únicamente un residuo de sulfato. Además existen otros que pueden o no llevar dos residuos periféricos de manosa unidos a las manosas de la estructura central común(6). Existen radicales de oligosacáridos que contienen un residuo de sulfato y otro de ácido siálico terminales.

La hFSH no contiene concentraciones significativas de sulfato y N-acetil-galactosamina, posee concentraciones proporcionalmente mayores de ácido siálico y galactosa, en comparación con la LH (7,8,9). Los oligosacáridos sializados son estructuralmente heterogéneos; se encuentran como complejos biramificados con o sin una N-acetil-glucosamina bisectante unida a la estructura central común, así como complejos triramificados. Estos carbohidratos le confieren a la molécula de FSH las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas que en última instancia constituyen la base de su heterogeneidad molecular (10,11,12). El ácido siálico terminal, protege

a la molécula de la acción degradante de las enzimas hepáticas. Por esta razón, su presencia es de suma importancia en la regulación de la vida media en la circulación (6). La remoción del ácido siálico de la FSH con tratamientos enzimáticos, disminuye la actividad biológica *in vivo* de la hormona, al reducir su vida media plasmática (7,10,12). La deglicosilación total de la FSH mediante tratamientos químicos, no altera la capacidad de la hormona para la unión al receptor, sin embargo reduce la estimulación de la producción de AMPc, y por lo tanto, disminuye sus efectos biológicos (3).

Por otra parte se ha observado que si se deglicosila únicamente la subunidad α y la β se mantiene intacta, se preserva la propiedad de inducir la producción de AMPc, lo que indica que los carbohidratos presentes en la subunidad α no son esenciales para la producir la respuesta (3).

2. SINTESIS Y SECRECION DE LA FSH

La FSH y la LH son sintetizadas y secretadas por la misma población de células de la adenohipófisis, conocidas como "gonadotropos". Las subunidades que constituyen la FSH (α y β), se sintetizan independiente una de la otra por la expresión de diferentes genes.

La biosíntesis de las subunidades de las gonadotropinas ocurre por el proceso usual de ensamblaje ribosomal de las cadenas peptídicas, seguido de modificaciones post-traduccionales de las cadenas sintetizadas, antes de su secreción. Estas alteraciones incluyen la unión de residuos previamente ensamblados en el grupo amino del radical de Asn de las nacientes subunidades α y β (1).

La transferencia de oligosacáridos a las Asn blanco (dicha Asn debe tener la siguiente secuencia: Asn-X-treonina ó Asn-X-serina, (donde X puede ser cualquier aminoácido), se lleva a cabo en

el lumen del retículo endoplásmico; la enzima que cataliza este evento es una protefna de membrana (glicosiltransferasa), que tiene su sitio activo expuesto sobre la superficie luminal. Los azúcares son primero activados en el citosol por la formación de intermediarios azúcar-nucleótidos, los cuales donan sus "carbohidratos (directa o indirectamente) (13). El oligosacárido está preformado en su totalidad y unido a un lípido (dolicol) que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico, y éste lo une a las Asn blanco de la protefna en síntesis en un solo paso enzimático después de que el residuo pasa de la membrana del retículo endoplásmico al lumen. La transferencia está acoplada a una reacción donde el rompimiento del pirofosfato libera la energía necesaria para que se lleve a cabo la unión. Inmediatamente después, tres residuos de glucosa son removidos de la estructura central común recién adherida (13). Posteriormente se lleva a cabo el transporte de dicha glicoprotefna desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi, en donde termina su maduración (13).

Antes de que sea secretada la hormona, actúan manosidasas y transferasas para el ensamble de los azúcares terminales como son N-acetil-glucosamina, galactosa y finalmente ácido siálico, y en algunas ocasiones fucosa (adherida en la N-acetil-glucosamina de la estructura central).

Los gonadotropos sintetizan una mayor cantidad de subunidad α en comparación con las concentraciones de la cadena β . Tanto en la hipófisis como en el plasma las concentraciones de la subunidad β es relativamente mas baja que la de la α , por lo tanto parece que la formación de las cadenas β podría ser un paso limitante en la biosíntesis de las hormonas glicoprotefcas (1).

Por esta razón se asume que la influencia de hormonas (estrógenos y andrógenos) y factores no esteroideos (inhibina) sobre la producción de la FSH es a través de alteraciones en la síntesis de la subunidad β (2).

Una vez terminado el procesamiento, las glicoproteínas se empaquetan en gránulos de secreción que las protegen de la proteólisis y se transportan hacia la periferia celular mediante la intervención de los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. A llegar a la membrana plasmática se fijan a ella (2). La secreción de FSH ocurre por estímulo de la GnRH hipotalámica. Cuando la GnRH se une a sus receptores específicos en el gonadotropo induce la exocitosis de FSH, lo cual se logra gracias a la fusión de la membrana celular con los gránulos secretores, permitiendo así la liberación de su contenido hacia el espacio perivascular.

3. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE FSH

La biosíntesis y secreción de las gonadotropinas esta estimulada y modulada por la GnRH, hormona hipotalámica que tiene a su cargo el control de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, y quien a su vez está regulada mediante diferentes mecanismos por factores gonadales de naturaleza esteroidea (estrógenos, progestágenos y andrógenos)(1).

La GnRH es un decapeptido en forma de horquilla, producido en el hipotálamo, de vida media plásmatica corta que oscila entre 2 y 8 minutos (14), y que presenta la secuencia de aminoácidos Glu-His-Trp-Ser-Tir-Gli-Leu-Arg-Pro-Gli-NH₂.

Los aminoácidos 1, 6, y 10 de la GnRH son esenciales para el mantenimiento de la configuración de la molécula, lo cual permite su unión a los gonadotropos. Una vez que la GnRH se ha unido a los receptores hipofisarios, induce cambios en la permeabilidad celular; el segundo y tercer aminoácidos (histidina y triptofano), inician una movilización del calcio extracelular y este flujo de calcio da lugar a una elevada concentración intracelular del mismo,

que como resultado final induce la liberación por exocitosis de los gránulos secretores de la hormona. La calmodulina, media el efecto del calcio sobre la liberación de gonadotropinas (15). La unión de GnRH también activa la proteína cinasa C, encargada de la fosforilación de proteínas del citosol (15). Cada gonadotropo contiene aproximadamente 10,000 receptores para el GnRH; una ocupancia del 10% de estos receptores es suficiente para producir la liberación máxima de gonadotropinas (16).

La GnRH hipotalámica, se libera a manera de pulsos, mismos que se reflejan en la secreción de las gonadotropinas, particularmente de la LH (17). Por lo tanto, el control hipotalámico del ciclo menstrual es debido a descargas rítmicas de GnRH. El ciclo menstrual es regulado por una interrelación compleja y coordinada entre la GnRH hipotalámica, las gonadotropinas adenohipofisarias y los esteroides gonadales, mediante una serie de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.

La pulsatilidad de la GnRH varía dependiendo del momento y del estado endocrinológico del sujeto. Por ejemplo, en las noches de la fase folicular, la frecuencia de los pulsos de GnRH está marcadamente reducida. Cuando la concentración plasmática de estrógenos y progesterona empieza a disminuir al final de la fase lútea, ocurre un aumento temporal de la frecuencia de los pulsos de GnRH, incrementándose, durante los primeros días de la fase folicular (18). La frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH, son críticos para determinar la biosíntesis de la subunidad β de la gonadotropina, así como su acoplamiento con la subunidad α y su glicosilación en el gonadotropo (19).

En un modelo experimental *in vivo*, en el que se desconectó funcionalmente el hipotálamo de la hipófisis y posteriormente se administró de manera pulsátil GnRH, a una

frecuencia fisiológica (1 pulso/hora), se comprobó que la reactivación de la secreción, tanto de la LH como de la FSH, se debía a la pulsatilidad de la GnRH. El incremento en la frecuencia (3 pulsos/1h), ocasionó una disminución en la regulación de la respuesta hipofisiaria, y por lo tanto, una marcada reducción de la secreción de LH y FSH . Al disminuir la frecuencia (1 pulso/3 h), se indujo preferencialmente la secreción de FSH (20).

En estudios realizados en humanos en los cuales se bloquearon los receptores para GnRH con antagonistas, se ocasionó en una marcada reducción de la bioactividad, más que en la inmunoreactividad, de la LH y de la FSH, indicando que el cambio en el procesamiento de las gonadotropinas ocurrió como resultado de la deprivación de GnRH. Se requiere de un gasto apropiado de GnRH para la glicosilación y acoplamiento de las subunidades, que genere moléculas de gonadotropinas con mayor actividad biológica (21).

Una característica esencial para el control de la función ovárica, es la pulsatilidad secretora de la LH y de la FSH por la hipófisis. La frecuencia y amplitud de la pulsatilidad de las gonadotropinas, está modulada, en parte, por los esteroides ováricos. En ausencia de ese control gonadal, como en el caso de las mujeres hipogonádicas, se mantienen concentraciones plasmáticas persistentemente elevadas de las gonadotropinas por el incremento de la relación amplitud y frecuencia de sus pulsos. Las mujeres normales tienen un patrón de alta frecuencia y baja amplitud de pulsos de LH durante la fase folicular, y baja frecuencia y alta amplitud durante la lútea, mientras que las mujeres con insuficiencia ovárica, presentan una gran amplitud y frecuencia. El estradiol parece ser más efectivo en modular la amplitud, mientras que la progesterona actúa como un reductor de la frecuencia de la pulsatilidad (22). Durante la fase lútea media, se han detectado secreciones pulsátiles de estradiol, progesterona y LH, sugiriendo

que existe una señal coordinada y sincrónica entre sus pulsos (23).

La secreción tónica de LH y FSH está controlada por mecanismos de retroalimentación negativa. El estradiol y la progesterona tienen un efecto sinérgico, que es la principal señal de la retroalimentación negativa. Si una mujer ciclante normal es ovariectomizada, se interrumpe dicha retroalimentación, lo que origina un incremento abrupto de las concentraciones sanguíneas de las gonadotropinas. El efecto inverso en esta hipersecreción, se obtiene al administrar estradiol a mujeres con hipogonadismo (24).

El inicio del pico preovulatorio de gonadotropinas, es una consecuencia de la retroalimentación positiva inducida por el estradiol (25). Aunque el estradiol puede provocar una retroalimentación positiva y negativa, para que se presente la positiva, es necesario que ésta sea antecedida por la negativa. El principal sitio de acción del estradiol, es la hipófisis, aunque también tiene un importante efecto a nivel hipotalámico (25).

La inhibina está considerada como la proteína ovárica más importante que interviene en el control de la secreción de la FSH en animales de experimentación (26). Es un producto del folículo en desarrollo y del cuerpo lúteo, por lo que se encuentra en grandes cantidades en el líquido folicular. Es un heterodímero formado por una cadena α y una β , unidas por puentes disulfuro, su función es la supresión selectiva de la secreción de la FSH y su acción es independiente de la GnRH. La activina está formada por dos cadenas β de inhibina, tiene el efecto opuesto a esta última, tanto en la secreción hipofisiaria de FSH como en la función del ovario (27).

En la fase lútea, la subunidad α de la inhibina puede actuar en el ovario, inhibiendo la

acción de la FSH, lo que favorece que la foliculogénesis no se inicie sino hasta el fin de la luteólisis (28). También se ha observado que proteínas derivadas de la subunidad α de la inhibina, suprimen la unión de la FSH con su receptor en las células de la granulosa (28). En el ovario la activina incrementa la respuesta de las células de la granulosa a la FSH, preparando al folículo preantral para la respuesta a la FSH (26). Aún cuando en ciertas especies animales (como el roedor) la inhibina ejerce una acción relevante en condiciones fisiológicas, la importancia de esta proteína inhibidora de la secreción de la FSH es aún controversial en el humano(26). En esta especie, las concentraciones de estradiol juegan un papel preponderante en el control de la secreción de la FSH, particularmente durante la llamada transición luteo-folicular, durante la cual ocurre el reclutamiento de una nueva corte (ó cohorte) de folículos, bajo el estímulo de esta gonadotropina.

Otro péptido gonadal supresor de la FSH que se ha aislado y caracterizado es la folistatina. Esta es una glicoproteína formada por una cadena única. Su potencia *in vitro* es equivalente al 5-30% de la inhibina. La folistatina actúa como una proteína que se une a la activina, impidiendo su acción (29). Su importancia tanto en animales de experimentación como en humanos permanece desconocida.

4. FUNCIONES DE LA FSH

La FSH es la hormona responsable de la regulación de aquellos 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 y la secreción de

estrógenos. Sinérgicamente con ésto incrementa la producción del líquido folicular, y aumenta el número de receptores para la LH (1,30). La LH es necesaria para el crecimiento final del folículo y para la ovulación, actuando específicamente sobre las células de la teca y la granulosa. Es además la responsable de la transformación del folículo en el cuerpo lúteo (1). La FSH actúa específicamente en las células de la granulosa del ovario, siendo ésta la única célula blanco que se ha encontrado para ella. En los machos, la FSH interviene junto con los andrógenos en la espermatogénesis y regula además la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP) en el túbulo seminífero (26,31).

En el testículo de los mamíferos, la célula de Sertoli es el blanco de acción de la FSH. Esta hormona regula procesos celulares tales como el flujo de iones, el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, la división y la movilidad celular (32,33,34).

5. ACCION EN OVARIO

Durante los primeros días después de iniciada la menstruación se incrementan progresivamente las concentraciones de FSH y LH; el aumento de la primera precede al de la segunda. En particular, la FSH acelera el desarrollo de un número indeterminado de folículos ováricos primordiales, lo cual implica la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una capa llamada teca alrededor de estos folículos, misma que posteriormente se divide en interna y externa. La FSH activa un sistema enzimático en la mitocondria, el cual aromatiza a los andrógenos producidos en las células de la teca interna por el estímulo de la LH, por lo que conforme el folículo madura, se produce una cantidad de estrógenos cada vez

mayor. La FSH y los estrógenos (principalmente estradiol), secretados hacia el interior del folículo, inducen en las células de la granulosa la síntesis progresivamente mayor de receptores para FSH, lo que aumenta la sensibilidad de éstas a la gonadotropina, estimulando su proliferación acelerada (1,30,35).

Posteriormente bajo la influencia sinérgica del estradiol y la FSH hay un aumento en la producción de fluido folicular, que se acumula en los espacios intercelulares de las células de la granulosa, lo que da origen a la cavidad llamada antró. El folículo hace gradualmente su transición al estado antral; la presencia de estradiol y FSH origina la acumulación sostenida de células de la granulosa y con ello permite continuar con el crecimiento folicular, así como con la maduración del ovocito. Solamente un folículo llegará a ser preovulatorio, mientras que los demás sufrirán un proceso degenerativo que se conoce como atresia. (1,31,35,36).

Mientras que el estradiol ejerce una influencia positiva en la acción de la FSH dentro del folículo en desarrollo, su efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisario, disminuye el soporte de gonadotropinas a los otros folículos menos desarrollados. Sin embargo, el folículo dominante permanece dependiente de la FSH y debe completar su desarrollo previo a la ovulación, lo cual lo logra por su mayor contenido de receptores para FSH. En esta etapa, la FSH induce el desarrollo de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo antral. A la mitad del ciclo, se produce un pico de FSH y otro de LH, ambos esenciales para completar la maduración del ovocito e inducir la ruptura del folículo y la ovulación (-1,10,26,31,36).

Al aumentar la concentración de LH, se inicia la luteinización de las células de la granulosa. Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca, se diferencian en células

luteinizadas, que forman el cuerpo lúteo. Durante esta fase las concentraciones de gonadotropinas son las más bajas de todo el ciclo, debido a la retroalimentación negativa que ejercen tanto el estradiol como la progesterona. Si no hay fecundación, el cuerpo lúteo que se mantuvo en actividad durante la mayor parte de la segunda mitad del ciclo menstrual, empieza a involucionar (proceso llamado luteólisis) unos días después provocando la iniciación de un nuevo ciclo (1,35,37).

6. ACCION EN TESTICULO

En los testículos se lleva a cabo la síntesis de andrógenos y la producción de espermatozoides. Estructuralmente ambas funciones se encuentran bien separadas; en las células de Leydig se efectúa la biosíntesis de andrógenos, principalmente testosterona, en tanto que en los túbulos seminíferos ocurre la maduración de las células germinales hasta espermatozoides, los cuales representan al gameto maduro. La hipófisis participa en el control de ambas funciones mediante la secreción de FSH y LH, necesarias directa e indirectamente para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis (1).

Los túbulos seminíferos constan de dos tipos celulares diferentes, las células germinales y las de Sertoli. Estas últimas dan origen a los compartimientos en los que se alojan las células germinales en desarrollo, donde se les provee de un medio esencial para su diferenciación. También regulan el movimiento de las células germinales en los túbulos seminíferos y la liberación de los espermatozoides.

La acción de la FSH y la testosterona en la espermatogénesis es indirecta, a través de las

células de Sertoli, las cuales son estimuladas para producir compuestos necesarios para la maduración espermática. Tal es el caso de la proteína fijadora de andrógenos (ABP), que une a la testosterona con el fin de proveer una reserva de andrógenos, necesaria para el desarrollo de las células germinales (31).

7. CICLO MENSTRUAL

Se le llama ciclo menstrual a la periodicidad característica de la maduración y liberación de los óvulos en los primates. En la mujer en edad reproductiva, el intervalo promedio de duración de este ciclo es de aproximadamente 28 días.

Existe una asociación entre el sistema hipotálamo-hipófisis-ovario, y los cambios estructurales y funcionales que se presentan en los tejidos del aparato genital: útero, oviducto, endometrio y vagina. El ciclo inicia con la presencia de un sangrado endometrial. Este sangrado transvaginal representa el desprendimiento de la capa funcional del endometrio que experimenta necrosis (38).

Las gonadotropinas hipofisarias, FSH y LH, son el puente de unión entre el ovario y el hipotálamo (1). Juntas, hacen que las células foliculares produzcan cantidades crecientes de estrógenos, los cuales tienen diferentes funciones durante la progresión del ciclo menstrual.

- 1.- Actúan a nivel de la pared uterina, provocando la proliferación del endometrio y su enriquecimiento en vasos sanguíneos.
- 2.-Producen un adelgazamiento del moco cervical, lo que facilita la entrada de los espermatozoides a las porciones internas del tracto reproductor.

3.-Causan un aumento del número de receptores de FSH de las células de la granulosa folicular (39) mientras que inhiben la producción hipofisiaria de FSH.

4.- A concentraciones bajas, inhiben la producción de LH, pero a concentraciones altas, la estimula.

5.-Interactúan con el hipotálamo al encontrarse en concentraciones muy elevadas, induciendo ó inhibiendo la secreción del GnRH (40).

El ciclo menstrual humano puede ser dividido en tres fases funcionales, basado en la estructura, morfología y producción esteroidea del ovario.

A. Fase Folicular (subdividida en temprana, media y tardía)

B. Fase Ovulatoria (transición de folicular a lútea)

C. Fase Lútea (subdividida en temprana, media y tardía)

Durante estas fases, las concentraciones circulantes de gonadotropinas, estrógenos, andrógenos, progestágenos e inhibina presentan un patrón cíclico bien definido.

A. FASE FOLICULAR

A la primera mitad del ciclo se le llama fase folicular, la cual tiene una duración aproximada de 13 días. Está dirigida por la génesis de un folículo preovulatorio, mientras que los demás sufren atresia. Durante los primeros 4 a 5 días de la fase folicular, el aumento de la concentración sanguínea de FSH y de LH, dan lugar al reclutamiento y función folicular.

Bajo la acción de FSH, un grupo de folículos primarios maduran

en folículos secundarios que producen estradiol. Los folículos comienzan a sintetizar más recep-

tores para la FSH en las células de la granulosa. La menor concentración de FSH en esta etapa (día 5 a 7) plantea al grupo de folículos en proceso de maduración una situación competitiva en la cual sólo uno o dos (día 8 a 12), son capaces de sostener su desarrollo por tener una concentración más alta de receptores para FSH, mientras que el resto se atrofia (37,41).

La selección del folículo destinado a ovular, está asociado con la alta capacidad de biosintetizar y secretar andrógenos, estrógenos, progestágenos e inhibina (42). La integridad de la producción de estas hormonas es dependiente de la interacción entre las células de la teca y la granulosa; la actividad de cada una, está modulada por cambios en las enzimas esteroideogénicas del citocromo P-450, y por una variedad de factores de crecimiento que operan a través de mecanismos autócrinos y parácrinos (41).

Las hormonas tróficas LH y FSH, tienen la capacidad inherente de modificar el rango del crecimiento y maduración folicular, en asociación con el microambiente del folículo ovárico.

Tanto los estrógenos como la inhibina son potentes supresores de la secreción de FSH, el tiempo de declinación de la FSH durante la fase folicular tardía puede estar asociada con una supresión secuencial de retroalimentación negativa por estradiol e inhibina (43).

B. FASE OVULATORIA

La ovulación marca la culminación de una serie de eventos iniciados por el "pico" preovulatorio de LH y posiblemente también de FSH. Se caracteriza por el reinicio de la meiosis, la ruptura de la vesícula germinal, la luteinización de las células de la granulosa, la reestructuración de la pared folicular, con la ruptura folicular resultante y la liberación del óvulo maduro fertilizable. La mayor concentración de LH en el mediociclo "pico" de LH es el punto

de referencia de la dinámica intrafolicular hormonal de esta fase. Durante los dos ó tres días previos al pico de LH, se marca el inicio del medio ciclo. El incremento de estrógenos, es paralelo con los de inhibina, progesterona y 17- α -hidroxiprogesterona (17-OHP₄). Este incremento de la concentración de progestágenos es el resultado del proceso de luteinización de las células de la granulosa.

Las capas externas del folículo ovárico son la teca externa e interna, la lámina propia y la membrana granulosa. La lámina propia, y en especial la teca externa, son estructuras ricas en colágena (38). Para que la ovulación ocurra, la colágena debe ser degradada (44). Con el pico preovulatorio de LH, se inician una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, que dan paso a la ruptura folicular y la ovulación. Existen 2 procesos necesarios para que ocurra la ovulación, la teca externa empieza a formar enzimas proteolíticas que disuelven la pared capsular y la debilitan, originando una mayor hinchazón de todo el folículo. De manera simultánea ocurre un crecimiento rápido de nuevos vasos sanguíneos hacia la pared del folículo y al mismo tiempo se secretan prostaglandinas (hormonas locales que producen vasodilatación) hacia los tejidos foliculares. Estos dos efectos producen un aumento en la permeabilidad de plasma hacia el folículo lo que contribuye al aumento de su tamaño, produciéndose la ruptura folicular con evaginación del óvulo (30).

C. FASE LUTEA

La fase lútea tiene una duración aproximada de 14 días, se caracteriza por el cambio del dominio folicular de estrógenos a progesterona. La luteinización de las células de la teca-granulosa después de la ovulación está asociada con una abundancia de enzimas esteroideogénicas en

las células, de un incremento en la síntesis de progesterona y en menor grado de estradiol.

El pico de la progesterona y el de estrógenos en sangre, se presenta alrededor del séptimo día de la fase lútea y tiene relación con la preparación del endometrio para la implantación del blastocisto. Si esta última no ocurre, comienza una declinación lineal en la concentración de progesterona y estradiol e inhibina durante los últimos 4-5 días de la vida funcional del cuerpo lúteo.

La actividad secretora del cuerpo lúteo es dependiente de un soporte adecuado de LH (45). Por ello, aproximadamente al vigésimo quinto día, el descenso en la producción de esta hormona tiene como resultado la imposibilidad para llevar a cabo la esteroidogénesis. En esta fase los niveles de FSH son los más bajos, además de que no se requiere de FSH para mantener al cuerpo lúteo. La combinación de inhibina y estradiol elevados, suprime la secreción de FSH y previene la iniciación de la foliculogénesis. Cuando la concentración de estrógenos empieza a decaer en la fase lútea, ocurre un incremento temporal en los pulsos de la GnRH, la cual aumenta progresivamente durante los primeros días de la fase folicular (17).

Se ha demostrado que una interrupción de la pulsatilidad de LH mediante la administración de antagonistas de GnRH durante varios estados de la fase lútea, induce una rápida reducción de progesterona, estradiol e inhibina, seguido de luteólisis y el principio de la menstruación (46).

8. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA FSH

La FSH se sintetiza y secreta en múltiples formas moleculares (47,48). Las isoformas de la FSH han sido identificadas en muestras obtenidas de la hipófisis anterior (49,50,51,52), el suero y

la orina (53,54) de diversas especies animales, incluyendo la humana. Cada una de estas isoformas presenta características fisicoquímicas y biológicas particulares, tales como punto isoelectrico (pI), carga media, unión al receptor y potencia biológica *in vitro* e *in vivo*. La diversidad de formas de la FSH, está dada por la adición diferencial de carbohidratos en la proteína. Lo que distingue a las isoformas entre sí, es la cantidad y el tipo de residuos de carbohidratos en los oligosacáridos presentes en la proteína, en especial el ácido siálico (o neuramínico) (10,11,12).

Existen por lo tanto diferencias en las proporciones relativas de las formas más o menos ácidas. En términos generales, las isoformas menos ácidas o básicas presentan una mayor actividad de unión al receptor y potencia biológica *in vitro* que las más ácidas. Sin embargo, estas últimas (ricamente sializadas), presentan una vida media plasmática y actividad biológica *in vivo* mayor que las básicas (47,48,49,52,55).

Estas isoformas, al tener diferencias en sus cargas eléctricas, pueden ser separadas por sus puntos isoelectricos (pI) o carga media, mediante técnicas de electroforesis (EF), isoelectroenfoque (IEF) y cromatoenfoque (CF). El número y abundancia relativa de cada isohormona dependerán de la técnica específica empleada para su separación, del origen de la muestra biológica y del estado endócrino del donador (2,56).

Existen diversos estudios que han caracterizado las isoformas de la FSH, demostrando que en general los componentes de FSH son de naturaleza ácida (47,52,57,58), en contraste con los de la LH que se caracterizan por ser de naturaleza básica o neutra. La naturaleza ácida de las isoformas de la FSH, se debe principalmente a la presencia de oligosacáridos con residuos terminales de ácido siálico (6).

La distribución por carga de las isoformas de FSH varía dependiendo de la edad y del sexo. Tanto en roedores como en primates las isoformas ácidas son más abundantes en el varón que en la hembra. Por otro lado, las isoformas de FSH secretadas en edades avanzadas son de naturaleza más ácida que aquellas presentes en edad reproductiva (59,60,61). Asimismo en mujeres jóvenes, se encuentran formas más básicas que en hombres de la misma edad (59). En estos últimos, las especies de FSH intrahipofisaria a la edad de 0.2 a 9 años, son menos ácidas que las encontradas entre los 17 y 42 años.

El roedor, el ovino y el primate, son los modelos animales más ampliamente estudiados en la caracterización del pleomorfismo de la FSH. Utilizando el IEF y el CF como técnicas de separación, se ha podido caracterizar la distribución del perfil de pH, tanto de la FSH secretada, como de la intracelular, y sus variaciones en diferentes condiciones fisiológicas y experimentales. Por ejemplo, durante la maduración sexual de la rata hembra se incrementa la producción de isoformas de naturaleza menos ácida, con pIs de ≥ 5.0 , las cuales tienen una actividad biológica *in vitro* mayor y vida media circulante menor en comparación con las formas más ácidas (55,57,58). Por el contrario, en ratas macho, la producción de formas más ácidas (pIs de 4.9 a 4.0) se incrementa paralelamente al inicio de la espermatogénesis y de la separación balano-prepucial (17).

Existen estudios realizados en suero de humanos en donde se ha demostrado que las mujeres que presentan ciclos menstruales normales, secretan a la circulación casi todas las isoformas de FSH intradenohipofisarias (62,63); sin embargo la proporción relativa de esas isoformas liberadas cambia en relación a la fase del ciclo menstrual. Durante el medio ciclo, cuando el ambiente endócrino se caracteriza por presentar concentraciones de estrógenos

elevados, la distribución de isoformas se caracteriza por un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas, comparado con la fase folicular y la lútea.

Los estudios de FSH urinaria (uFSH) se han realizado principalmente en mujeres postmenopáusicas, de donde se han obtenido estándares internacionales y preparaciones comerciales. En las preparaciones comerciales de uFSH, se han identificado de 5 a 12 isoformas en un rango de pH de 5.8 a <4.0, tanto por el método de IEF como de CF, y la mayor parte de la recuperación se obtiene de las isoformas que eluyen a un pH <4.6, mientras que las otras formas representan menos del 25 % del total de FSH recuperada (56).

Tal parece que la regulación de la producción y secreción de las isoformas es llevada a cabo por la acción de varios factores, dentro de los cuales son de gran importancia los esteroides gonadales y el GnRH (62). En estudios realizados en ovejas prepúberes a las cuales se les indujo pubertad mediante la infusión de GnRH, fue posible provocar un aumento selectivo en la secreción de isoformas menos ácidas (64).

Por otro lado, en el caso de las ratas hembras adultas, la distribución por carga de las diferentes isoformas varía durante el ciclo estral (12). El perfil de distribución de FSH presentado por estos roedores puede alterarse por manipulaciones farmacológicas específicas. Las hipófisis obtenidas de hámsters hembras ovariectomizadas y tratadas con estradiol, presentan todas las formas de FSH identificadas por CF, sin embargo la abundancia de isoformas más o menos ácidas cambia dependiendo del tiempo de exposición a este esteroide. A corto plazo (20 horas) es posible encontrar una mayor cantidad de formas más ácidas, en comparación con los controles ovariectomizados; al aumentarse el tiempo de exposición (30 horas) al estrógeno, se observa un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas. El cambio a las

formas más básicas, se puede prevenir por la administración de fenobarbital (que evita la descarga de GnRH inducida por estradiol) lo que sugiere que la producción de las variedades menos ácidas de la FSH, está regulada a través de un sistema sofisticado mediado por los esteroides gonadales e hipotálamicos (12).

Aunque algunos estudios *in vitro* han sugerido que la secreción de isoformas menos ácidas esta regulada principalmente por GnRH (64), en estudios *in vivo* no se han podido disociar los posibles efectos de los esteroides gonadales (principalmente estrógenos) y del GnRH en la producción y secreción de las diferentes isoformas (62,63).

Se puede concluir que ambos factores regulan el pleomorfismo de la FSH. En tanto que los estrógenos podrían inducir modificaciones en la incorporación de carbohidratos durante la fase de procesamiento y almacenamiento, el GnRH podría alterar la glicosilación inmediatamente antes de la secreción de la gonadotropina.

III. OBJETIVOS

- 1.- **Estudiar el perfil de distribución por carga de las isoformas de la FSH circulante bajo el efecto de los diferentes ambientes endócrinos característicos del ciclo menstrual y del varón.**

- 2.- **Estudiar los cambios en la distribución por carga de las isoformas de la FSH circulante después de estímulos repetidos con GnRH exógeno, bajo el efecto de diferentes ambientes endócrinos .**

IV. HIPOTESIS

La FSH hipofisiaria se secreta en múltiples formas moleculares. Su distribución por carga dependerá del sexo y de los diferentes ambientes endócrinos característicos del varón y la mujer. El estímulo con GnRH exógena a diferentes dosis, amplificará los cambios observados en condiciones basales, de tal forma que será posible identificar las isoformas de FSH presentes en pozas intracelulares de reserva (hormona almacenada) y de nueva síntesis.

Debido a que la principal diferencia estructural entre las diferentes isoformas es la cantidad de ácido siálico incorporados a cada una de ellas, los cambios en la distribución de las isoformas traerán consigo modificaciones en la vida media circulante de la FSH secretada.

V. MATERIAL Y METODOS

1. DONADORES

Se analizó el suero procedente de 13 mujeres y 7 hombres clínicamente sanos. Para el caso de las mujeres la obtención de la muestra se realizó en diferentes fases del ciclo menstrual. fase folicular (FF), medio ciclo (MC), y fase lútea (FL). Todos los sujetos debieron haber cumplido con los siguientes criterios.

A. CRITERIOS DE INCLUSION.

- 1.- Edad entre 21 y 35 años.
- 2.- Ausencia de patologías concomitantes después de una evaluación clínica detallada
- 3.- Consentimiento voluntario de participar en el estudio
- 4.- Sin antecedentes de ingesta reciente de tratamiento hormonal o drogas que pudieran interferir con la función reproductiva
- 5.- En el caso de las mujeres la presencia de 3 ciclos menstruales regulares precedentes, documentados por registro de sangrado menstrual.

B. CRITERIOS DE ELIMINACION

- 1.- Decisión de no continuar en el estudio
- 2.- No responder al estímulo con GnRH
- 3.- Presencia de alguna enfermedad infecto-contagiosa
- 4.- Alteración o irregularidad en el ciclo menstrual durante la ejecución del estudio.

C. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Cada voluntaria se estudió en 3 ocasiones diferentes, correspondientes a cada fase del ciclo menstrual en donde el día 1 del ciclo correspondió al inicio de la menstruación:

- a) días 2-5 FF
- b) días 11-14 MC
- c) días 20-23 FL

Para los varones el estudio se realizó en un solo día.

Los sujetos fueron internados en la Unidad Metabólica del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, una hora antes del inicio de cada estudio, con el fin de que se habituaran al lugar físico. Este inició a las 8:00 hrs, con los sujetos en posición de decúbito dorsal y previamente canalizados en una vena antecubital con un catéter corto. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon las primeras cinco gotas correspondientes a la solución salina, las obtenciones de las muestras se realizaron de la siguiente forma: se extrajo sangre (2.0 mls) cada 10 minutos durante 6 horas (período basal); posteriormente se administraron por vía i.v. 10 μ g de GnRH sintética (Hoechst, Alemania), disueltas en 1 ml de solución salina fisiológica (SSF) y se extrajo sangre (2.0 mls) cada 10 minutos durante 2 horas. Posterior a ésto, se administraron 90 μ g de GnRH i.v. y se repitió el muestreo antes indicado durante 2 horas más. Se obtuvieron en total 60 muestras (160 mls) por sujeto por día de estudio. Durante las 11 horas que duró cada el estudio, los sujetos ingirieron una dieta blanda, y no se les permitió dormir.

II. METODOS.

La sangre obtenida de las 60 muestras (un día de estudio) se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos. El suero resultante se congeló a -20°C en viales de plástico hasta el momento en que se llevó a cabo la primera cuantificación de su contenido de FSH.

Posterior a los estímulos con GnRH exógeno se cuantificó la concentración de FSH de cada suero por el método de radioinmunoanálisis (RIA), con el fin de apreciar la pulsatilidad de la hormona. En el caso de las mujeres, se determinó el contenido de estradiol y progesterona en una poza constituida por 3 de las muestras basales, con la finalidad de corroborar la presencia de la fase del ciclo menstrual correspondiente. En los varones se cuantificó únicamente la concentración de testosterona. Una vez analizado el perfil de respuesta de la FSH después del estímulo con GnRH exógeno, se procedió a formar pozas de las muestras correspondientes a las diferentes fases del ciclo estudiadas, separadas también de acuerdo a las condiciones experimentales: basales o bajo el estímulo de $10\ \mu\text{g}$ y $90\ \mu\text{g}$ de GnRH, para cada sujeto y en forma separada. De tal manera que para cada donadora se constituyeron 9 grupos de muestras:

A: Folicular: basal, GnRH $10\ \mu\text{g}$ y GnRH $90\ \mu\text{g}$

B: Medio ciclo: basal, GnRH $10\ \mu\text{g}$ y GnRH $90\ \mu\text{g}$

C: Lútea: basal, GnRH $10\ \mu\text{g}$ y GnRH $90\ \mu\text{g}$

En el caso de los varones se realizaron 3 grupos de pozas:

Basal, GnRH $10\ \mu\text{g}$ y GnRH $90\ \mu\text{g}$

Cada grupo fue transferido por separado a bolsas de membrana para diálisis con una permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA), y

dializados durante 24 horas a 4°C contra agua destilada desionizada y posteriormente, bajo las mismas condiciones, contra una solución de carbonato de amonio 0.01 M. Posteriormente, cada una de las pozas fue liofilizada y almacenada en congelación a -20°C hasta el día de su separación por cromatoenfoque preparativo.

CROMATOENFOQUE (CF)

El CF es un método que separa proteínas mediante la interacción de la carga de superficie de la molécula con un soporte de carga inmovilizado. Las isoformas son recuperadas en el eluato cuando el pH del gradiente de elución iguala el pI de la proteína. El CF ofrece la ventaja adicional sobre los otros métodos, de que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana de pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y reenocadas a través de gradientes diferentes de pH (65). En este estudio se utilizó un gradiente de pH de 7.5 a 4.0.

El CF de FSH se realizó de acuerdo al método descrito previamente por Ulloa-Aguirre y cols. (66) Figura (2). Se empleó como intercambiador iónico la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en columnas de 20 X 1 cm, equilibradas con 15 volúmenes del amortiguador de partida (Imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4). Cada una de las series de sueros liofilizados, fueron resuspendidos en el menor volumen posible (5-8 ml) del amortiguador Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:8 v/v) pH 4.0.

Antes de depositar los extractos en la superficie de la columna se corrieron 4 ml del amortiguador de corrimiento, con el fin de evitar la exposición de la muestra a valores extremos

CROMATOENFOQUE

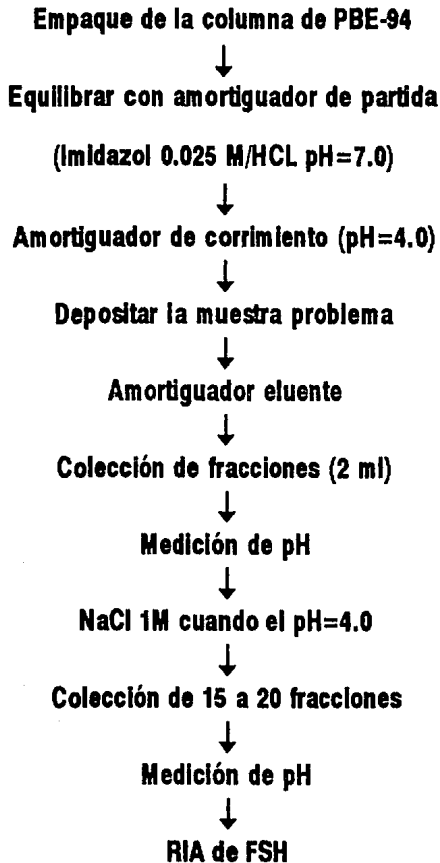


Figura 2

de pH. La muestra fue depositada en la columna y una vez completada su incorporación, se agregó el amortiguador de corrimiento (Polybuffer-74).

Posteriormente se colectaron de 110 a 120 fracciones de 2 ml cada una a 4°C. Cuando en alguna de las fracciones se detectó un valor de pH menor o igual a 4.0, el amortiguador de corrimiento se sustituyó por una solución de NaCl 1M, para recuperar el material que no hubiese eluido dentro del rango de pH 7.4 a 4.0. Hecho esto, se colectaron 15 o 20 fracciones adicionales, y se procedió a medir el pH de cada una. Las fracciones fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta el momento de la determinación de su contenido de FSH por radioinmunoanálisis (RIA).

RIA DE FSH

El RIA de FSH, se llevó a cabo empleando reactivos donados por el National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK, Bethesda, MD, EUA), utilizando como estándar de FSH a la preparación LER-907 (NIADDK). El anticuerpo fue el anti-hFSH-6 a una dilución final de 1:250,000. Como trazador se utilizó el estándar hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcado con Na¹²⁵I (Amersham International Limited, Amersham, Reino Unido) por el método de la cloramina-T descrito por Greenwood y cols (67). Figura (3).

El RIA se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ulloa-Aguirre y cols. (48) Figura (4). La sensibilidad práctica de este RIA fue de 4.6 ng/ml. Con el fin de evitar variaciones interanálisis todas las muestras de un sujeto se incluyeron en una misma corrida de RIA.

Los resultados son expresados en UI/L para las concentraciones en suero y en ng de LER-

907/ml para las fracciones recuperadas de las columnas de cromatoenfoque.

RIA de 17- β -estradiol

Las concentraciones de estradiol en suero se determinaron por el método de RIA, utilizando material donado por el programa de reactivos de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, Suiza).

RIA de Progesterona y Testosterona

Las concentraciones de progesterona en las muestras de suero de las mujeres, y la de testosterona de los varones, fueron determinadas por RIA, empleando reactivos donados por la Organización Mundial de la Salud.

PARAMETROS DE SECRECION DE FSH

El análisis de los parámetros de secreción de la FSH se llevó a cabo empleando los valores de las concentraciones en suero de FSH obtenidos después de la estimulación exógena de GnRH. Los parámetros de secreción; masa secretada, amplitud y área bajo la curva del pulso de secreción de FSH, fueron analizados mediante el método, descrito por Veldhuis y Johnson (68). Asimismo mismo, utilizando el mismo método, se calculó la vida media plasmática de la hormona secretada en respuesta al GnRH administrado en cada fase del ciclo menstrual.

RADIOMARCAJE DE FSH I-3

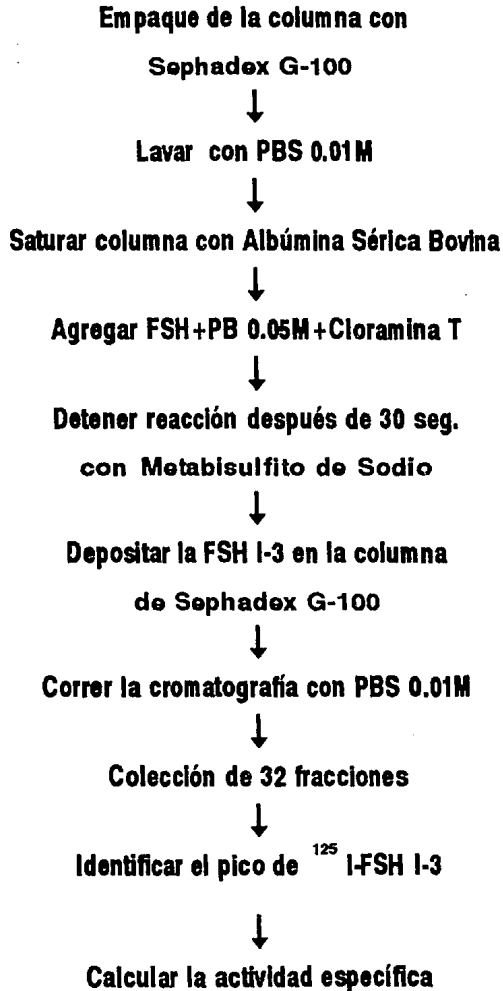


Figura 3

RADIOINMUNOANÁLISIS DE FSH

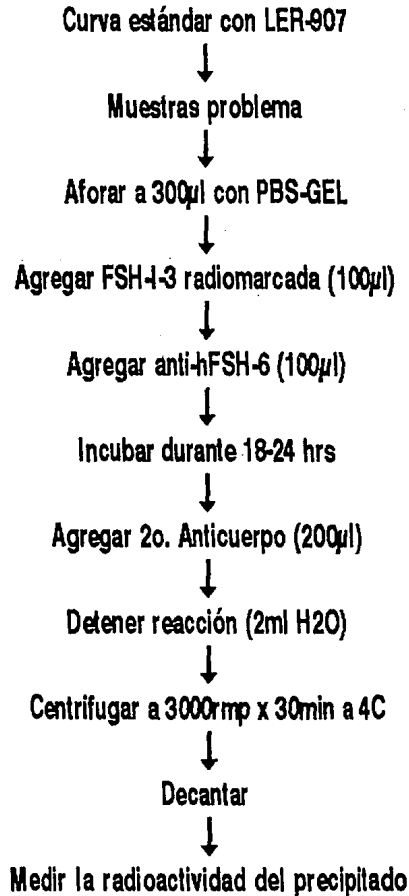


Figura 4

ANALISIS ESTADISTICO

1.- RELACION DE ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTE

Los cambios en la distribución por pH de las isoformas de la FSH circulante durante el ciclo menstrual, se analizarón mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y pruebas de T pareada con corrección de Bonferroni.

2.- PARAMETROS DE SECRECION

Las diferencias entre fases en los parámetros de secreción de FSH (masa secretada, amplitud y área bajo la curva del pulso de FSH), así como en vida media plasmática, fue calculado empleando ANOVA y prueba de T pareada.

RESULTADOS

I. SUJETOS

Del total de mujeres (n=13) que participaron en el estudio, 5 fueron eliminadas por presentar aumento o disminución en cuanto al tiempo de duración de su ciclo en que fueron estudiadas. De tal manera que el número final de mujeres fue de 8, en las cuales se analizaron las muestras obtenidas en las 3 fases de un ciclo menstrual. En cuanto a los hombres, 2 fueron eliminados del estudio; el primero por ser un probable donador infecto-contagioso, y el otro por presentar una respuesta subnormal al estímulo con GnRH.

En la tabla 1 se muestran el día del ciclo en que fueron estudiadas las voluntarias con respecto al día de la ovulación (día 0), así como las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona en las muestras basales obtenidas en las diferentes fases del ciclo menstrual. A partir del primer día de sangrado del ciclo siguiente al estudiado, se contaron en retrospectiva 14 días para calcular el día probable de la ovulación, considerándose éste como el día 0. En todos los casos las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona estuvieron dentro de los valores informados en la literatura (69).

Del mismo modo, las concentraciones basales de testosterona en suero correspondientes a los 5 varones que participaron en el estudio se encontraron dentro de los límites de referencia normales (69). (27.3 ± 5.2 nmol/L; rango, 13 a 33 nmol/L)

Tabla 1. Concentraciones basales de estradiol, progesterona y FSH (media±DE) en las fases folicular, medio ciclo y lútea del ciclo menstrual.

Concentraciones basales en suero

<u>Fase del Ciclo</u>	<u>Día del Ciclo*</u>	<u>Estradiol</u> (pmol/L)	<u>Progesterona</u> (nmol/l)	<u>FSH</u> (UI/L)
Folicular	-12 a -7	153.8±20.5	1.6±0.6	13.7±1.4
Medio Ciclo	-2 a +1	538.7±45.9 [†]	1.5±0.1	19.7±4.3
Lútea	+7 a +11	536.9±37.0 [†]	37.2±8.9 [†]	5.6±0.9 [†]

*Normalizado de acuerdo al día probable de la ovulación

[†]p<0.01 vs folicular

[†]p<0.01 vs medio ciclo y folicular

II.-RESPUESTA DE FSH AL ESTIMULO CON GnRH

En la Figura 5 se muestran los perfiles de respuesta de la FSH en suero a los estímulos con 10 y 90 μg de GnRH en las diferentes fases del ciclo menstrual estudiado. A juzgar por los parámetros de secreción de los pulsos inducidos de FSH (Tabla 2), las respuestas en términos de masa secretada, amplitud del pulso y área bajo la curva fueron significativamente mayores durante el medio ciclo que durante las fases folicular y lútea. En todas las fases del ciclo, la respuesta de FSH a la administración de 90 μg de GnRH fue significativamente mayor que la de 10 μg .

Los valores de los parámetros de secreción de FSH en respuesta a la administración de GnRH en los varones fueron los siguientes:

Parámetros	GnRH 10 μg	GnRH 90 μg
Masa	11.18 \pm 2.38 UI/L	11.32 \pm 0.03 UI/L
Amplitud	0.986 \pm 2.09 UI/L	0.98 \pm 0.19 UI/L/m
Area	177.07 \pm 4.3 UI/L/min	2537 \pm 573 UI/L/min*

*($p < 0.05$)

Los valores de estos parámetros fueron significativamente menores que los presentados por las mujeres en las fases folicular y medio ciclo, y similares a los de la fase lútea.

Los valores de la vida media plasmática de la FSH secretada en respuesta a la administración

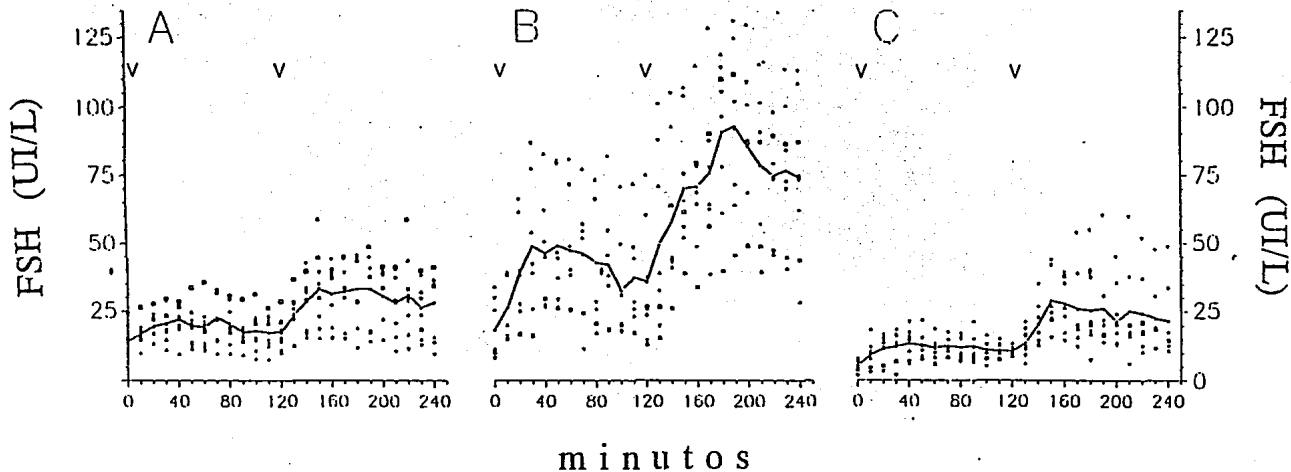


FIGURA 5 Concentraciones en suero de FSH después del estímulo con GnRH exógeno en las diferentes fases del ciclo menstrual. En cada gráfica, la primera punta de flecha indica el momento de la administración de la dosis de $10 \mu\text{g}$ de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de $90 \mu\text{g}$. A, Fase Follicular; B, Medio ciclo; C, Fase lútea. Los diferentes símbolos representan las respuestas de cada voluntaria y la línea continua la media de las respuestas.

Tabla 2. Análisis de los pulsos de FSH secretados en respuesta a GnRH exógena

<u>Fase del Ciclo</u>	<u>Parámetros de Secreción</u>					
	<u>Masa del pulso (UI/L)</u>		<u>Amplitud de la Secreción (UI/L/min)</u>		<u>Area (UI/L/min)</u>	
	<u>GnRH</u>		<u>GnRH</u>		<u>GnRH</u>	
	<u>10*</u>	<u>90</u>	<u>10</u>	<u>90</u>	<u>10</u>	<u>90</u>
Folicular	11.4 (1.2)**	19.4 [†] (2.4)	1.0 (0.1)	1.7 [†] (0.2)	2464 (252)	3777 [†] (479)
Medio ciclo	35.8 ^{&} (4.2)	50.2 ^{&†} (6.3)	3.2 ^{&} (0.4)	4.5 ^{&†} (0.6)	5145 ^{&} (905)	8141 ^{&†} (1392)
Lútea	11.3 (2.0)	18.1 [†] (3.5)	1.0 (0.2)	1.6 [†] (0.3)	1435 (158)	2059 [†] (490)

*Microgramos de GnRH.

**Error estándar.

[&]p < 0.05 vs folicular y lútea.

[†]p < 0.05 vs 10 µg en la misma fase del ciclo.

de GnRH en las mujeres voluntarias se muestran en la Tabla 3. Los valores correspondientes al pulso de FSH secretado en respuesta a 10 μg de GnRH durante el medio ciclo fueron significativamente ($p < 0.05$) menores que los observados en respuesta a 10 y 90 μg de GnRH en las fases folicular y lútea y a 90 μg en el medio ciclo.

III.- PERFIL DE DISTRIBUCION POR CARGA DE LAS ISOFORMAS DE LA FSH CIRCULANTE

A.MUJERES

Se obtuvieron 9 diferentes grupos de muestras de cada voluntaria, correspondientes a los distintos días y condiciones del estudio:

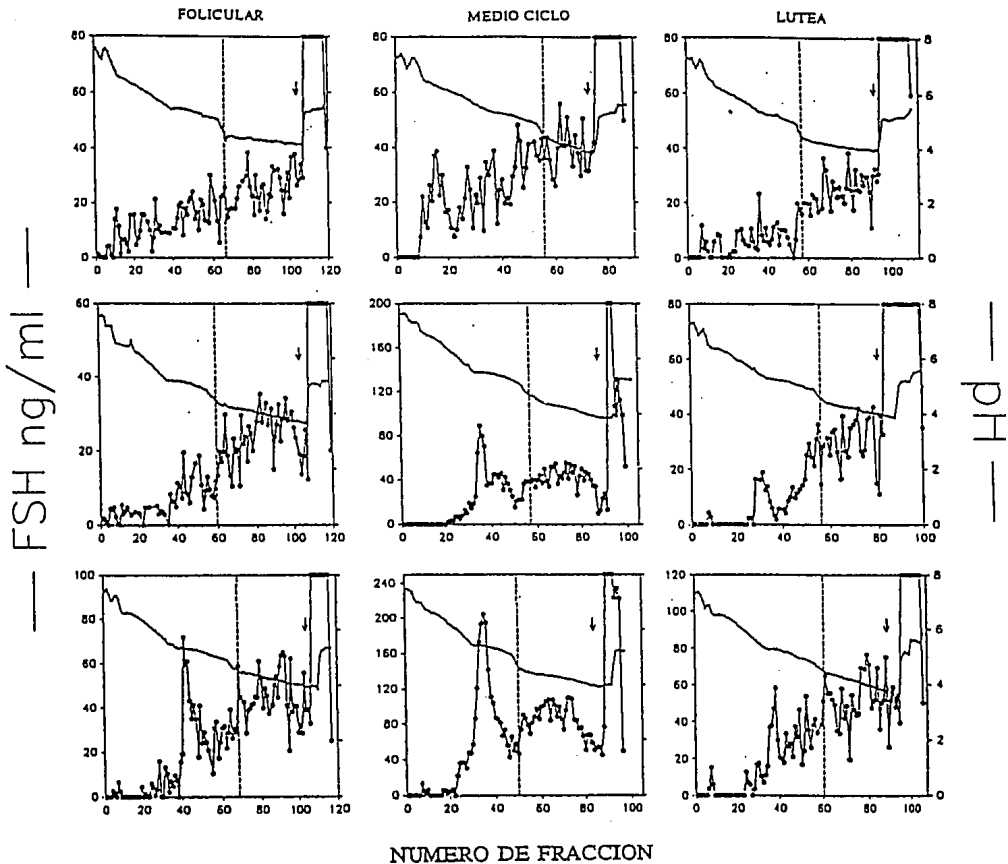
- a: Fase folicular: basal, GnRH 10 μg y GnRH 90 μg
- b: Fase mediociclo: basal, GnRH 10 μg y GnRH 90 μg
- c: Fase lútea: basal, GnRH 10 μg y GnRH 90 μg

Cada una de estas muestras fue sometida a separación por CF con el objeto de analizar la distribución por carga de las diferentes isoformas de la FSH secretadas durante el ciclo menstrual. La Figura 6 muestra un perfil representativo de la distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por CF. Se detectaron la presencia de múltiples formas moleculares de la FSH las cuales fueron identificadas en un rango de pH de 7.4 a 4.0, así como después de la adición de NaCl 1M a la columna (pico de sal). Sin embargo, la abundancia relativa de las diferentes isoformas se modificó significativamente dependiendo de la fase del

Tabla 3. Vida media plasmática de los pulsos de FSH secretados en respuesta al estímulo con GnRH exógena.

<u>Fase del Ciclo</u>	<u>Vida Media</u>	
	(minutos)	
	GnRH	
	<u>10 µg</u>	<u>90 µg</u>
Folicular	221.6±37.5	271.0±47.3
Medio Ciclo	107.8±11.4 [†]	275.6±75.6
Lútea	243.8±40.9	198.2±40.3

[†]p < 0.05 vs folicular y lútea con la misma dosis de GnRH



NUMERO DE FRACCION

FIGURA 6

Patrón de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por cromatografía. Las gráficas superiores muestran el perfil en condiciones basales en tanto que las intermedias y las inferiores los perfiles encontrados después de la administración de 10 y 90 µg de GnRH respectivamente. La fase folicular corresponde al día -8, el medio ciclo al día -1 y la fase lútea al día +8 del ciclo menstrual de una voluntaria. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 4.50. La flecha indica la adición de 1 M de NaCl a las columnas de cromatografía.

ciclo y de la dosis de GnRH administrada. Durante el medio ciclo, la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas ($\text{pH} > 4.5$) fue mayor que la observada en las fases folicular y lútea media, tanto en condiciones basales como después de la administración de GnRH (Figura 6 y 7). Con el objeto de analizar cuantitativamente y de comparar los cambios en la distribución y abundancia relativa de las diferentes isoformas secretadas en cada fase del ciclo, los perfiles de distribución por CF se dividieron en 2 zonas de pH tomando como punto de corte el valor de pH de 4.5. Las cantidades de FSH recuperadas en valores de pH menores y mayores a este valor, fueron entonces utilizadas como base para calcular la relación de isoformas con $\text{pH} < 4.5 / > 4.5$ y establecer la presencia de diferencias entre las diversas fases. El valor de pH de 4.5 como punto de corte, fue establecido en base a las diferencias en actividad biológica *in vitro* y vida media plasmática presentadas por las isoformas intrahipofisarias (48).

La abundancia relativa de las isoformas menos ácidas (pH de elución > 4.5), se incrementó de manera selectiva durante el medio ciclo (Figura 8), con respecto a las fases folicular y lútea. Este incremento en la secreción de isoformas menos ácidas se observó en todas las condiciones estudiadas (basal, GnRH 10 μg y GnRH 90 μg). La expresión máxima de este cambio en el medio ciclo se observó en una voluntaria estudiada en la mañana del día probable de la ovulación (Figura 7). La administración de 90 μg de GnRH en la fase folicular, de 10 y 90 μg en el medio ciclo y de 90 μg en la fase lútea, se distinguieron por inducir de manera selectiva la secreción de isoformas con valores de $\text{pH} = 6.24-5.24$ (Figura 6 y 7). La distribución de las isoformas secretadas en la fase folicular fue discretamente más ácida que la secretada durante la fase lútea (Figura 8).

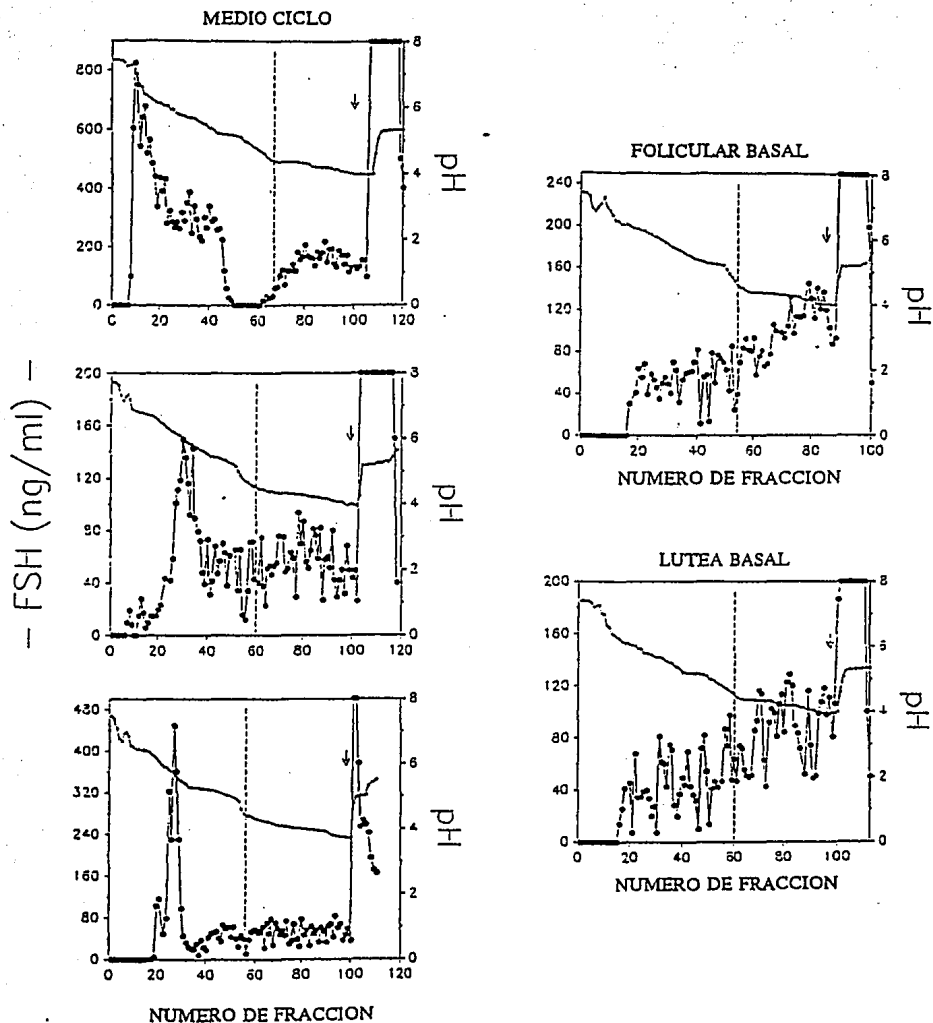


FIGURA 7 Patrón de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por cromatoenfoque. *Izquierda:* Medio ciclo (día 0) en condiciones basales (gráfica superior) y después de la administración de 10 µg (gráfica intermedia) y 90 µg (gráfica inferior) de GnRH. *Derecha:* Fase folicular (día -7; gráfica superior) y fase lútea (día +9; gráfica inferior) en condiciones basales. La línea vertical discontinua señala un valor de pH de elución de 4.50. La flecha indica la adición de 1 M de NaCl a las columnas de cromatoenfoque. Todos los perfiles fueron obtenidos de la misma voluntaria.

Relación de isoformas de la FSH
(pH <4.5/pH >4.5)

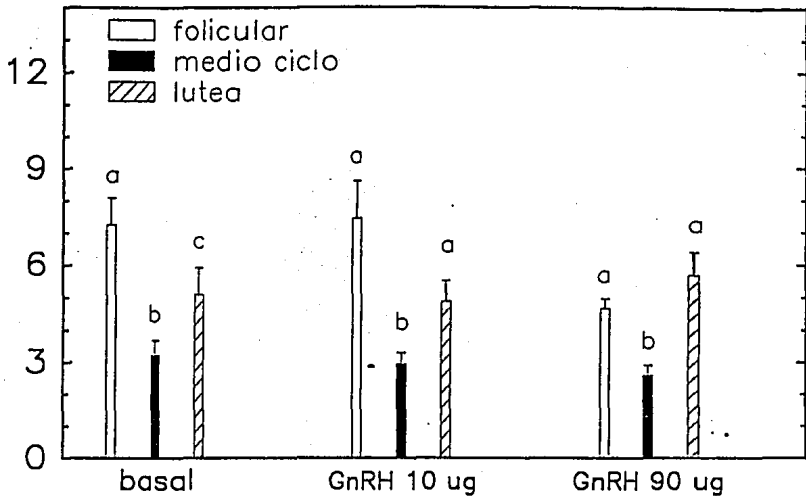


FIGURA 8 Cambios en la relación entre las isoformas de la FSH circulante con pH de elución < 4.5 y > 4.5 durante el ciclo menstrual. Para cada triplete, las barras identificadas con diferentes letras son estadísticamente diferentes.

B: VARONES

La Figura 9 muestra un perfil representativo de distribución por pH de la FSH circulante después de su separación por CF. Las isoformas secretadas en condiciones basales fueron predominantemente ácidas (pH < 4.5) y la relación de las isoformas con pH < 4.5 / > 4.5 no se alteró significativamente después de la administración de GnRH. La relación de isoformas < 4.5 / > 4.5 fueron las siguientes:

Basales = 6.2 ± 0.9

Después de 10 μg de GnRH = 5.0 ± 0.6

Después de 90 μg de GnRH = 4.7 ± 0.2

($p < 0.05$ vs medio ciclo bajo todas las condiciones; no hubo diferencias significativas con la fases folicular y lútea).

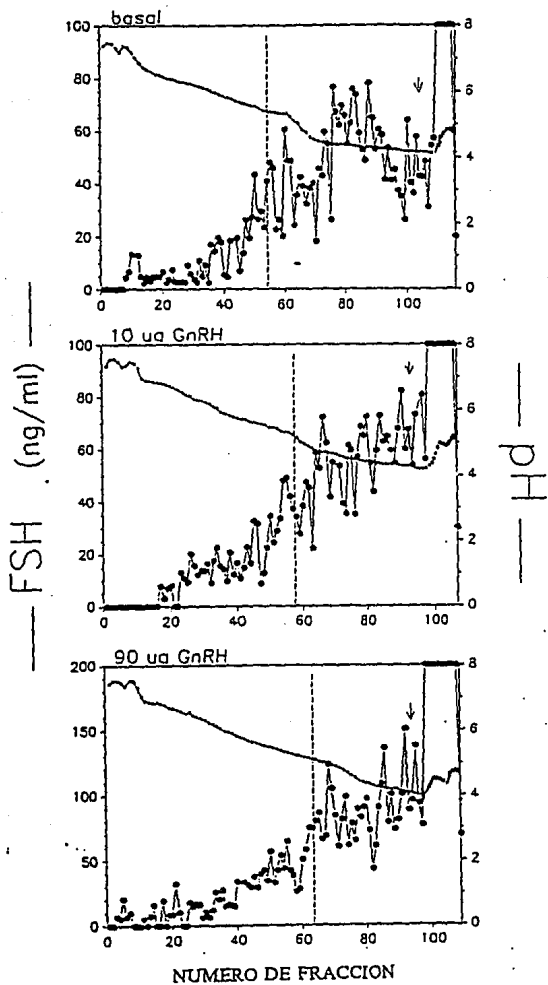


FIGURA 9

Patrón de distribución por pH de la FSH circulante de un varón normal, después de su separación por cromatofoco. Las gráficas superiores muestran el perfil en condiciones basales en tanto que las intermedias y las inferiores los perfiles encontrados después de la administración de 10 y 90 μg de GnRH respectivamente.

VII. DISCUSION

De acuerdo con lo encontrado en este estudio, es posible afirmar que el gonadotropo regula de manera directa la vida media circulatoria y la intensidad del estímulo de FSH a través de cambios en la estructura molecular de la hormona. La FSH, por lo tanto, no sólo es producida sino también secretada por la hipófisis en múltiples formas moleculares, cuya abundancia relativa varía dependiendo del sexo y el estado endócrino de los donadores.

Durante las fases folicular y lútea del ciclo menstrual predominaron las isoformas circulantes más ácidas, en contraste con lo encontrado en el medio ciclo, en el cual ocurrió un aumento selectivo de la secreción de isoformas menos ácidas, lo que confirma y amplía estudios previos similares, en donde se analizaron los cambios de heterogeneidad por carga de la FSH circulante en condiciones basales (62,63). En lo relacionado a los varones, el patrón de heterogeneidad por carga de la FSH circulante fue muy similar a la presentada por las mujeres en las fases folicular y lútea, durante las cuales se observó una baja respuesta al GnRH exógeno. Esta diferencia entre sexos en el tipo de moléculas, podría ser debido a la presencia de diferentes ambientes endócrinos (androgénico vs estrogénico) así como a la existencia de distintos patrones de variabilidad en la secreción episódica de la GnRH (tónico vs cíclico).

Existen estudios en roedores en los cuales se ha demostrado la existencia de cambios en la heterogeneidad por carga de la FSH intrahipofisiaria durante el ciclo estral (12,66). Por ejemplo, durante la mañana tardía y la tarde del día del proestro y durante la mañana del estro, la abundancia de las isoformas intrahipofisiarias menos ácidas se incrementa significativamente (12). Las isoformas de la rata hembra en estro persistente y de la rata macho adulta son aún más ácidas que las presentadas por la hembra ciclante en los días del diestro 2 (7,12,52,66). Todos

estos resultados sugieren conjuntamente que existen dos condiciones endócrinas que determinan la producción de isoformas de FSH, ya que en un ambiente rico en esteroides ováricos (particularmente en estrógenos) y en GnRH se favorece la síntesis y secreción de isoformas menos ácidas de la FSH, en tanto que en un ambiente caracterizado por la presencia predominante de andrógenos, la hipófisis tiende a producir isoformas más ácidas, con mayor cantidad de ácido siálico (7,10).

En otra serie de estudios se ha pretendido explorar un aspecto aún controversial relacionado con la regulación de la síntesis de las isoformas de FSH. Algunos estudios *in vitro* sugieren que el GnRH es el principal inductor de la producción de isoformas menos ácidas y que los esteroides ováricos (estrógenos y progesterona) y la activina-A, no intervienen de manera significativa en los cambios estructurales (70). Por otro lado la administración de GnRH a ovejas hembra prepúberes, dió como resultado un incremento concomitante en la secreción de isoformas menos ácidas de la FSH (64). Estas observaciones indicarían que el factor primordial que regula la producción de isoformas menos ácidas es el GnRH. Por el contrario los resultados de otra serie de estudios han sugerido que posiblemente son los estrógenos los responsables de los cambios en la heterogeneidad por carga observados durante el ciclo menstrual. La administración de estrógenos a pacientes con disgenesia gonadal induce un aumento selectivo en la secreción de isoformas de FSH menos ácidas (62). Wide y cols. han asimismo demostrado que la administración de estrógenos a mujeres postmenopáusicas induce la secreción de isoformas de FSH cargadas menos negativamente que las de mujeres no tratadas (71). En conjunto todas estos estudios indican la existencia de una pluralidad en los factores que intervienen en la regulación de la heterogeneidad molecular de la FSH.

En el presente estudio fue posible observar un aumento en la secreción de isómeros con $pI_s > 4.5$ exclusivamente durante el medio ciclo, el cual se caracterizó por presentar una sensibilidad aumentada al GnRH y una elevada concentración de estrógenos circulantes. Por el contrario, durante la fase lútea, en la cual la sensibilidad hipofisiaria al GnRH se encontró notablemente disminuida, aún en presencia de elevadas concentraciones circulantes de estradiol y progesterona, no fue posible detectar este incremento en la abundancia de los isómeros menos ácidos. Estos resultados sugieren que ambos factores, GnRH y estradiol, son los responsables de los cambios en la estructura molecular de la FSH secretada durante el medio ciclo y que posiblemente la presencia de altas concentraciones de inhibina (24) o de progesterona durante la fase lútea, podrían haber contrarrestado o aún inhibido los efectos atribuibles al estradiol.

El hallazgo de un aumento en la secreción de isoformas menos ácidas de la FSH durante la fase preovulatoria, así como del predominio de formas fuertemente ácidas durante las fases folicular y lútea, podría tener varias implicaciones fisiológicas. Las isoformas intrahipofisarias menos ácidas poseen una actividad biológica *in vitro* (o sea a nivel de la célula blanco) mayor que sus análogos fuertemente ácidos y posiblemente esta sea también una característica de las isoformas secretadas. Las isoformas menos ácidas son depuradas de la circulación con mayor rapidez que las más ácidas, las cuales al contener un mayor contenido de ácido siálico, tienen un tiempo de vida media plasmática mayor (10,48,55). La combinación de ambas características daría teóricamente como resultado la secreción de una señal gonadotrópica potente pero breve durante el medio ciclo; este tipo de estimulación podría ser de importancia para el fenómeno de la ovulación. De hecho en el presente estudio se detectó una reducción significativa de la vida media plasmática de la FSH secretada en respuesta al estímulo con $10\mu g$ de GnRH en el medio

ciclo. Por otro, lado el predominio de isoformas fuertemente ácidas durante las fases folicular y lútea, podría ser fundamental durante la etapa del crecimiento folicular y en la transición lúteo-folicular, etapa en la cual ocurre una secuencia de cambios dinámicos que conllevan a la terminación de la función lútea y la reactivación del sistema GnRH-gonadotropinas (16). Estas posibles implicaciones fisiológicas del polimorfismo de la FSH concuerdan con el hallazgo de que la vida media circulante de la FSH secretada en respuesta a la administración de dosis bajas de GnRH en estas fases fue significativamente mayor que la correspondiente al medio ciclo y semejante a la informada en la literatura (72).

VIII. CONCLUSIONES

1. En el humano, la FSH es secretada en diferentes formas moleculares cuya abundancia relativa depende del estado endócrino del donador al momento de la obtención de la muestra.
2. La coexistencia de un ambiente endócrino rico en estrógenos y de una alta sensibilidad hipofisiaria al GnRH, tal y como ocurre durante el período preovulatorio, se asocia a un incremento en la secreción de isoformas menos ácidas de la FSH. Este incremento de las formas menos ácidas, puede ser el resultado del aumento en las concentraciones circulantes de estradiol, de la exposición progresivamente mayor al GnRH, o de la coexistencia de ambos factores.
3. El aumento en las concentraciones circulantes de isoformas menos ácidas durante el medio ciclo, 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.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Yen SSC, Jaffe R. Reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management. W. B. SaundersCo. 3a ed. USA, 1991, pp: 75-108, 115-133, 140-150, 273-308.
2. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. (1983). Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev*, 4:179-211.
3. Hsueh AJW, Bicsak TA, Jia XC, Dahl KD, Fauser BCJM, Galway AB, Czekala N, Pavlou SN, Papkoff H, Keene J, Boime I. (1989). Granulosa cell as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Rec Prog Horm Res*, 45: 209-277.
4. Fujiki Y, Rathman P, Saxena BB. (1980). Studies on the disulfure bonds in human pituitary follicle stimulating hormone. *Biochim Biophys Acta*, 624: 428-435.
5. Rathman P, Tolvo A, Saxena BB. (1982). Elucidation of the disulfide bond position of the β -subunit of human follicle-stimulating hormone. *Biochim et Biophys Acta*, 708:160-166.
6. Baenziger JU, Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and tyrotropin. *Biochim et Biophys Acta*, 947: 287-306.
7. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián Matsumura P, Chappel SC. (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Rep*, 3:491-501.

8. Nilsson B, Rosen SW, Weintraub BD, and Zopf DA. (1986) *Endocrinol.* 119: 2737-2743
9. Grimek HJ, Gorski J, and Wentxorth BC. (1972) *Endocrinology* 104:140-147.
10. Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. (1984) Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod.* 30: 382-387.
11. Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. (1982). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary (AP) FSH: Receptor binding activity of each AP-FSH species separated by isoelectric focusing XXII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. Morelia Mich.
12. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Domínguez R. (1988). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*, 38: 70-78.
13. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1983) *Molecular Biology of the cell.* Garland Publishing, Inc. New York, NY USA.
14. Hall JE, Schoenfeld DA, Martin KA, Crowley WF. (1992). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the luteal follicular transition. *J Clin Endocrinol metab*, 74: 600-607.

15. Jeffcoate S, Greenwood R, Holland D. (1974). Blood and urine clearance of lutenizing hormone releasing hormone in man measured by radioimmunoassay. *J Endocrinol*, 60:305-309.
16. Clayton RN. (1982). Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: Evidence for biphasic regulation. *Endocrinology*, 111:152.
17. Filicori M, Marseguerra M, Mimmi P, Bolelli G, Franceschetti F, Possati G, Flamigni C. The pattern of LH and FSH pulsatile release: Physiological and clinical significance. En Flamigni C, Givens JR (eds). *The Gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females*, New York, Academic Press, 1982, pp:36-375.
18. Clarke IJ, Cummins JT. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized wew. *Endocrinology*, 111: 1737-1740.
19. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC (1989). The Frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 125:917.
20. Rossmanith WG, Yen SSC. (1987). Sleep-associated decrease in LH pulse frequency during the early follicular phase of the menstrual cycle: Evidence for an opioidergic mechanism. *J Clin Endocrinol Metab*, 65:715-721.

21. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant RM, Belchetz PE, Knobil E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 109:371-376.
22. Mortola JF, Sathanandan M, Pavlou S, Dahl DK, Vale W, Rivier J, Yen SSC. (1989). Suppression of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist: Pharmacodynamic studies. *Fertil Steril*, 51:957-960
23. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF. (1986). Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 62:1136.
24. Le Nestor E, Marraoui J, Lahlow N, Roger M, De Ziegler D, Bouchard P. (1993). Role of estradiol in the luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* (en prensa)
25. Rossmanith WG, Laughlin GA, Mortola JF, Johnson ML, Veldhuis JD, Yen SSC. (1990). Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by the midluteal phase corpus luteum: Temporal link to luteinizing hormone pulses. *J Clin Endocrinol Metab*, 70:990.
26. Findlay JK. (1993). An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*, 48:15-23.

27. Rabinovici J, Spencer SJ, Doidi N, Goldsmith PC, Schwall R, Jaffe RB. (1992). Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin. Invest*, 89:1528-1536.
28. Knight PG, Muttukrishna S, Groome N, Webley GE. (1992) Evidence that most of the radioimmunoassayable inhibin secreted by the corpus luteum of the common marmoset is of a non-dimeric, biologically inactive form. *Biol Reprod*, 47:554-560.
29. Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzma G. (1993). Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*, 132:431-443.
30. Ham AW, Cormack DH. *Tratado de Histología*, Nva. Ed. Interamericana. 8a.ed. México. p. 880-900, 939-956.
31. Policastro P, Ovitt CE, Hoshina M, Fukuoka H, Boothby MR, Boime I. (1983). *J Biol Chem*, 258:11492-11499.
32. Purvis K, Hansson V. (1981). Hormonal regulation of spermatogenesis: Regulation of target cell response. *Int J Androl*. 3 (Suppl):81-143.
33. Reyes A, Chavarria ME, Martínez R. (1983). Bioquímica del tracto genital masculino. *Gaceta Médica de México* 119; 139-145.
34. Findlay ALR. *La reproducción y el feto*. Ed. El Manual Moderno serie: Principios fisiológicos en Medicina. México 239pp. 1987.

35. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Wilkins Wilkins, Co. 3rd. ed. USA pp: 1-107.1984.
36. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 5:76-126.
37. O'Riordan JLH, Malan PG, Gould RP. *Fundamentos de endocrinología*. 1a ed. Ed Limusa, México, 1988, pp: 103-129.
38. Leeson RC, Leeson ST. *Histología*. 3a ed. Ed Interamericana, México, 1977, pp: 452-480.
39. Kammerman S, Ross J. (1975). Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation. *J Clin Endocrinol*, 41: 546-550.
40. Scott FG. *Biología del desarrollo*. 3a ed. Ed. Omega, Barcelona, 1988, pp: 665-701.
41. Goodman AL, Hodgen GD. (1983). The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*, 39:1.
42. Mc Lachlan RI, Cohen NL, Dahl KD, Bremner WJ, Soules MR. (1990). Serum inhibin levels during the periovulatory interval in normal women: Relationships with sex steroid and gonadotrophin levels, *Clin Endocrinol*, 32:39.
43. Fraser HM, Lunn SF (1993). Does inhibin have an endocrine function during the menstrual cycle? *Trends Endocrinol Metab*, 4(6):187-194.
44. Lipner H. Mechanism of mammalian ovulation, Knobil E, Neill JD. *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, USA, 1988, pp: 447-477.

45. Mc Lachlen RI, Cohen NL, Vale WW, Burger JE, Bremner WJ, Soules MR. (1989). The importance of LH in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab*, 68: 1078.
46. Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigle ME, Reid RL, Yen SSC. (1987). Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*, 64:1109.
47. Chappel SC, Bethea CL, Spies HG. (1984). Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of Cynomolgus monkeys. *Endocrinology*, 115:452-461.
48. Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. (1992). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Human Reproduction*, 7 (1):23-30.
49. Chappel SC, Coutifaris C, Jacobs SC. (1982). Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* 110:847-854.
50. Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. (1982). Multiple species of follicle-stimulating hormone exists within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol*. 5:257-266
51. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Domínguez R. (1988). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*. 38: 70-78.

52. Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz Sánchez V, Larrea F. (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol.* 110:539-549.
53. Chappel SC. (1981). The presence of two species of follicle stimulating hormone within the hamster anterior pituitary glands as disclosed by Concanavalin A chromatography. *Endocrinology* 109:935-942.
54. Zaidi AA, Robertson DM, Diczafalusy E. (1981). Studies on the biological and immunological properties of human follitropin: profiles of two international reference preparations and of anaquos extract of pituitary glands after electrofocusing. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 97:157-165.
55. Blum W, Gupta D. (1985). Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol*, 105:29-37.
56. Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. (1992). Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Human Reproduction*, 7 (10):1371-1378.
57. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. (1983). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle stimulating hormone *Biol Reprod*, 28:196-205.

58. Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, Chappel S. (1983). Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity assesment of biological activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil Steril*, 40: 242-247.
59. Wide L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol*, 109: 190-197.
60. Wide L. (1989). Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol*, 123:519-529.
61. Wide L, Hobson BM. (1983). Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*, 56:371-375.
62. Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 67:465-473.
63. Wide L, Bakos O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular of luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 76:885-893.
64. Padmanabhan V, Miehler CD, Borondy M, Ianson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ (1992). Circulating bioactive FSH and less acidic FSH isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology*, 131: 213-220.

65. Chromatofocusing with polybuffer and PBE, technical booklet series. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia. 38 pp 1980.
66. Ulloa-Aguirre A, Damián-Matsumura P, Espinoza P, Domínguez R, Morales L, Flores A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol*, 126: 323-332.
67. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. (1963). The preparation of ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity *Biochem J*. 89:114-123.
68. Veldhuis JD, Johnson ML. (1988). A novel general biophysical model for simulating episodic endocrine gland signaling. *Endocrinol Metab*, 18:E749-E759.
69. Sufi SB, Donaldson A, Jeffcoate SL. (1990). WHO Programme for the provision of matched assay reagents for the radioimmunoassay of hormones in reproductive physiology. method manual. 14 ed, pp: 58-63.
70. Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damián-Matsumura P. (1992). Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cell in culture. *Journal of Endocrinology*, 134: 97-106.
71. Wide L, Bengtsson C, Naessén T. Estradiol induces secretion of more basic isoforms of both FSH and LH in postmenopausal women. En:75th Annual Meeting of the Endocrine Society. Las Vegas, Nevada. 1993, pp:316.

72. Urban JR, Padmanabhan V, Beitins I, Veldhuis DJ. Metabolic clearance of human follicle-stimulating hormone Assessed by radioimmunoassay, immunoradiometric assay and *in vitro* Sertoli Cell Bioassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 73: 818-823.