

22
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

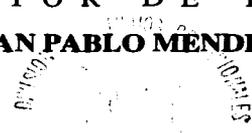
**CARACTERIZACION DE LAS DIVERSAS
FORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA
ESTIMULANTE DEL FOLICULO EN EL VARON
PREPUBER Y EN EL VARON ADULTO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I O L O G A**

**P R E S E N T A :
CECILIA CASTRO FERNANDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO**



**MEXICO, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: CARACTERIZACION DE LAS DIVERSAS FORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO EN EL VARON PREPUBER Y EN EL VARON ADULTO. realizado por CECILIA CASTRO FERNANDEZ

con número de cuenta 9251711-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario M. EN C. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO

Propietario BIOL. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA

Propietario DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES

Suplente BIOL. MIGUEL ANGEL PALOMINO GARIBAY

Suplente BIOL. VICTOR RAMIREZ

FACULTAD DE CIENCIAS

Coordinación General de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mis padres y mi hermano por su gran apoyo y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a las siguientes personas:

Al M. en C. Juan Pablo Méndez Blanco por el apoyo que siempre me ha brindado, así como por su asesoría en la realización de este trabajo.

A la Bióloga Aleida Olivares Segura por su ayuda incondicional, por la enseñanza que me ha proporcionado y por su amistad.

A todas las personas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" que me ayudaron en la realización de este trabajo.

A mis compañeras de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
OBJETIVO.....	15
HIPOTESIS.....	15
SUJETOS Y METODOS.....	16
METODOS.....	19
RESULTADOS.....	22
DISCUSION.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	30

RESUMEN

La síntesis y secreción de las hormonas hipofisiarias Folículo Estimulante (FSH) y Luteinizante (LH) está controlada por la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) hipotalámica. Ambas gonadotropinas ejercen su acción biológica sobre las gónadas al estimular la esteroidogénesis y la gametogénesis.

Dichas gonadotropinas se sintetizan y secretan en múltiples formas moleculares. Estructuralmente estas isoformas son diferentes en su composición de carbohidratos, principalmente de ácido siálico. Bioquímicamente cada una de ellas constituye una isoforma, que tiene propiedades fisicoquímicas y biológicas particulares.

El objetivo de este trabajo es caracterizar las diversas formas moleculares de FSH secretadas tanto en condiciones basales como después de un estímulo con GnRH en el varón prepúber y en el varón adulto.

Se incluyeron 3 sujetos en estadio 1 y 4 sujetos en estadio 5 de la clasificación de Marshall y Tanner. A cada sujeto se le extrajo sangre cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron 10 μg de GnRH y se extrajo sangre cada 10 minutos durante 4 horas. Se constituyeron 2 pozas (basal y pos 10 μg de GnRH) y cada poza fue sometida a un cromatoenfoque con el fin de analizar la distribución por pH de las isoformas secretadas en los sujetos prepúberes y en los sujetos adultos.

En todos los sujetos estudiados, así como en las dos fases del estudio, las isoformas séricas de la gonadotropina fueron predominantemente más ácidas (pH menor de 4.5), en aquellos individuos pertenecientes al estadio 5 de Tanner se presentó un incremento en la producción y en la secreción de las isoformas menos ácidas, en comparación con los sujetos pertenecientes al estadio 1 de Tanner. Pareciese que la secreción de las isoformas más básicas en el adulto normal, es el resultado de una mayor síntesis de estos isómeros promovida por el ambiente endócrino existente en dicha fase de la vida.

Independientemente de si el varón se encuentra en la fase prepuberal o ya es un adulto totalmente desarrollado, las formas más ácidas siempre predominarán, lo cual puede explicarse como una consecuencia combinada tanto de una sobrevivencia selectiva en la circulación de las formas con mayor vida media (las más ácidas), así como de una producción y secreción disminuidas de las formas con menor vida media (las menos ácidas).

INTRODUCCION

Han transcurrido casi 50 años desde que por primera vez se propuso que la regulación de la síntesis y secreción de las hormonas Luteinizante (LH) y Folículo Estimulante (FSH), se encontraba mediada por la acción que el sistema nervioso central ejercía sobre la hipófisis anterior (1). Dentro de la complejidad de los eventos que conducen a la síntesis y secreción de las gonadotropinas, ha sido demostrado desde hace varios años que la acción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo es un factor determinante para este fin. En 1960, Mc Cann y colaboradores (2) demostraron que la inyección de extractos hipotalámicos a ratas inducía la secreción de LH y FSH por la hipófisis anterior. En 1971, los trabajos tanto de Matsuo (3) como de Schally (4), indicaron que un decapeptido era el directamente responsable de la estimulación del gonadotropo, denominándosele desde entonces como hormona liberadora de gonadotropinas.

El sistema nervioso central (SNC) se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en las neuronas especializadas del hipotálamo preóptico (5). Este péptido es secretado siempre en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media. Una vez que alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (6).

Las neuronas controladoras de la secreción de GnRH reciben inervación de otras neuronas capaces también de estimular o inhibir la función gonadal. Ciertos neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina modifican el control central de la GnRH (7). Por ejemplo, la inyección de adrenalina en el hipotálamo medio basal de la rata desencadena la liberación de GnRH y consecuentemente de LH y FSH; los bloqueadores alfa adrenérgicos previenen la respuesta ovulatoria tanto en ratas como en conejos y los medicamentos que controlan el bloqueo alfa adrenérgico pueden impedir la ovulación en la mujer. Los efectos de retroalimentación de los estrógenos son mediados en parte por un efecto central sobre las fibras catecolaminérgicas proyectadas hacia el hipotálamo (8).

La acción ejercida por la GnRH sobre la hipófisis anterior se inicia con la unión, por parte de la hormona, a receptores específicos localizados en la membrana citoplasmática del gonadotropo. Esta unión activa dos mecanismos, el primero de ellos dependiente de cinasa C (síntesis de gonadotropinas) y otro en el que se altera la permeabilidad de la membrana de algunos iones y permite la movilización del calcio intra y extracelular, con lo que se activa la liberación de las gonadotropinas (9). Al producirse la unión con el receptor, aumenta la concentración de monofosfato de adenosina en su forma cíclica (AMPc) al activarse el sistema adenilato ciclasa. Sin embargo, este fenómeno, no es aparentemente indispensable para la acción de la GnRH. El número de receptores hipofisarios a GnRH puede ser incrementado farmacológicamente

mediante la exposición de la glándula a GnRH o a estrógenos, lo cual permite que en determinadas condiciones, exista una respuesta mayor de la glándula a la estimulación de la GnRH (10).

Las endorfinas y otros opioides endógenos pueden influir en la secreción de GnRH y consecuentemente de gonadotropinas, como ha sido demostrado por nuestro grupo (11). La morfina y sus análogos inhiben la ovulación, así como el antagonista de los opioides la naloxona induce la ovulación en algunas pacientes con hiperprolactinemia, amenorrea o anorexia nervosa (12).

La GnRH, liberada en forma pulsátil, condiciona dos tipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El tónico, es el patrón de secreción observado en los varones y uno de los mecanismos de control en la mujer. La secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que la secreción de gonadotropinas probablemente siempre es pulsátil o episódica, bien que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto). Sin embargo, debido a limitaciones metodológicas, existe dificultad para detectar los pequeños pulsos cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (13).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, ya que cuando se expone a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de

desensibilización por parte de los receptores de la hormona (14). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal elevada conduce a una respuesta hormonal disminuída. Este fenómeno es secundario a ciertos cambios en la concentración y/o afinidad del receptor y tiene como función fisiológica el prevenir la sobre-estimulación de la célula (15). Asimismo, ha sido observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria. La frecuencia en la pulsatilidad de GnRH varía de acuerdo al ambiente endócrino existente. Por ejemplo, ha sido demostrado que esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (16). Por lo tanto, el SNC modifica la descarga de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo conforme al ambiente endócrino existente (17).

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas. Los receptores esteroideos han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde se han relacionado con la regulación de la conducta sexual, la regulación de la secreción de GnRH y la diferenciación del cerebro (18).

Otras hormonas diferentes a los esteroides gonadales y a las gonadotropinas también han sido relacionadas con la regulación de la función reproductiva. Estas incluyen a la inhibina y a las activinas (19), así como a la prolactina, que inhibe la secreción

de GnRH y a la dopamina, que bajo algunas circunstancias directamente inhibe la secreción de LH (20). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar directamente en el hipotálamo para modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) y la GnRH puede influir directamente en su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (21).

Por otro lado, hay que señalar que al igual que la insulina, la vasopresina y el glucagón, las gonadotropinas son almacenadas en gránulos de las células secretoras y se liberan en forma bifásica. Esta liberación se caracteriza por un aumento agudo inicial; posteriormente, se presenta un período de estabilización o de caída seguido por una segunda fase de incremento en la tasa de secreción. El fenómeno de la liberación bifásica se ha explicado mediante la hipótesis que señala la existencia de dos "pooles" de hormona liberable. Se estima que el primer "pool" es sintetizado en gránulos cercanos a la membrana celular y que es fácilmente liberable. El segundo "pool" originado en otros gránulos, posiblemente requiere de la síntesis de "novo" de la hormona o de la unión de los gránulos a microtúbulos antes de que pueda presentarse la liberación (22,23). 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" o una caída hasta los 90 minutos aproximadamente, momento en el cual se

inicia el segundo aumento el cual continúa hasta el final de la infusión. Se ha sugerido que las dos fases de liberación de LH representan una clara evidencia de la existencia de dos "pooles" funcionales de LH en la hipófisis humana, uno que es rápidamente liberable y otro que requiere de una estimulación más prolongada para su liberación (24). 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 (25).

La administración de dosis submáximas de GnRH por un periodo de varias horas, bien sea mediante inyecciones repetidas o por infusión constante, permite evaluar tanto el "pool" de gonadotropinas que se libera de forma aguda como aquel que se libera tardíamente. Cada "pool" representaría distintas condiciones fisiológicas, pues el primero nos hablaría de la sensibilidad del gonadotropo y el segundo de la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos "pooles" hipofisarios de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisaria. Si la estimulación con GnRH es breve y pequeña (10 μg), el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total del primer "pool". La estimación de la reserva hipofisaria requiere de una duración más prolongada de la estimulación o de una mayor cantidad de GnRH (90-100 μg). La liberación subsecuente de la

hormona probablemente representa una aproximación del tamaño del "pool" de almacenaje, el cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis elevada de GnRH (100-150 μ g), no se pueden apreciar por separado los componentes de sensibilidad y reserva, ya que existe una acción más potente que ocasiona la liberación de ambos "pooles" (24-26).

Las gonadotropinas son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos cadenas glicopeptídicas, unidas por puentes de hidrógeno, denominadas subunidad alfa y subunidad beta. La beta, es única para cada gonadotropina y le confiere su actividad biológica específica. Las gonadotropinas ejercen su acción sobre las gónadas (testículos u ovarios), al estimular la secreción de esteroides, así como la maduración de los gametos (27). En los testículos, la FSH actúa sobre las células de Sertoli al estimular la espermatogénesis; en el ovario, también estimula la gametogénesis. La LH estimula la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, el principal de éstos es la testosterona; en la mujer la LH estimula la esteroidogénesis ovárica (28,29).

Desde hace algunos años, se ha precisado que al igual que con la LH y la tirotropina, la FSH no es una hormona de estructura única, sino que está constituida, por un grupo de isoformas hormonalmente reguladas. Las características químicas generales de la molécula de FSH incluyen 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; éstos se encuentran en las posiciones 52 y 78 de la subunidad alfa así como en la 13 y 30 de la beta. 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 (30). El peso molecular de la FSH es de aproximadamente 30 mil daltones; éste no se puede establecer de manera exacta debido a la variabilidad de carbohidratos unidos a la molécula (13). La presencia de variaciones en la estructura y distribución de oligosacáridos sializados y en menor grado sulfatados en la hormona, constituye la base química para la formación de las isoformas. Se han identificado varias isoformas de FSH en la hipófisis, suero y orina de varias especies animales, incluido el hombre. Cada isoforma posee características biológicas particulares como son su capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades "in vitro" e "in vivo", características éstas que se encuentran íntimamente relacionadas a las propiedades fisicoquímicas de cada isoforma (31).

La mayor resolución para la separación de las mismas, en cuanto a número de isoformas recobradas, se obtiene mediante el isoelectroenfoque (IEF) o el cromatoenfoque (CF). Este último método ofrece la ventaja adicional de que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana del pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y nuevamente procesadas a través de un intervalo de pH diferente, sin que exista pérdida significativa de la actividad (32). Ha sido demostrado que las isoformas de FSH migran principalmente hacia la porción ácida del gel (áreas de pH que corresponden a valores de 5.5 a 3.4), en contraste con lo que ha sido descrito para las isoformas de LH. La naturaleza ácida de las isoformas de FSH, es primordialmente debida a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (aproximadamente 83%) con residuos terminales de ácido siálico (33).

La rata y el hamster han sido los modelos experimentales más utilizados para la caracterización del pleomorfismo de FSH. Por medio del IEF o del CF, varios grupos de investigadores han caracterizado detalladamente la distribución de las diversas isoformas de FSH tanto "in vitro" como "in vivo" durante diversas condiciones fisiológicas y experimentales (34). En extractos hipofisarios de hamsters y ratas, hembra y macho, se ha demostrado la presencia de 6 a 7 isoformas inmunoactivas de FSH. Además de las diferencias en las propiedades fisicoquímicas, existen diferencias importantes en cuanto a las características biológicas

de cada isoforma, ya que difieren tanto en su actividad biológica, como en su capacidad de unión al receptor y en su vida media plasmática. Chappel y cols. (35) demostraron que en la hipófisis de ratas hembras prepúberes existen todas las isoformas de FSH observadas en las ratas adultas. Sin embargo, antes de la pubertad la mayoría (60-70%) de la FSH inmunoactiva migra hacia la porción ácida del gel (3.4-4.9). En el momento de la apertura vaginal, es posible observar un incremento significativo en la proporción de algunas isoformas menos ácidas de FSH ($pI=5.0-6.0$) que son las que poseen mayor unión al receptor y actividad biológica "in vitro". Por lo tanto, pareciese que durante la pubertad, la hipófisis adquiere la capacidad de transformar a aquellas isoformas de FSH con poca actividad biológica, en otras más potentes. Lo mismo ha sido demostrado para otras hormonas como la hCG ya que en cultivos de placenta se ha observado que las formas básicas presentan mayor actividad biológica que las ácidas (36).

En ovejas hembras, se examinaron los cambios en la distribución de las isoformas de FSH en paralelo con los cambios en la secreción de FSH bioactiva. En dicho estudio se demostró que al inducir la pubertad existe un cambio marcado en la distribución de isoformas de FSH circulante hacia aquellas isoformas menos ácidas, las cuales presentan una mayor actividad biológica (37).

En el hombre adulto también se han llevado a cabo estudios en los que se han separado las isoformas de FSH, encontrándose que existe un gran número de las mismas, tanto en tejido hipofisiario,

como en el suero y en la orina (38). Se ha demostrado que la FSH circulante en mujeres puberales es menos ácida que en los varones (39). En ambos sexos existe un cambio significativo hacia la secreción de isoformas más básicas después de la administración con GnRH (40,41).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en lo anteriormente descrito, consideramos relevante el caracterizar las diversas isoformas circulantes de FSH existentes, tanto en condiciones basales como después del estímulo con GnRH, en el varón prepúber y en el varón adulto, con el fin de comparar los resultados obtenidos en cada grupo de estudio. Los resultados obtenidos permitirán determinar si existe o no diferencia en las isoformas de FSH existentes en los individuos prepuberales en relación con los varones adultos.

OBJETIVO

Caracterizar las diversas formas moleculares de FSH secretadas tanto en condiciones basales como después de un estímulo con GnRH en el varón prepúber y en el varón adulto.

HIPOTESIS

Las isoformas circulantes de FSH presentan variaciones en su distribución por carga en el varón prepúber con respecto a las isoformas existentes en el varón adulto.

SUJETOS Y METODOS

Se incluyeron dos grupos diferentes de sujetos. El primer grupo incluyó 3 niños en estadio 1 de la clasificación de Marshall y Tanner (42), tomándose como parámetro de referencia primordial el volúmen gonadal. El segundo grupo estuvo constituido por 4 adultos normales (estadio 5 de la clasificación de Marshall y Tanner) (Tabla 1). Las características clínicas de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio se encuentran detalladas en la Tabla 2. La exploración física siempre fue realizada por los mismos dos observadores, entre los cuales siempre se concordó en el estadio de Marshall y Tanner al que pertenecía cada individuo.

Cabe señalar que los sujetos en estadio 1 de Tanner fueron escogidos de un grupo de niños sanos que presentaban historia de talla baja constitucional (estatura entre la percentila 10 y la percentila 25). En ninguno de los sujetos estudiados había existido antecedente alguno de enfermedad endocrinológica y todos ellos cumplieron con los criterios de inclusión señalados originalmente:

1. Sujetos masculinos mayores de 9 años de edad y de 30 kg de peso y por arriba de la percentila 3 de talla y peso para cada edad específica.
2. Desarrollo puberal y concentraciones hormonales basales concordantes con estadio 1 ó 5 de acuerdo con la clasificación de Marshall y Tanner.

TABLA 1

ESTADIO DE TANNER	VELLO PUBICO	VOLUMEN TESTICULAR (C.C.)
1	Ausente	1.8 - 4.2
5	Características de adulto	> 15

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS

SUJETO	EDAD (AÑOS)	VOLUMEN GONADAL (C.C.) I D	LONGITUD PENEANA (cms)	VELLO PUBICO	EDAD OSEA (AÑOS)
TANNER 1					
A	11	2.6-4.1	5.0	1	11
B	12	3.2-3.2	4.5	1	9
C	10	2.6-3.2	4.5	1	10
TANNER 5					
D	23	19.9-25.0	7.5	5	> 18
E	24	19.9-19.9	8.0	5	> 18
F	24	25.0-25.0	8.5	5	> 18
G	23	19.9-25.0	9.0	5	> 18

I = IZQUIERDA
D = DERECHA

3. Ausencia de cualquier tipo de patología endocrinológica o crónica debilitante, después de una evaluación clínica detallada.
4. Presentar tres días antes del estudio concentraciones de hemoglobina mayores de 14 gr/dl y hematocrito mayor del 40%.
5. Consentimiento voluntario para participar en el estudio.

Como se encuentra detallado en la Tabla 3, las concentraciones hormonales basales de LH, FSH, Testosterona (T) y Estradiol (E_2) de cada uno de los sujetos estudiados fueron concordantes con el estadio de Tanner en el que se encontraba cada sujeto. Las hormonas LH y FSH fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo. Los reactivos para el análisis fueron proporcionados por el Programa Especial de Investigación y Desarrollo en Reproducción Humana de la OMS (Ginebra, Suiza). Los resultados se encuentran expresados en mUI/mL de acuerdo a la primera preparación de referencia internacional. Los coeficientes de variación inter e intra-análisis fueron de 11% y 6% para LH y de 10% y 7% para FSH respectivamente. Los reactivos para las cuantificaciones de T y E_2 también fueron donados por el Programa Especial de Investigación y Desarrollo en Reproducción Humana de la OMS. Los coeficientes de variación para T fueron menores al 7.0% y al 8.0% mientras que para E_2 fueron menores al 7.0% y al 7.5%.

Para realizar el protocolo experimental, se obtuvo la aprobación tanto del Comité de Etica del Hospital, como de los

TABLA 3
CONCENTRACIONES HORMONALES BASEALES

SUJETO	FSH* (mUI/ml)	LH* (mUI/ml)	T (ng/ml)	E ₂ (pg/ml)
TANNER 1				
A	4.6	2.7	0.3	24
B	7.7	3.2	0.6	22
C	2.9	2.5	0.4	19
TANNER 5				
D	13.4	6.2	5.5	82
E	2.8	5.8	4.6	32
F	5.5	8.3	7.6	52
G	13.1	12.0	6.1	27

VALORES DE REFERENCIA

PREPUBERES	< 0.5	< 3.0	< 3.9	< 60
ADULTOS	0.5-5.0	3.0-12.0	3.9-10.0	< 60

• MEDIA DE TRES MUESTRAS BASEALES TOMADAS A INTERVALOS DE 20 MINUTOS.

adultos y de los padres de los niños participantes.

El protocolo experimental consistió en lo siguiente: a cada sujeto se le extrajo sangre (1.5 mls) cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron (i.v.) 10 microgramos de GnRH sintética (SERONO, México) y se extrajo sangre (1.5 mls) cada 10 minutos durante 4 horas. Los pacientes acudieron al Hospital media hora antes de iniciar el estudio con el fin de ser canalizados, instalándose una mariposa #21, en una vena antecubital. El protocolo siempre dió inicio a las 8:00 a.m. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon las primeras cinco gotas correspondientes a la solución salina. Durante las 6.5 horas, los pacientes permanecieron en posición de decúbito, ingiriendo un desayuno a las 8:30 horas consistente en un vaso de jugo de naranja, un plato de cereal con leche (250 ml) y un plátano.

METODOS

Cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se coagulara para poder centrifugarlas adecuadamente a 1000 x g. Posteriormente se constituyeron pozas (basal y pos 10 μ g de GnRH sintética) que se congelaron a -20°C. Cada poza fue transferida a bolsas de membrana para diálisis con una permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA), y dializadas durante 24 horas a 4°C contra agua destilada desionizada y posteriormente, bajo las mismas condiciones, contra una solución de carbonato de amonio 0.01M. Cada una de las pozas fue liofilizada y almacenada hasta el día en que se llevó a cabo el 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 al 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 reenfocadas a través de diferentes gradientes de pH (43).

El CF de FSH se realizó de acuerdo al método descrito por Ulloa-Aguirre y cols. (33). 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 (2.5-5.4 ml) del amortiguador Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) en agua desionizada (1:8 v/v) pH 3.0. 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 de pH. La muestra fué 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 3.0, el amortiguador de corrimiento se sustituyó por una solución de NaCl 1 M (pico de sal), para recuperar el material que no eluyó dentro del intervalo de pH 7.4 a 3.0. Hecho ésto, 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 RIA (Apéndice 1).

La cuantificación de las concentraciones inmunoreactivas de las isoformas de FSH se hizo mediante RIA, de acuerdo con la metodología descrita por Ulloa-Aguirre y cols. (38). Los resultados fueron expresados en UI/L en relación con la segunda preparación de referencia internacional de FSH (2° IRP-HMG). Con

APENDICE 1

CROMATOENFOQUE DE FSH

Empaque de la columna PBE-94



Equilibrar con amortiguador de partida
(Imidazol 0.025 M/HCL pH=7.4)



Depositar la muestra problema



Amortiguador eluente (pH=3.0)



Colección de fracciones (2 ml C/U)



Medición de pH



NaCl 1M cuando el pH=3.0



Colección de 15 a 20 fracciones



Medición de pH



RIA de FSH

el fin de que no existieran variaciones interanálisis para un mismo sujeto, todas las muestras de un individuo se incluyeron en el mismo ensayo. Para analizar las variaciones interanálisis se utilizaron los mismos "pooles" de control de calidad en cada uno de los ensayos. Para determinar las variaciones intranálisis se utilizaron controles de calidad [Immunoassay Tri-level control, Lot. 012, Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, CA] al principio, a la mitad y al final de cada uno de los ensayos.

RESULTADOS

El análisis de las muestras séricas por CF demostró que en todos los individuos estudiados, así como en ambas condiciones experimentales, existió la presencia de múltiples picos de FSH inmunoreactiva, los cuales se encontraron en un intervalo de pH de 7.5-3.0, así como en aquellas fracciones recuperadas después de añadir 1.0 mol/L NaCl a las columnas de CF (pico de sal). Cabe señalar que con el fin de agrupar a las isoformas según su pH específico, se procedió a agruparlas por intervalos de pH de 0.5. En todos los sujetos estudiados, así como en ambas fases del estudio, las isoformas séricas de la gonadotropina fueron predominantemente recuperadas en aquellos valores de pH que se encontraron por debajo de 4.5, incluyendo el pico de sal (Figuras 1-7).

Con el fin de evaluar las diferencias existentes en los patrones de distribución de las isoformas de FSH sérica entre los dos grupos de sujetos estudiados, así como entre las dos fases del estudio experimental en cada uno de los grupos, cada patrón de CF fué dividido en dos regiones específicas de pH, considerándose el pH de 4.5 como el punto de corte específico del valor de pH. Este valor fue tomado de hallazgos previos en los cuales se ha demostrado que las isoformas de FSH hipofisiaria que poseen valores de pH por debajo de 4.5, exhiben una vida media plasmática mayor,

SUJETO A
(Tanner 1)

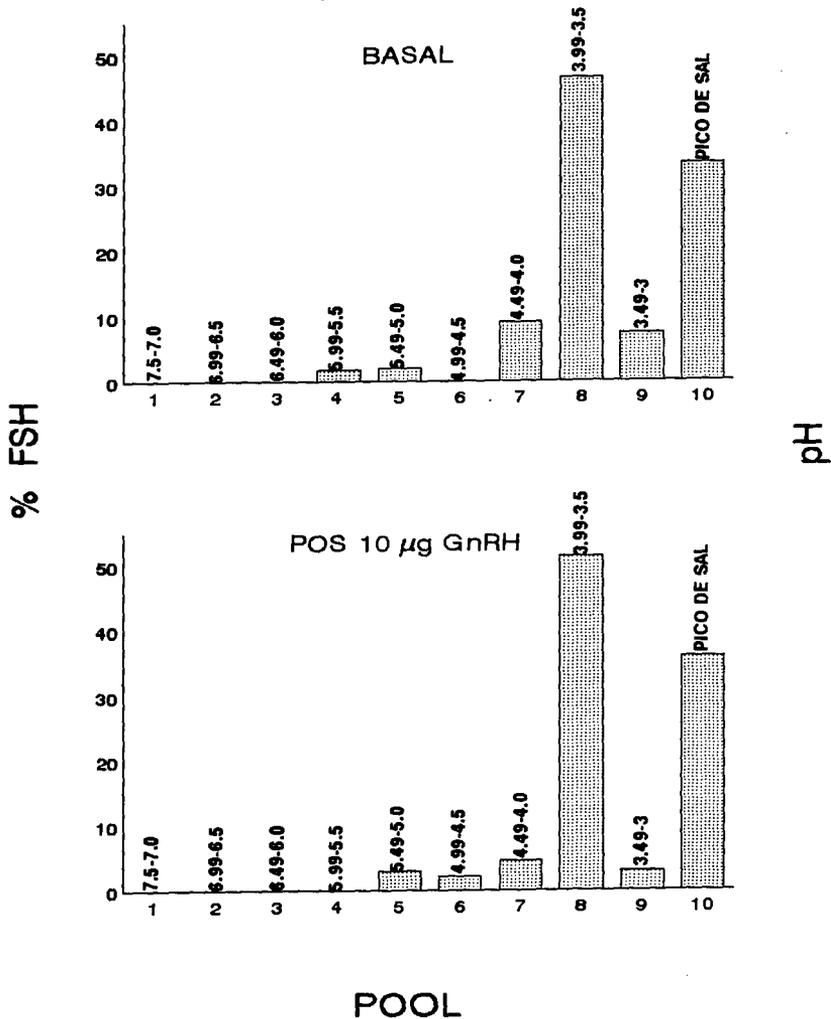


FIGURA 1. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatografía. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO B
(Tanner 1)

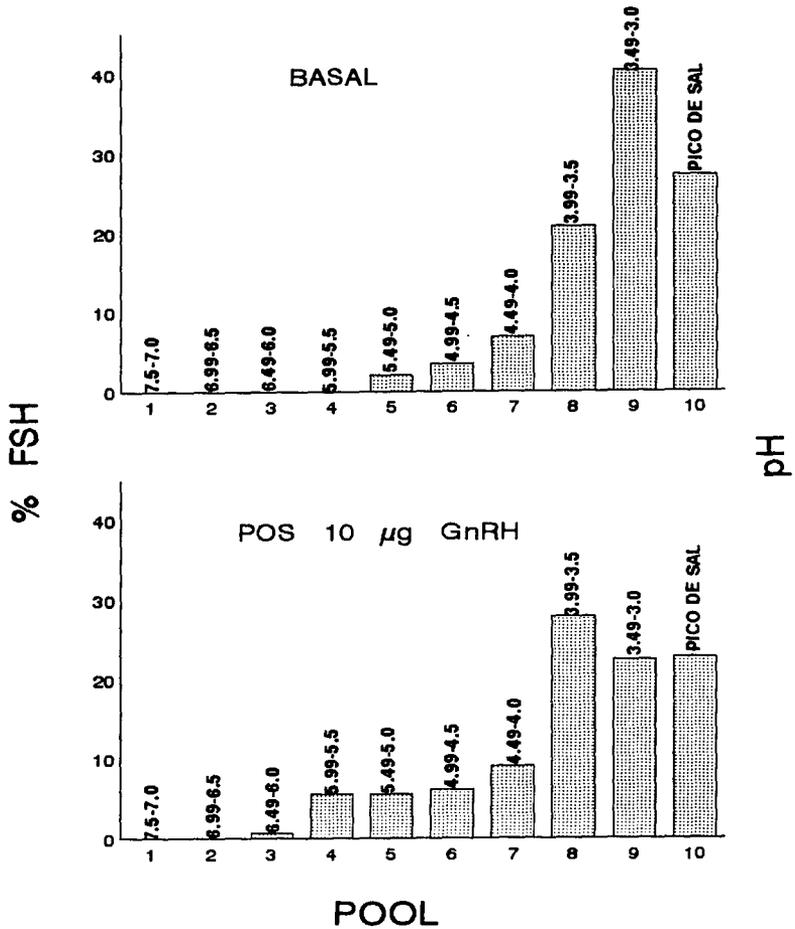


FIGURA 2. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatoenfoque. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO C
(Tanner 1)

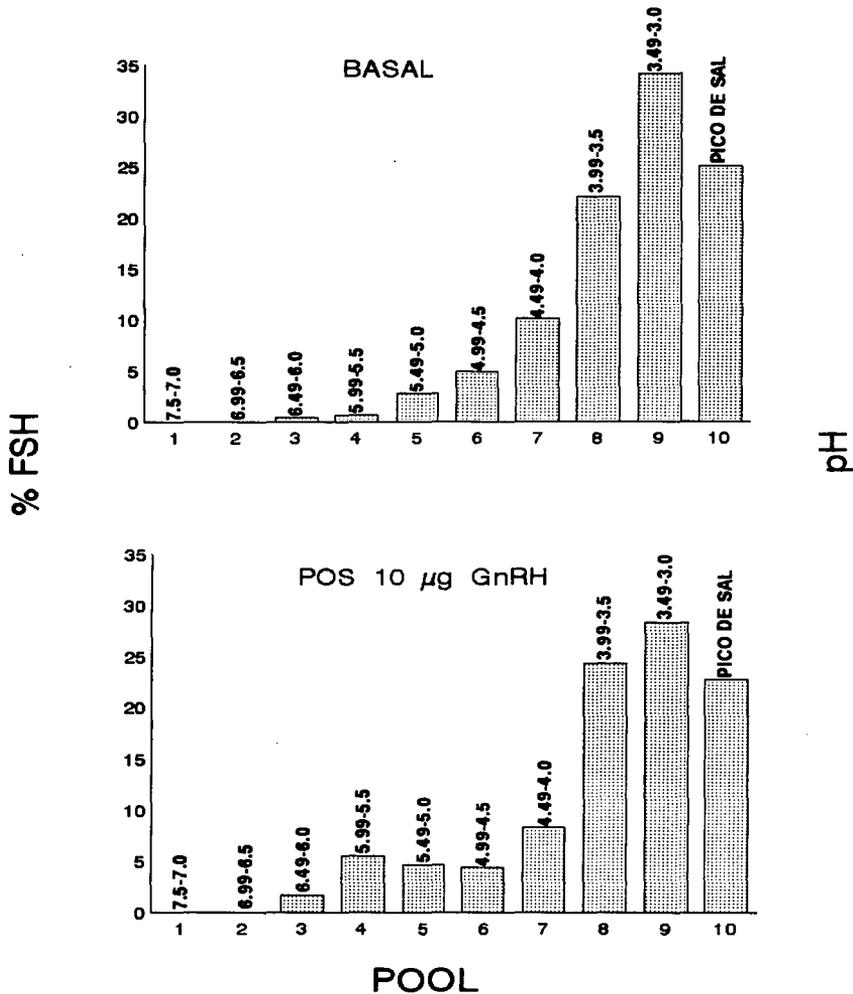


FIGURA 3. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatografía. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO D
(Tanner 5)

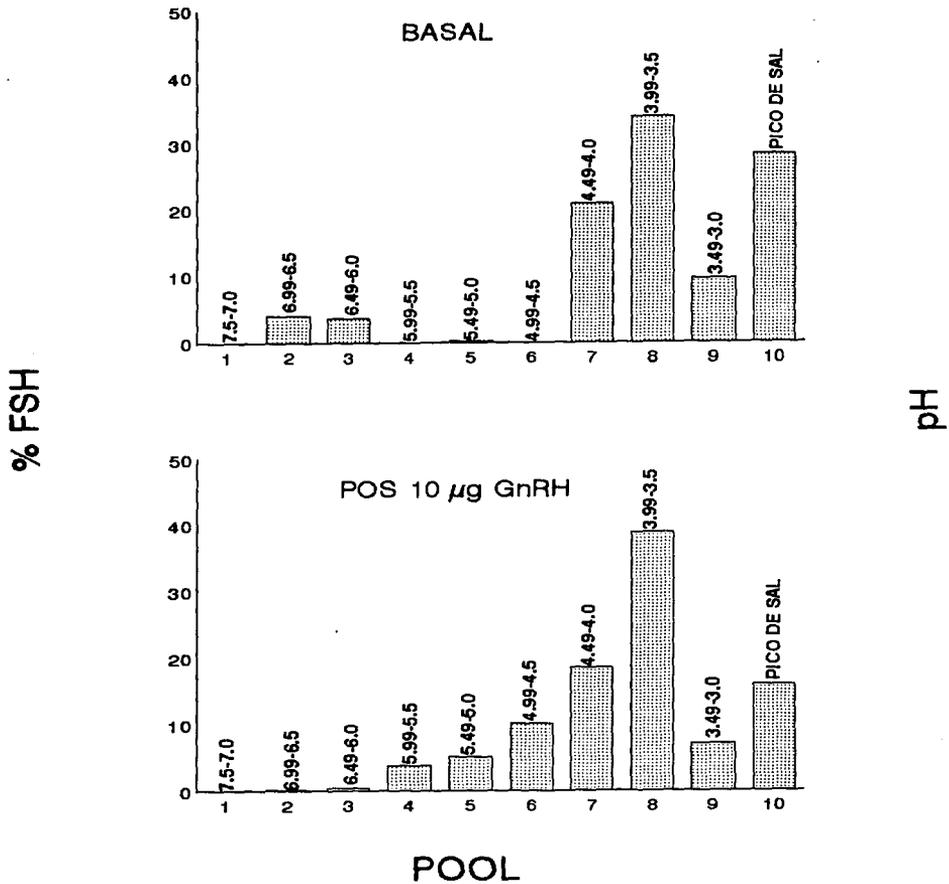


FIGURA 4. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatofor. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO E
(Tanner 5)

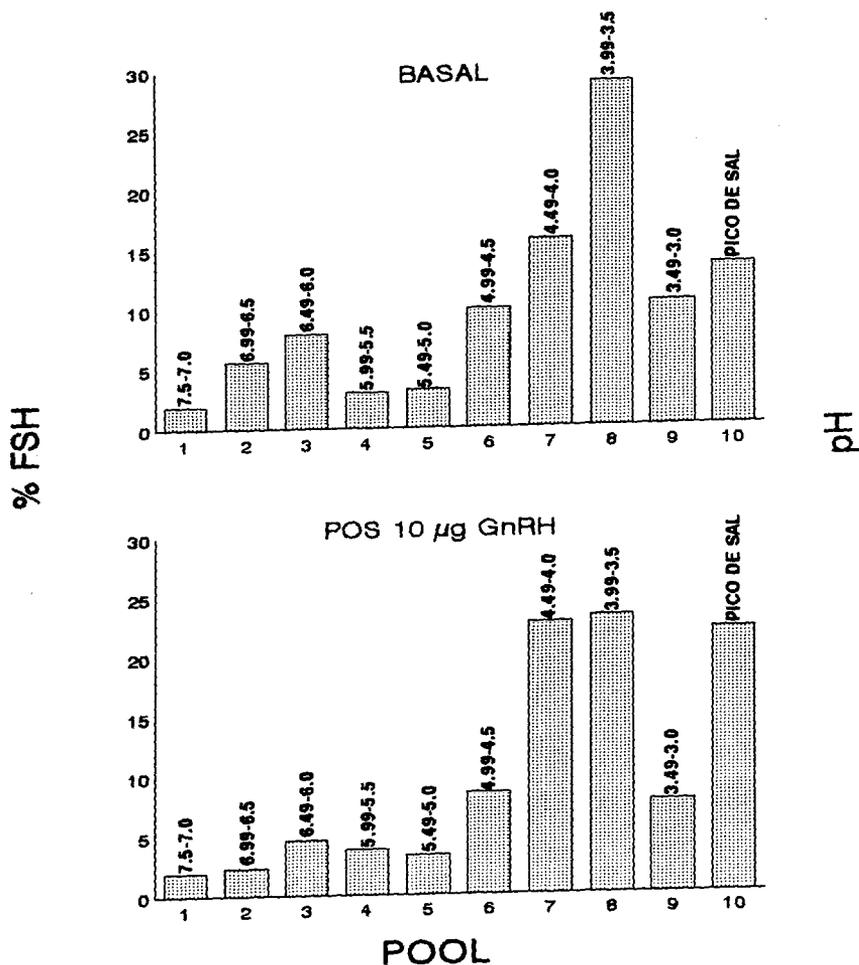


FIGURA 5. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatografía. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO F
(Tanner 5)

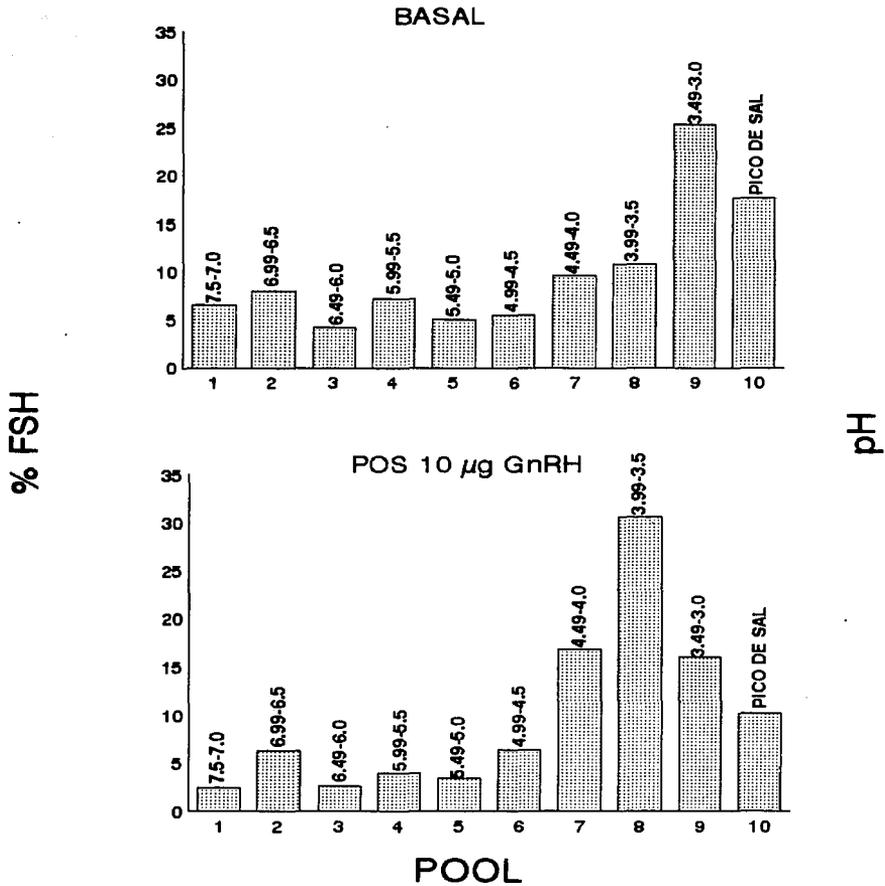


FIGURA 6 Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatofoco. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

SUJETO G
(Tanner 5)

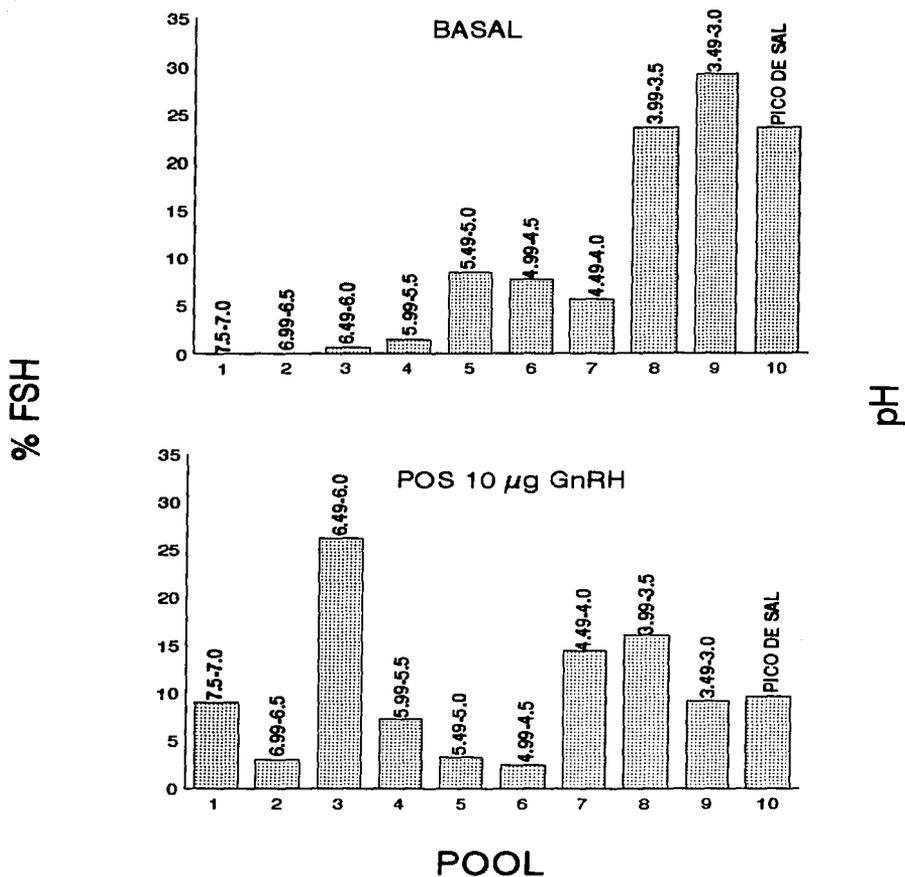


FIGURA 7. Distribución de las diversas isoformas moleculares de FSH después de su separación por cromatoenfoco. Obsérvese que en ambas condiciones experimentales el mayor porcentaje de la hormona se encuentra en las fracciones de pH correspondientes a las "más ácidas".

además de una potencia biológica "in vitro" menor, que sus análogos menos ácidos (38). Los cambios existentes en el patrón de distribución de las isoformas de FSH fueron expresados como el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de FSH con valores de pH de elución menores a 4.5, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores a 4.5 (Tabla 4).

Las comparaciones entre los dos grupos estudiados demostraron claramente que en condiciones basales, los sujetos en estadio 1 de Tanner presentan una mayor abundancia de las formas más ácidas ($94.0\% \pm 2.8\%$), que aquellos sujetos en estadio 5 de Tanner ($76.4\% \pm 13.1\%$) (Tabla 4). Al llevar a cabo la comparación entre los dos grupos después del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH se pudo observar que al igual que en condiciones basales los sujetos en estadio 1 de Tanner presentaron una mayor abundancia de las isoformas más ácidas ($86.9\% \pm 6.9\%$) que los individuos estudiados pertenecientes al estadio 5 de Tanner ($69.6\% \pm 14.0\%$) (Tabla 4).

Al aplicar el estímulo con $10 \mu\text{g}$ del decapeptido, en los sujetos en estadio 1 de Tanner se observó un discreto incremento en el porcentaje de las formas menos ácidas ($13.1\% \pm 6.9\%$) vs. ($6.1\% \pm 2.7\%$), al hacerse la comparación con los porcentajes basales. Este fenómeno no se observó de la misma manera en los sujetos en estadio 5 de Tanner, ya que dos de estos sujetos presentaron un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas

TABLA 4

PORCENTAJE DE FORMAS MOLECULARES DE FSH
EN LOS SUJETOS ESTUDIADOS

SUJETO	CONDICIONES BASALES pH > 4.5	CONDICIONES BASALES pH < 4.5	POS 10 μ g GnRH pH > 4.5	POS 10 μ g GnRH pH < 4.5
TANNER 1				
A	3.7	96.3	5.2	94.8
B	5.5	94.5	17.9	82.1
C	9.0	91	16.2	83.8
TANNER 5				
D	7.8	92.2	19.6	80.3
E	31.5	68.4	24.4	75.5
F	36.6	63.3	25.2	73.7
G	18.3	81.7	50.9	49.1

después del estímulo con GnRH, mientras que los otros dos individuos estudiados, presentaron una disminución de las isoformas menos ácidas después del estímulo (Tabla 4).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Estudios previos han demostrado que las isoformas de FSH hipofisiaria, difieren no solamente en sus propiedades fisicoquímicas, sino también en sus atributos biológicos (38,44). Las isoformas más ácidas poseen una mayor cantidad de ácido siálico en su molécula y tienen vidas medias plasmáticas más largas, además de mayor potencia biológica "in vivo", en relación con aquellas formas moleculares menos ácidas (38,39,44). A pesar de que las formas moleculares de FSH menos ácidas poseen una vida media menor en la circulación, hay que señalar que estas constituyen estimuladores potentes de efectos biológicos en la célula blanco (38,44,45).

Al igual que en estudios previos (40,46) en este trabajo hemos demostrado que la FSH en los varones, tanto en estadio 1 como en estadio 5 de Tanner, es altamente heterogénea y es liberada de la hipófisis como una mezcla de isómeros, los cuales aparentemente presentan variación en las diferentes etapas del desarrollo puberal. A pesar de que en todos los sujetos estudiados, así como en las dos fases del estudio, las isoformas séricas de la gonadotropina fueron predominantemente más ácidas (pH menor de 4.5), en aquellos individuos pertenecientes al estadio 5 de Tanner pudimos documentar un incremento en la producción y en la secreción de las isoformas menos ácidas, en comparación con los sujetos pertenecientes al estadio 1 de Tanner. Este incremento en la

abundancia relativa de las isoformas circulantes menos ácidas y presumiblemente con menor contenido de ácido siálico, aparentemente no es el resultado de la presencia de cambios estructurales en las isoformas más ácidas que se presentan después de la secreción de éstas, ya que un cambio similar en la distribución de las mismas, fué detectado inmediatamente después del estímulo con GnRH, en los dos grupos estudiados. Pareciese que la secreción de las isoformas más básicas en el adulto normal, es el resultado de una mayor síntesis de estos isómeros promovida por el ambiente endócrino existente en dicha fase de la vida.

Los cambios observados en la distribución de las isoformas de FSH, después de la estimulación con 10 μ g de GnRH pudiesen deberse a cambios existentes en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH, a los cambios en el ambiente esteroideogénico o a una combinación de ambos factores. Diversos estudios tanto "in vivo" como "in vitro" han documentado la importancia de varios factores en el pleomorfismo molecular de FSH. En roedores se han observado cambios en las isoformas de FSH durante las diferentes etapas de la pubertad (33,47). Asimismo, la inducción experimental de la pubertad en ovejas hembra promueve un incremento en la liberación de las isoformas menos ácidas, así como un incremento asociado en la secreción de la FSH bioactiva (37). En otros estudios llevados a cabo en niñas prepúberes y púberes con disgenesia gonadal, la carga media de FSH fue menos negativa después de la administración de GnRH (48). Más evidencias del rol que desempeña la GnRH en la

regulación de la secreción de FSH bioactiva y por lo tanto en la composición molecular de la hormona, han sido provistas por estudios que demuestran incrementos preferenciales en la secreción de FSH bioactiva después de la administración de GnRH a niños con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático, así como la demostración de la disminución en la fracción de la FSH bioactiva, después del tratamiento con análogos de GnRH, tanto en mujeres normales como en mujeres hipogonádicas (49-52). En algunos estudios "in vitro", el exponer tejido hipofisiario de roedor a GnRH dió como resultado un aumento en la secreción de las isoformas menos ácidas de FSH (53); asimismo, otros trabajos demuestran que el tratamiento con GnRH puede alterar la glicosilación "in vitro" de la molécula de LH (54-56). Si un mecanismo como este último opera en el caso de la FSH, entonces se puede postular la existencia de un efecto directo de la GnRH sobre la regulación de la microheterogeneidad de la FSH. Este mecanismo sería parte importante de la existencia "in vivo" del pleomorfismo molecular. Asimismo, varios estudios han demostrado la importancia que los esteroides gonadales tienen en la existencia del pleomorfismo de FSH (45,57).

La mayor predominancia de las formas más ácidas (valores de pH menores de 4.5) en la circulación, había sido demostrada por nuestro grupo (40), en un estudio realizado en voluntarias sanas, tanto en la fase folicular como en la fase lútea del ciclo menstrual de las mujeres normales. La observación de que la

administración de GnRH no había modificado significativamente la distribución de las isoformas séricas, sugería entonces que al menos en estas fases, en las cuales la respuesta de FSH a GnRH se encuentra relativamente reducida, los gonadotropos preferentemente sintetizan y secretan moléculas de FSH ricas en ácido siálico. Sin embargo, los hallazgos del estudio actual nos permiten concluir que, independientemente de si el varón se encuentra en la fase prepuberal o ya es un adulto totalmente desarrollado, las formas más ácidas siempre predominarán, lo cual puede explicarse como una consecuencia combinada tanto de una sobrevivencia selectiva en la circulación de las formas con mayor vida media (las más ácidas), así como de una producción y secreción disminuidas de las formas con menor vida media (las menos ácidas). Sin embargo, es muy importante resaltar que a pesar de que las formas más ácidas predominan siempre, estas lo hacen en menor proporción en los sujetos en estadio 5 que en aquellos en estadio 1 de Tanner. Este hallazgo puede equipararse con que en la mujer normal, durante la fase ovulatoria (fase de mayor actividad hipotálamo-hipofisiaria), se secretan una mayor cantidad de formas moleculares de FSH menos ácidas en relación con las secretadas en las fases folicular y lútea (40).

Podemos postular que los efectos que llevan a la hipófisis a cambiar no solamente la cantidad sino también el tipo de señal de FSH entre los individuos prepuberales y los varones adultos, pudiese ser progresivamente amplificada, a lo largo del proceso

puberal, por el incremento en la T sérica.

En resumen, mediante este estudio hemos demostrado que existen variaciones en las isoformas de FSH sérica al comparar los hallazgos obtenidos en individuos prepuberales, con aquellos obtenidos en adultos normales, etapas del desarrollo que difieren básicamente en la secreción endógena de GnRH, así como en las concentraciones de T; desde luego, será necesario incrementar el tamaño de la muestra con el fin de poder determinar las diferencias estadísticas existentes. Asimismo, el poder estudiar individuos a lo largo de todo el desarrollo puberal (estadios 1-5 de Tanner), podrá definir con mayor precisión este delicado y fino proceso que controla las funciones reproductivas en el varón, ya que este mecanismo de regulación pudiese controlar tanto la intensidad como la duración de la señal de FSH liberada al testículo a lo largo de la vida de los varones. Por último, hay que considerar que para atribuir un significado fisiológico a la regulación del pleomorfismo de la FSH uno debe de demostrar, como lo hemos hecho con este estudio, que las diversas isoformas son secretadas a la circulación y así alcanzan la célula blanco; que la producción y secreción de las isoformas se encuentran hormonalmente reguladas y que estas isoformas difieren funcionalmente. Para esto último, será necesario llevar a cabo un análisis de la actividad biológica de cada una de estas formas moleculares que la gonadotropina posee.

BIBLIOGRAFIA

1. Everet JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 1949, 44:234.
2. Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc* 1960,104:432.
3. Matsuo H, Baba Y, Mair RMV, et al. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. 1. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43:393.
4. Schally A, Arimura A, Baba Y, et al. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43:1334.
5. Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. In: Martin L, Ganog WF, (eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Pres 1988, 239-278.
6. Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 1978,102:1325.
7. Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 1982, 3:91.

8. Shivers BD, Harlan RD, Morrell JI. Absence of estradiol in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 1983, 304:34.
9. Huckle WR, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone action.II.The effector system. *Endocr Rev* 1 1988, 9:387.
10. Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action.I. The receptor. *Endocr Rev* 1988, 9:379.
11. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, González A, et al. Changes in the responsiveness of luteinizing hormone secretion of the opioid antagonist naloxone throughout male sexual maturation. *Clin Endocrinol* 1988, 29:17.
12. García-Rubí E, Vázquez-Aleman D, Méndez JP, et al. The effects of opioid blockade and GnRH administration upon luteinizing hormone secretion in patients with anorexia nervosa during the stages of weight loss and weight recovery. *Clin Endocrinol* 1992, 37:520.
13. Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol* 1988, 254:E658.
14. Lalloz MRA, Detta A, Clayton RN. Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone β -subunit gene *in vivo*. *Endocrinology* 1988, 122:1689.

15. Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human choriogonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 1982, 257:13306.
16. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 1991, 47:155.
17. Kow LM, Pfaff D. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Res* 1984, 297:275.
18. Urban RJ, Dahl KD, Padmanabhan V, et al. Specific regulatory actions of dihydrotestosterone and estradiol on the dynamics of FSH secretion and clearance in humans. *J Androl* 1991, 12:27.
19. Maison AJ, Berkemeir LM, Schmelzer CH, et al. Activin B: precursor sequence, genomic structure and in vitro activities. *Mol Endocrinol* 1989, 3:1352.
20. Quigley ME, Rakoff JS, Yen SS. Increased luteinizing hormone sensitivity in dopamine inhibition of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52:231.
21. Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *New Eng J Med* 1986, 315:1459.

22. Conn MP, Janovick JA, Stanislaus D, et al. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitamins and Hormones* 1995, 50:151.
23. Leong DA, Thorner MO, Lau SK, et al. A potential code of LHRH-induced calcium ion responses in the regulation of luteinizing hormone secretion among individual gonadotropes. *J Biol Chem* 1991, 266:9016.
24. Bremner WJ, Paulsen CA. Two pools of luteinizing hormone in the man pituitary: Evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 39:811.
25. Rebar R, Yen SSC, Vandenberg G, et al. Gonadotropin responses to synthetic LRF: dose-response relationship in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1973, 36:10.
26. Wang CF, Lasley BL, Yen SSC. Gonadotropin secretion in response to low and high doses of LRF in normal and hypogonadal women (Functional disparity of the gonadotrophs). *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 42:427.
27. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1983, 4:179.
28. Catt KJ, Dufau ML. Basic concepts of mechanism of action of peptide hormones. *Biol Reprod* 1976, 14:1.

29. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, et al. Self-priming effect of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin (hCG) upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Serum testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61:926.
30. Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and tyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988, 947:287.
31. Ulloa-Aguirre A, Rees Midgley A, Beitins Y, et al. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *End Rev* 1995, 16:765.
32. Ulloa-Aguirre A, Chappel SC. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol* 1982, 95:257.
33. Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza R, et al. Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol* 1990, 126:323.
34. Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Méndez JP, et al. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res* 1995, 26:219.

35. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 1983, 28:196.
36. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Cravioto A. et al. Studies on the microheterogeneity of chorionic gonadotropin secreted by the human cytotrophoblast in culture. *Hum Reprod* 1990, 5:661.
37. Padmanabhan V, Miehler D, Borondy M, et. al. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 1992, 131:213.
38. Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, et al. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Rep* 1992, 7:23.
39. Wide L. Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol* 1989, 123:519.
40. 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 Endocrinol Metab* 1995, 80:1647.

41. Phillips DJ, Wide L. Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79:814.
42. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970, 45:13.
43. Chromatofocusing with polybuffer and PBE, technical booklet series. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia. 38 pp 1980.
44. 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* 1986, 113:17.
45. Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, et al. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity, and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67:465.
46. Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76:885.
47. Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, et al. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol* 1986, 110:539.

48. Wide L, Albertsson-Wikland K. Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 70:271.
49. Padmanabhan V, Kelch RP, Sonstein J, et al. Bioactive follicle-stimulating hormone responses to intravenous gonadotropin-releasing hormone in boys with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 67:793.
50. Dahl KD, Bicsak T, Hsueh AJW. Naturally occurring anti-hormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science* 1988, 239:72.
51. Hsueh AJW, Bicsak TM, Jia X-C, et al. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1989, 45:209.
52. Mortola JF, Sathanandan M, Pavlou S, et al. Suppression of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels by a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist: pharmacodynamic studies. *Fertil Steril* 1989, 51:957.
53. Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, et al. Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil Steril* 1983, 40:242.

54. Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic GnRH on incorporation of radioactive glucosamine, and amino acids into LH and total protein by rat pituitaries. "in vitro". Endocrinology 1976, 98:151.
55. Vogel DL, Magner JA, Sherins RJ, et al. Biosynthesis, glycosylation, and secretion of rat luteinizing hormone alpha and beta-subunits: differential effects of orchietomy and GnRH. Endocrinology 1986, 119:202.
56. 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 1987, 120:1503.
57. Wide L, Naessén T. 17 β Estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. Clin Endocrinol (Oxf) 1994, 40:783.