

00381

33



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"CARACTERIZACION DE LAS DIVERSAS ISOFORMAS DE
FSH EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE PUBERTAD
EN EL VARON."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
M. EN C. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
CO-TUTOR: DR. ALFREDO ANTONIO ULLOA-AGUIRRE



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.

DEDICATORIA

A CARLOS POR SU GRAN AMOR Y POR ESTAR CERCA DE MI

A MIS PADRES Y HERMANOS POR EXISTIR

A MIS AMIGAS Y AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi Tutor; Juan Pablo Méndez por darme la oportunidad de superarme, por sus enseñanzas y por creer en mí.
- ❖ A mi Co-Tutor el Doctor Ulloa por su gran asesoría.
- ❖ A mis compañeras y amigas de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. I.M.S.S.
- ❖ A mis compañeras y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva. Hospital de Gineco-obstetricia no. 4 "Luis Castelazo Ayala". I.M.S.S.
- ❖ A los Doctores y las Doctoras; Luis Felipe Jiménez, Pablo Damián, Rebeca Franco, Marcela Aguilar y María Eugenia Chavarría por sus acertadas aportaciones para pulir mi trabajo de tesis.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización del Doctorado.

INDICE

INTRODUCCION

Pubertad	1-2
El papel del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en la pubertad	2-4
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)	4-6
Gonadotropinas	7-8
Regulación de la síntesis de gonadotropinas por la GnRH	8-9
Secreción bifásica de gonadotropinas	9-10
Mecanismos de regulación gonadal en la síntesis de gonadotropinas	11-12
Actividad biológica de la hormona estimulante del folículo	12-14
Isoformas de la hormona estimulante del folículo	14-18

OBJETIVOS	19
------------------	----

HIPOTESIS	19
------------------	----

SUJETOS Y METODOS

Diseño del Estudio	20
Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación	20
Obtención de muestras biológicas	21
Métodos	21-23
Fluoroimmunoanálisis de FSH (IFMA)	23-24
Bioensayo <i>in vitro</i> de FSH	24-25
Radioimmunoanálisis de AMPc	25-26
Cromatoenfoco de FSH	26-27
Radioimmunoanálisis de FSH	27-28

ANALISIS ESTADISTICO	29
-----------------------------	----

RESULTADOS

Actividad Inmunológica	30-31
Actividad Biológica	32
Isoformas de FSH	33-35

DISCUSION	36-47
------------------	-------

BIBLIOGRAFIA	48-59
---------------------	-------

ABREVIATURAS

ABP	Proteína fijadora de andrógenos
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
B/I	Cociente actividad biológica/inmunológica
CDF	Concentrado de fracciones
CF	Cromatoenfoco
E ₂	17-β Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
FSHrec	FSH recombinante
GDF	Grupo de fracciones
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HEK-293	Células 293 derivadas de riñon fetal humano transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para hFSH
HCG	Gonadotropina coriónica humana
hFSH	FSH humana
H-H-G	Hipotálamo-Hipófisis-Gónada
IEF	Isoelectroenfoco
IFMA	Fluoroimmunoanálisis
LH	Hormona luteinizante
pI	Punto isoelectrico
Proteínas Gs	Proteínas G estimuladoras
RIA	Radioimmunoanálisis
SNC	Sistema nervioso central
T	Testosterona

RESUMEN

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

En el presente estudio se determinó la actividad inmunológica y biológica *in vitro* de la FSH humana, además, separamos e identificamos las diversas formas moleculares de la FSH secretada tanto en condiciones basales, como después de estímulos repetidos con GnRH, durante los diversos estadios de pubertad del varón.

Se incluyeron 40 varones sanos distribuidos en los 5 estadios puberales. A cada sujeto se le extrajo 1.5 mL de sangre cada 10 min durante 2 h en forma basal, durante 4 h luego de la administración i.v. de 10 µg de GnRH y durante 4 h después de la administración de 90 µg de GnRH. La reactividad inmunológica de FSH se determinó en las 61 muestras obtenidas en cada sujeto mediante fluoroinmunoanálisis (IFMA); para la determinación de la actividad biológica se constituyeron 5 grupos de fracciones (GDF) para cada sujeto (I: 2 h basales, 2: primeras 2 h pos 10 µg, 3: siguientes 2 h pos 10 µg, 4: 2 primeras h pos 90 µg y 5: últimas 2 h pos 90 µg de GnRH). Cada uno de estos GDFs se sometieron a un bioensayo que cuantifica la producción de AMPc en células 293 derivadas de riñón fetal humano, transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para FSH humana. Para evaluar el patrón de distribución de las isoformas de FSH, se constituyeron 3 pozas para cada sujeto (I: 2 h basales, II: 4 h pos 10 µg de GnRH y III: 4 h pos 90 µg de GnRH). Cada poza fue dializada, liofilizada y sometida a un cromatoenfoco (CF) con un gradiente de pH de 7.5 a 3.0. El material eluido se dividió en 10 concentrados de fracciones (CDF) a intervalos de pH de 0.5. A cada CDF se le determinó su concentración de FSH por RIA.

La determinación de la actividad inmunológica demostró que en condiciones basales, la cantidad de FSH en los sujetos prepuberales es menor que la liberada por los sujetos que ya han iniciado la pubertad; además se observó que a lo largo de la pubertad la reserva hipofisiaria en respuesta al GnRH exógeno es mucho mayor que la sensibilidad y dichas pozas no se modifican a través del proceso puberal. Asimismo, en condiciones basales, la actividad biológica representada por el cociente B/I es menor en los sujetos prepuberales en relación con los sujetos que ya iniciaron la pubertad. Sin embargo, al cuantificar la sensibilidad y la reserva hipofisiaria al GnRH entre los diferentes estadios de Tanner, se observó que la secreción de FSH no se modifica en cantidad pero sí en calidad a partir del estadio 2 y también se mantiene en valores similares a lo largo de la pubertad. Las isoformas de FSH se dividieron en mayores y menores de pH 4.5. En todos los sujetos estudiados, en todas las fases del estudio, las isoformas de FSH fueron recuperadas predominantemente en valores de pH menores a 4.5. En condiciones basales, los sujetos en estadio 4 y 5 presentaron una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas que los sujetos en estadios 1, 2 y 3 de Tanner. Luego de los estímulos con 10 y 90 µg de GnRH, solamente en los Tanner 1, 2 y 3 aumentó la proporción de las isoformas menos ácidas.

El eje reproductor de los varones, presenta una menor secreción de FSH, así como una actividad biológica disminuida en el primer estadio puberal, lo que demuestra que esta gonadotropina participa de manera importante en el inicio de la pubertad. Independientemente del estadio puberal siempre predominaron las formas más ácidas de FSH, lo cual puede explicarse como una consecuencia de su mayor vida media. La secreción de las isoformas menos ácidas en los Tanner 4 y 5 en relación con los otros grupos, puede deberse a 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 y 90 µg de GnRH en los sujetos Tanner 1, 2 y 3 pudiesen deberse a cambios existentes en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH, a los cambios en el ambiente esteroideogénico o una combinación de ambos factores.

ABSTRACT

The follicle-stimulating hormone (FSH), which is released in a pulsatile manner by the pituitary, is constituted by a group of isoforms that differ between them in their carbohydrate composition. Each isoform exhibits specific physicochemical and biological characteristics and the existing microheterogeneity depends on the endocrine status of the subject.

In the present study, the immunological and biological activity *in vitro* of the human FSH were determined. We also separated and identified the various molecular forms of FSH secreted at the baseline, as well as after repeated stimuli with GnRH, throughout male puberty.

Forty healthy males distributed in the 5 puberal stages were included. 1.5 ml of blood were obtained from each subject every 10 min for 2 h at the baseline, for 4 h after the i.v. administration of 10 µg of GnRH and for another 4 h after the administration of 90 µg of GnRH. FSH immunological reactivity of the 61 samples from every subject, was determined by IFMA. For each subject, five groups of fractions (GDF) were formed in order to determine their biological activity: 1) 2 h at baseline; 2) first 2 h after 10 µg; 3) next 2 h after 10 µg; 4) first 2 h after 90 µg and 5) last 2 h after 90 µg of GnRH. All the GDFs were assessed with a bioassay that quantifies the cAMP production by 293 cells. This cellular line, derived from human embryon kidney cells, is transfected with the cDNA of the human FSH recombinant receptor. The distribution pattern of the FSH isoforms was evaluated by making 3 pools for each subject: I) 2 h at the baseline, II) 4 h after 10 µg of GnRH and III) 4 h after 90 µg of GnRH. Each pool was dialyzed, lyophilized and chromatofocused (CF) under a pH gradient from 7.5 to 3.0. The eluted material was separated into 10 concentrates of fractions (CDF), at pH intervals of 0.5. The concentration of FSH of each CDF was determined by RIA.

At the baseline, the immunological activity determination demonstrated that the FSH quantity in the prepuberal subjects is less than the released by the subjects in which the puberty has begun. Moreover, it was observed that throughout the puberty the pituitary reserve in response to exogenous GnRH is much larger than the sensibility and those pools are not modified through the puberal process. In the same way, at the baseline, the biological activity (represented by the B/I ratio) is less in the prepuberal subjects than in the pubertal subjects. However, the quantification of the sensibility and pituitary reserve to GnRH in the different Tanner stages showed that the secretion of FSH is not modified in quantity but in quality from stage 2, and that it maintains similar values during the puberty. The FSH isoforms were divided in over pH 4.5 and under pH 4.5. The FSH isoforms were recovered predominantly at pH values under 4.5 for all the subjects and in all the phases of the study. At baseline, subjects at Tanner's stages 4 and 5 showed a higher relative abundance of the less acidic isoforms than those subjects at stages 1, 2 and 3. After the 10 and 90 µg of GnRH stimuli, the proportion of the less acidic isoforms increased only in Tanner 1, 2 and 3.

The male reproductive axis presents a lower secretion of FSH, as well as a decreased biological activity at the first puberal stage, showing that this gonadotropin plays an important role in the puberty beginning. The more acidic forms of FSH were always predominant, independently of the puberal stage; this may be explained as a consequence of their longer half life. The secretion of less acidic isoforms in Tanner 4 and 5, compared with the other groups, may be due to a higher synthesis of these isomers induced by the endocrine milieu at this phase of life. The observed changes in the distribution of the FSH isoforms, after 10 and 90 µg of GnRH stimulation in subjects at Tanner 1, 2 and 3 maybe due to existent changes in pulsatility frequency of GnRH, to the changes in the steroidogenic environment or to a combination of both.

INTRODUCCION

Pubertad

La pubertad se define como la etapa de transición de la niñez a la vida adulta. Los cambios tanto físicos como psicológicos que se presentan condicionan que el individuo, muchas veces con dificultad, tenga que adaptarse a su nueva situación biopsicosocial. Esta etapa debe ser considerada como una fase más del desarrollo gonadal, la cual conduce finalmente a la madurez sexual completa y a la fertilidad. La edad de inicio es variable puesto que depende de factores genéticos, constitucionales y ambientales (Wheeler, 1991; Parra y Ramos-Galván, 1992). Las gónadas se desarrollan tanto en su tamaño como en sus funciones endócrina y reproductiva especializadas. La producción total de hormonas sexuales aumenta progresivamente, lo que conduce al desarrollo de las características sexuales secundarias y en asociación y dependencia íntima con los eventos hormonales, con lo cual da comienzo la gametogénesis.

La maduración sexual secundaria en los varones comprende el desarrollo testicular, el genital y la aparición de vello púbico. En condiciones normales en nuestro medio, el inicio de los cambios puberales se presenta después de los 9 años de edad (media 11.5 años, con límites entre los 9 y 14 años) (Wheeler, 1991). Concomitantemente con el crecimiento peneano, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas bulbouretrales crecen y se desarrollan. La primera eyaculación se presenta durante la pubertad temprana o media, generalmente precediendo al pico de crecimiento lineal, a una edad cronológica promedio de 14.3 años (Laron *et al*, 1980). El crecimiento peneano comienza generalmente entre 12 y 18 meses después del inicio del crecimiento testicular. El vello púbico aparece generalmente poco después de que ha dado inicio el desarrollo genital. La aparición del vello facial y axilar es sumamente variable y su magnitud depende de factores genético-raciales. El vello axilar aparece aproximadamente dos años después de la aparición del púbico. Otros cambios físicos tales como el aumento en

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

La descripción comparativa de los cambios físicos entre individuos y poblaciones requiere de un método objetivo y reproducible que describa y clasifique las características sexuales secundarias así como a las diferentes etapas puberales. Estas características fueron descritas y agrupadas para niñas y niños por Marshall y Tanner en 1969 y 1970 respectivamente, siendo esta clasificación la más aceptada internacionalmente. En el varón, dicha clasificación incluye las siguientes características: volumen testicular; rugosidad, coloración y elongación del escroto; longitud y grosor del pene y cantidad, distribución y propiedades del vello púbico. Con base en estas características, la pubertad del varón se divide en cinco estadios de desarrollo, los cuales van desde el estadio 1 (prepuberal) hasta el estadio 5 que corresponde al adulto normal. La pubertad da principio con la elongación escrotal y el aumento en el volumen testicular (Burr *et al*, 1970). El crecimiento de los testículos se presenta durante un período aproximado de 4 años alcanzándose un volumen final mayor de 15 ml. El crecimiento testicular está dado principalmente a expensas de la maduración de los túbulos seminíferos por la acción de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Simoni *et al*, 1999).

El papel del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada en la pubertad

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

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

Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

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

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

El sistema nervioso central se comunica con la hipófisis anterior a través de una vía vascular. La síntesis de la GnRH se efectúa en neuronas especializadas localizadas predominantemente en el núcleo arcuato del hipotálamo mediobasal y en el área preóptica del hipotálamo anterior (Marshall *et al*, 1988). Este péptido es secretado en forma pulsátil por las terminales neuronales hacia una red capilar especializada que rodea a la eminencia media; una vez que alcanza la circulación del sistema porta-hipofisario es transportado hacia la hipófisis anterior, estimulándose la síntesis y secreción tanto de LH como de FSH (Gharib *et al*, 1990). Se ha demostrado que los pulsos de frecuencias altas (pulsos rápidos) favorecen la síntesis y secreción de LH, mientras que los pulsos de frecuencias bajas (pulsos lentos) favorecen la secreción de FSH (Dalkin *et al*, 1989).

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

proteínas $G_{q/11}$, las cuales estimulan a la fosfolipasa C (PLC) para que se produzca la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) en inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG). El IP3 difunde a través del citoplasma promoviendo la liberación del calcio intracelular, el DAG actúa activando la cinasa C de proteínas (PKC). La activación de la PKC en forma directa puede estimular la liberación de la LH (Catt y Stojilkovic, 1989; Conn, 1989; Hawes y Conn, 1993). La GnRH induce un incremento del calcio intracelular el cual actúa como un segundo mensajero en la liberación de LH inducida por GnRH (Hawes y Conn, 1993). Estas acciones provocan un aumento bifásico de la concentración de calcio citosólico y consecuentemente inducen la liberación de las gonadotropinas (Catt y Stojilkovic, 1989). Los mecanismos dependientes de calcio son los responsables de la liberación inmediata de las gonadotropinas contenidas en los gránulos secretorios y éstos también contribuyen en la síntesis de las subunidades de las gonadotropinas. Un mediador intracelular de la señal de calcio en el gonadotropo es la calmodulina, la cual después de unirse al calcio altera la actividad de varias enzimas y proteínas del citoesqueleto que están implicadas en los procesos secretorios (Conn *et al*, 1995). Asimismo, se ha propuesto que la activación de un elemento proteico existente en el complejo contráctil citoesqueleto-vesícula, se presenta después de la fosforilación, induciéndose entonces la extrusión de los gránulos que contienen a las hormonas (Conn, 1989).

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

Gonadotropinas

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la tirotrópina, son glicoproteínas estructuralmente similares formadas por dos subunidades denominadas subunidad alfa y subunidad beta, unidas entre sí por fuerzas no covalentes (Figura 1). La subunidad alfa es idéntica entre estas glicoproteínas, y está conformada siempre por la misma secuencia de aminoácidos para una misma especie (Timossi *et al*, 1999), mientras que la subunidad beta es única para cada hormona y les confiere su especificidad biológica. La actividad biológica de las glicoproteínas hipofisarias sólo se observa si ambas subunidades se encuentran unidas (Pierce y Parsons, 1981).

Ambas gonadotropinas hipofisarias ejercen su acción sobre las gónadas (testículos y ovarios) al estimular la síntesis de esteroides sexuales, así como la maduración de los gametos (Chappel *et al*, 1983a). En los testículos, el sitio primario de acción de la FSH es el epitelio de los túbulos seminíferos, donde se une a la parte basal de las células de Sertoli con la consecuente estimulación de la espermatogénesis y la síntesis de diversos compuestos de naturaleza proteica [inhibina, activina, proteína fijadora de andrógenos (ABP)] y del complejo enzimático de aromatasas que convierte a la testosterona en estradiol, mientras que en el ovario, la FSH se une a sus receptores en las células de la granulosa para estimular el desarrollo folicular. La LH induce la síntesis y secreción de andrógenos en las células de Leydig, siendo el principal de éstos la testosterona; en la mujer, la LH estimula la esteroidogénesis ovárica (Ganong, 1987).

La FSH se une a receptores específicos localizados en la membrana de la célula blanco (Baccetti *et al*, 1998). El receptor de FSH es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre *et al*, 1999a); consiste de una cadena única de aminoácidos que posee un gran dominio extracelular cuya función es para la unión del ligando, siete regiones transmembranales conectadas entre sí por 3 asas intra y extracelulares así como un dominio

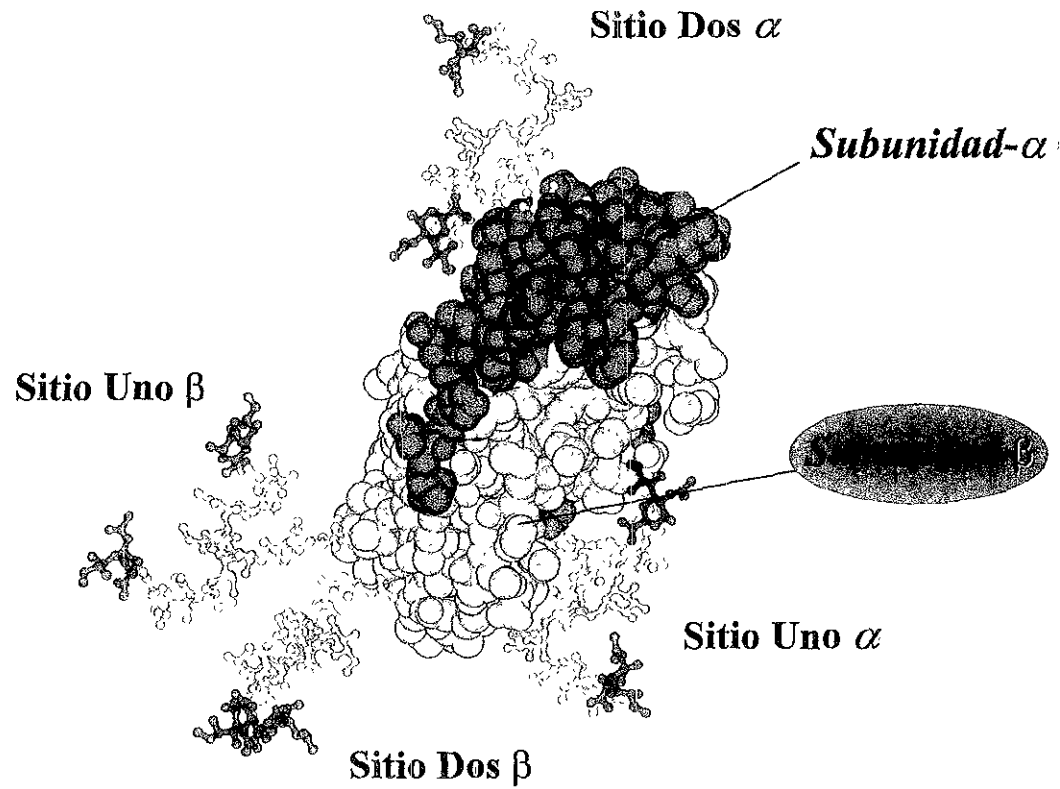


Figura 1. Modelo homólogo de la FSH humana totalmente glicosilada y sializada, después de la sustitución de la secuencia primaria de la hCG β por la de la FSH β en la estructura de la hCG mostrada por rayos-X y de la minimización de la estructura resultante empleando el programa RASMOL. Los carbohidratos son representados por las esteras y bastones pequeños. Las esferas rojas representan al ácido siálico, las amarillas a las moléculas de GalNac y GlcNAc y las verdes a las unidades de manosa. Las esferas azules compactadas muestran a la subunidad- α y las verdes a la subunidad- β del dímero. (Reproducida con la autorización de Ulloa-Aguirre A y cols. (1999) *Endocrine*, 11, 205-215 y de Humana Press, Inc.) (La reproducción original fue cortesía del Dr James A. Dias, David Axelrod Institute for Public Health, Wadsworth Center, Albany, NY, EUA).

carboxilo terminal intracelular, asociados con la activación de una o más proteínas transductoras de señal que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (Minegishi *et al*, 1991; Kelton *et al*, 1992). En conjunto, las siete regiones transmembranales forman una estructura tridimensional semejante a un cilindro (Figura 2), el cual se encuentra orientado perpendicularmente al plano de la membrana celular. La realización de experimentos mediante el uso de péptidos sintéticos correspondientes a la región carboxilo terminal de la tercera asa intracelular (lisina 551-arginina 555) del receptor de FSH de rata, han demostrado que esta región es particularmente crítica para el acoplamiento de proteínas G estimuladoras (Gs), activación de la cinasa A de proteínas (PKA) y síntesis de 17β estradiol (Grasso *et al*, 1995 a,b) (Figura 2). En el testículo, la FSH interactúa con receptores específicos de superficie celular localizados en la membrana citoplasmática de las células de Sertoli (Chappel *et al*, 1997).

Regulación de la síntesis de gonadotropinas por la GnRH

La GnRH, liberada en forma episódica condiciona dos subtipos de patrones de secreción de gonadotropinas: tónico y cíclico. El patrón de secreción tónico es observado en los varones y es también uno de los mecanismos existentes en la mujer, mientras que la secreción cíclica es exclusiva de la mujer en edad reproductiva. Es importante señalar que la secreción de gonadotropinas es pulsátil en todas las etapas de la vida, ya sea que el patrón sea tónico o cíclico sin importar la edad (en el feto, en el recién nacido, en el niño, en el adolescente y en el adulto) (Dunkel *et al*, 1990; Wu *et al*, 1996). El desarrollo de nuevas metodologías como el fluoroinmunoanálisis (IFMA) han permitido la detección de pulsos aún cuando la concentración de las gonadotropinas es baja, como sucede en los individuos prepuberales (Mitamura *et al*, 1999, 2000).

La hipófisis responde solamente al estímulo de tipo pulsátil de la GnRH, pues al exponer a la glándula continuamente a la acción de esta hormona se observa una falta de respuesta al

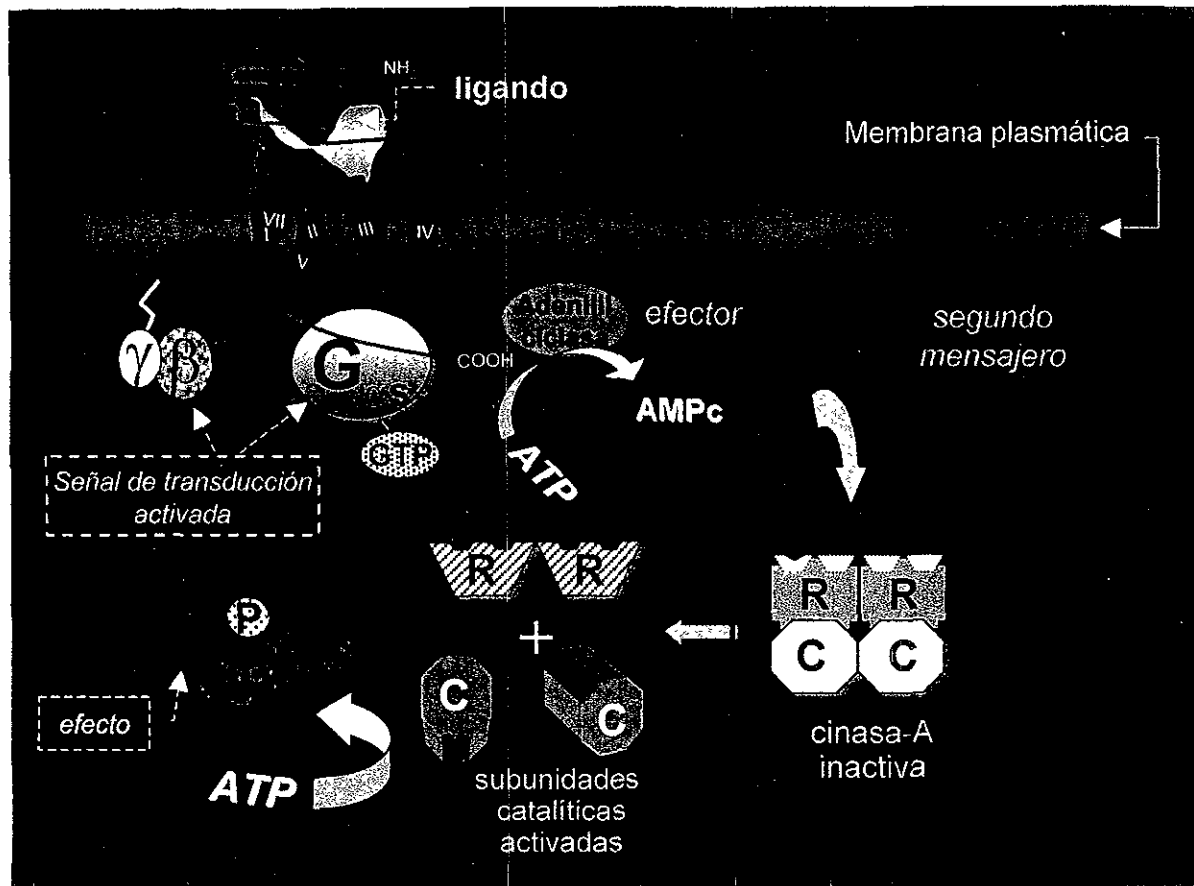


FIGURA 2. Señal de transducción mediada por la vía de la proteína $G_{\alpha s}$ en respuesta al estímulo gonadotrópico (ligando). Después de la activación del receptor por la señal proveniente del gonadotropo, la subunidad $G_{\alpha s}$ activada (unida a GTP) estimula a la enzima efectora, la adenilil-ciclase, y la producción de un segundo mensajero, el AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc activa subsecuentemente a la cinasa A de proteínas, iniciándose de esta manera una cascada de fosforilación (P) y activación de proteínas intracelulares. R, subunidad regulatoria de la cinasa A; C, subunidad catalítica.

estímulo, presentándose el fenómeno de regulación decreciente o de desensibilización por parte de los receptores de la hormona (Conn y Crowley, 1991). La desensibilización significa que una exposición prolongada de la célula blanco a una concentración hormonal sostenida induce una respuesta hormonal disminuida (Ulloa-Aguirre y Conn, 1998). 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 tal como sucede con el receptor de hCG (Ascoli, 1982). Asimismo se ha observado que tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisiaria, además de que la frecuencia en la pulsatilidad de GnRH es modificada de acuerdo con el ambiente endócrino existente; por ejemplo, esta frecuencia presenta variaciones a lo largo del ciclo ovulatorio (Marshall *et al*, 1991).

Secreción bifásica de gonadotropinas

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

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

La administración de dosis submáximas de GnRH por un período de varias horas, bien sea mediante inyecciones repetidas o por infusión continua, permite llevar a cabo tanto la evaluación de la poza metabólica de gonadotropinas que se libera de forma aguda como aquella que se libera tardíamente. Cada poza metabólica representa distintas condiciones fisiológicas, pues la primera refleja la sensibilidad del gonadotropo y la segunda la reserva del mismo. El concepto de la existencia de dos pozas metabólicas hipofisarias de gonadotropinas es útil para el análisis del significado funcional, tanto de la sensibilidad como de la reserva hipofisaria. Si la estimulación con GnRH es breve y submáxima (5-10 μg), el incremento inicial de la concentración sérica nos indicará la sensibilidad hipofisaria y probablemente reflejará la concentración total de la primera poza. La estimación de la reserva hipofisaria, requiere de una duración más prolongada del estímulo o de una cantidad suprafisiológica de GnRH (90-100 μg). La liberación subsecuente de la hormona probablemente representa una aproximación del tamaño de la poza de almacenaje o reserva, la cual puede incluir un componente de nueva síntesis. Al aplicar una dosis única elevada de GnRH (100-150 μg), no se pueden apreciar por separado los componentes de sensibilidad y reserva, ya que la existencia de una acción más potente ocasiona la liberación de ambas pozas de manera conjunta (Wang *et al*, 1976b).

Mecanismos de regulación gonadal en la síntesis de gonadotropinas

Las tres clases de esteroides secretados por las gónadas (estrógenos, progestágenos y andrógenos) se unen a receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis y regulan directamente la secreción de gonadotropinas (Winters y Troen, 1985; Winter *et al*, 1992). Los receptores a hormonas esteroides han sido localizados ampliamente en las células cerebrales, donde además se han relacionado con la regulación de la conducta sexual y la diferenciación del cerebro (Pfaff y Ewen, 1981).

Existen otras tres hormonas gonadales diferentes a los esteroides, encargadas de regular la secreción de gonadotropinas conocidas como inhibinas, activinas y folistatina. Las dos primeras son proteínas diméricas unidas por puentes disulfuro; las inhibinas están constituidas por una subunidad α unida con una de las dos subunidades β disponibles (βA ó βB), dando origen a las inhibinas conocidas como inhibina A e inhibina B (Mayo *et al*, 1994). Las activinas son dímeros formados por la unión de las dos subunidades β de la inhibina, existiendo la posibilidad de originarse 3 tipos de activina la A, la B y la AB, constituidas por la unión de 2 subunidades βA ó βB o por la unión de una subunidad de cada tipo respectivamente. La folistatina es una proteína monomérica (Ying, 1988). Estas hormonas, son producidas por las gónadas además de ser sintetizadas en una amplia variedad de tejidos como la hipófisis, el hígado, la placenta, la médula ósea, la glándula suprarrenal y el cerebro (Mather *et al*, 1997). La inhibina es un supresor selectivo de la síntesis y secreción de FSH tanto *in vivo* como *in vitro* (Mather *et al*, 1997; Anderson *et al*, 1998; Hayes *et al*, 1998;); sin embargo, en condiciones fisiológicas sus efectos son enmascarados por la presencia de testosterona (Culler, 1990; Culler y Negro-Vilar, 1990). Durante la pubertad del varón, las concentraciones basales de inhibina B y de FSH correlacionan negativamente en los estadios intermedios de la pubertad (Tanner 3 y 4) sugiriéndose que en esta etapa del desarrollo se establece un asa de retroalimentación entre ambas hormonas (Anderson *et al*,

1998; Raivio *et al*, 1998; Raivio *et al*, 2000). Por otro lado, la activina incrementa la síntesis y secreción de FSH, mientras que la folistatina actúa bien sea indirectamente al bionutralizar a la activina (Ying, 1988) o por medio de su asociación con cadenas de sulfato de heparán de la membrana plasmática, lo cual favorece la unión de activina a su receptor, produciéndose su captación dentro de las células (Mather *et al*, 1997).

Existen otros mecanismos de regulación de la síntesis y secreción de gonadotropinas a nivel central. La prolactina inhibe la secreción de GnRH (Calogero *et al*, 1996). Asimismo, las gonadotropinas pueden actuar en el hipotálamo al modular la secreción de GnRH (asa corta de retroalimentación) y a su vez la GnRH puede influir directamente sobre su propia secreción (asa ultracorta de retroalimentación) (Marshall *et al*, 1988).

Actividad biológica de la hormona estimulante del folículo

La acción biológica de las hormonas no está necesariamente determinada por las concentraciones inmunoreactivas de las mismas, sino por la actividad biológica que posee cada una de estas hormonas. Con base en lo anterior, podemos señalar que la determinación de la actividad biológica es lo que finalmente indica con mayor precisión las acciones *in vivo* que tiene cada hormona. Los primeros ensayos para determinar la actividad biológica de FSH fueron realizados *in vivo* (Steelman y Pohley, 1953). Sin embargo, el realizar ensayos *in vivo*, en condiciones variadas, no es factible desde el punto de vista biológico. Asimismo, estos ensayos en muchas ocasiones no poseen una especificidad completa, son imprecisos y poco sensibles. En años recientes se han diseñado nuevos ensayos biológicos *in vitro* para valorar la actividad biológica de la FSH, los cuales se han llevado a cabo en tejidos endocrinos, cultivos primarios de células dispersas, o en líneas celulares permanentes. Debido a que un gran número de sustancias pueden potenciar o inhibir la respuesta en el bioensayo, siempre se deberá de elegir el bioensayo más específico para cada caso. Uno de los bioensayos más sensibles y específicos

es el desarrollado por Tilly *et al* (1992) y Albanese *et al* (1994), en el cual se utilizan líneas celulares transfectadas con el receptor recombinante de FSH humano (hFSHR), donde las células tienen una estabilidad en cultivo por mayor tiempo, responden de una manera dosis dependiente a la FSH y no a otras hormonas glicoproteicas, permiten que el bioensayo sea específico para la especie, no se requiere de un cultivo primario y se puede concluir en 24 horas después de la adición de la hormona (Tano *et al*, 1995; Christin-Maitre *et al*, 1996a,b; D'Antonio *et al*, 1999). La alta sensibilidad y especificidad de este bioensayo facilita la medición de la bioactividad en muestras de suero que contienen bajas concentraciones de la gonadotropina como sucede en los sujetos prepuberales (Mitamura *et al*, 1999).

Un modelo experimental en el cual se han estudiado los cambios en la secreción de FSH bioactiva e inmunoactiva antes y al inicio de la pubertad han sido las ovejas. Padmanabhan y *cols* (1992), demostraron que durante la inducción de la pubertad en las ovejas hembra, la administración pulsátil de GnRH exógena induce un incremento en las concentraciones de FSH bioactiva. Sin embargo, las concentraciones de FSH inmunoactiva no reflejan dicho incremento. Por el contrario, al analizar las concentraciones tanto inmunoactivas como bioactivas en ovejas macho no se encontraron diferencias entre animales puberales y no puberales en la actividad biológica, encontrándose solamente un incremento moderado en las concentraciones de FSH inmunoactiva (McNatty *et al*, 1998).

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios para caracterizar la actividad inmunológica y/o la actividad biológica de las gonadotropinas en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas en el ser humano (Wang *et al*, 1976 a,b; Jaakkola *et al*, 1990; Marshall *et al*, 1991; Dahl *et al*, 1992; Reyes-Fuentes *et al*, 1997). Las interrogantes actuales sobre los mecanismos íntimos que dan inicio al proceso puberal han llevado a diversos grupos de investigadores a tratar de demostrar diferencias en la actividad biológica y/o en el cociente B/I a lo largo del proceso puberal. Sin embargo, en los estudios realizados

hasta ahora solamente se han cuantificado muestras únicas en los sujetos estudiados. Debido a la pulsatilidad de las gonadotropinas, estos estudios no han podido determinar con precisión la relación entre las actividades biológica e inmunológica en esta etapa de la vida (Beitins *et al*, 1990; Kasa-Vubu *et al*, 1993; Kletter *et al*, 1993). De hecho, dos de los estudios (Beitins *et al*, 1990; Kletter *et al*, 1993) los cuales fueron llevados a cabo por el mismo grupo de investigadores demuestran resultados contradictorios en cuanto a el cociente B/I en los diferentes estadios puberales.

Isoformas de la hormona estimulante del folículo

La hormona estimulante del folículo, al igual que otras glicoproteínas, no es una hormona de estructura única sino que está constituida por un grupo de isoformas (Figuras 3 y 4). La presencia de variaciones en la estructura y en la distribución de oligosacáridos sializados y en menor grado sulfatados en la hormona, constituye la base química para la formación de las isoformas (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). Los oligosacáridos desempeñan una función importante en el plegamiento, ensamblaje de subunidades y secreción de la molécula, además de que determinan la tasa de depuración metabólica así como la interacción de la hormona con su receptor (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995b, 1999b; Timossi *et al*, 1999). 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 que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a).

Los residuos terminales de ácido siálico y de sulfato, presentes en los oligosacáridos de las gonadotropinas determinan su tasa de depuración metabólica, así como la potencia biológica *in vivo* de la molécula (Fiete *et al*, 1991; Manzella *et al*, 1995; Timossi *et al*, 1999). Los sulfatos terminales favorecen la remoción de las gonadotropinas de la circulación en su paso a través de las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor

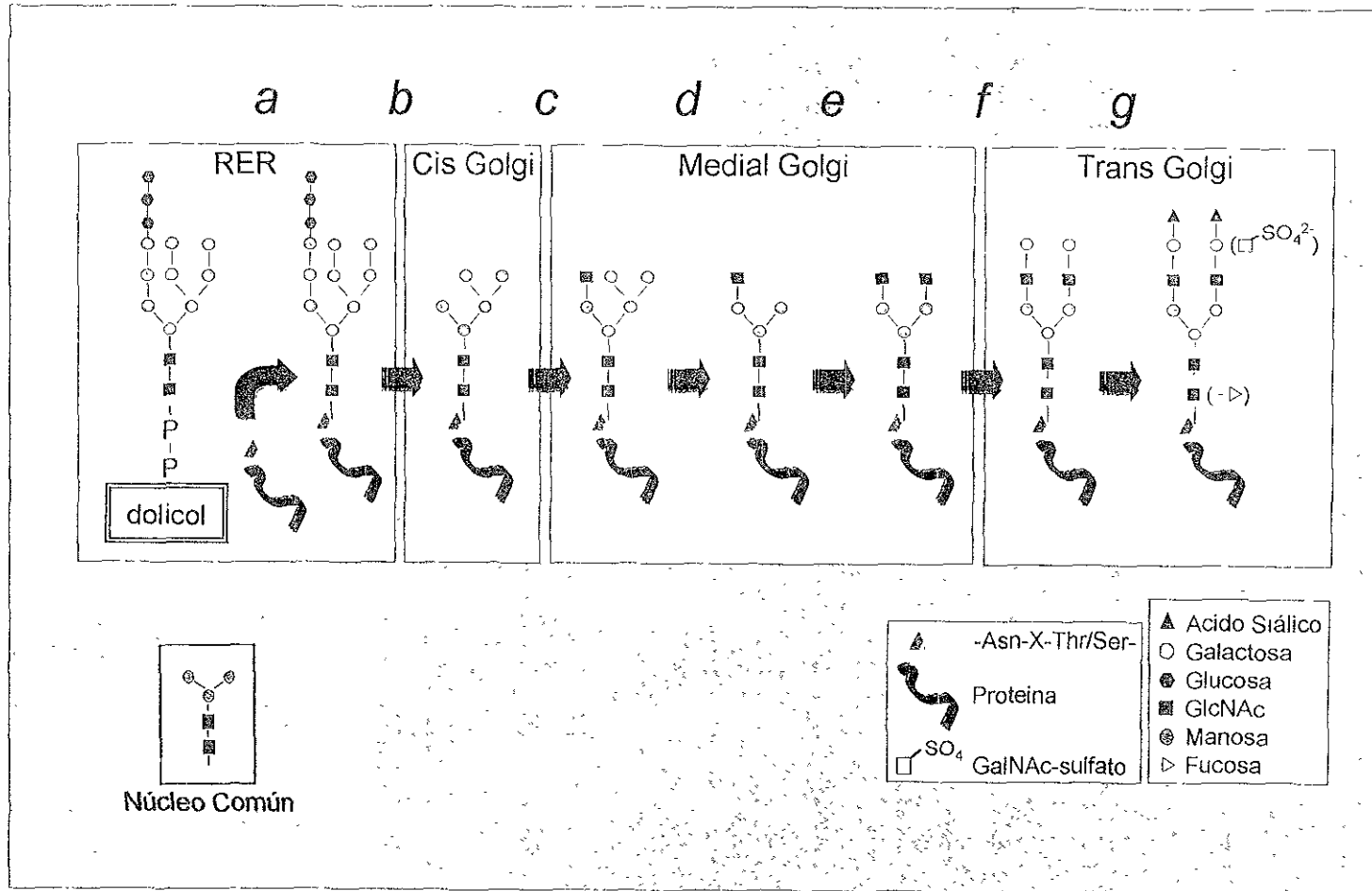


FIGURA 3. Resumen de la vía biosintética de la *N*-glicosilación. Se muestran algunos de los pasos clave, comenzando con la transferencia en bloque del núcleo de un precursor ligado al lípido dolicol. Estos pasos incluyen: transferencia a una asparagina del oligosacárido Glc₃Man₅GlcNAc₂, unido a dolicol catalizada por la oligosacariltransferasa, en el sitio de glicosilación -Asn-Xaa-Thr/Ser- (paso *a*); las α -glucosidasas I y II remueven los residuos de glucosa terminales, la α -1,2-manosidasa del retículo endoplásmico (RER) remueve un residuo de manosa y la α -manosidasa I del aparato de Golgi remueve otros tres residuos de manosa (paso *b*); la *N*-acetilglucosamina transferasa agrega *N*-acetilglucosamina, formando un precursor para una estructura que posee sólo una rama completa (estructura *j* en la Figura 4A) (paso *c*) o llevando a un proceso continuo en el que la α -manosidasa II del aparato de Golgi remueve dos residuos de manosa (paso *d*) y la *N*-acetilglucosamina transferasa II agrega un segundo residuo de *N*-acetilglucosamina (paso *e*), conduciendo a un procesamiento posterior (pasos *f* y *g*), el cual, eventualmente resulta en los oligosacáridos mostrados en la figura 4A.

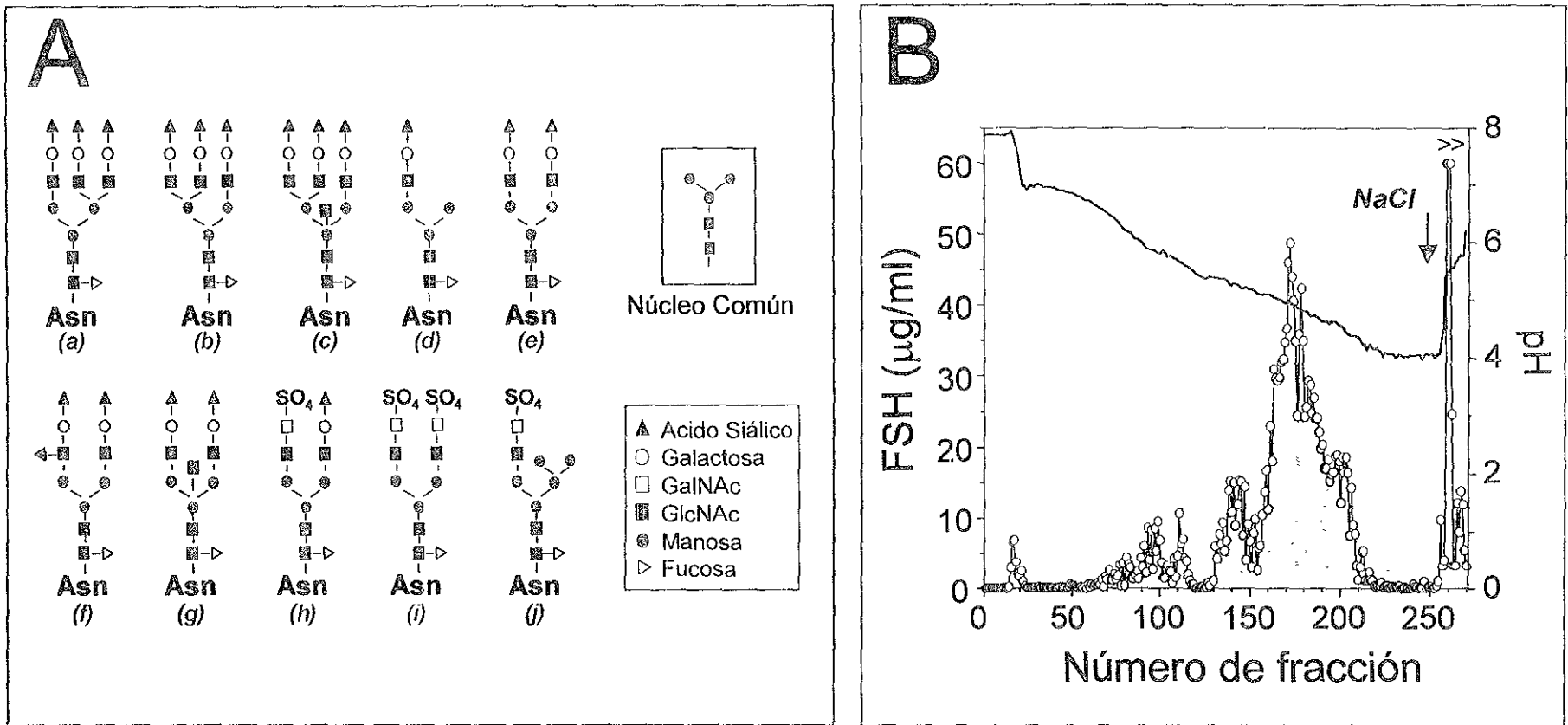


FIGURA 4. A: Algunas de las estructuras de los oligosacáridos N-ligados a las hormonas glicoprotéicas del ovino, bovino y del humano. Se muestran únicamente las estructuras completas ya que es posible encontrar otros oligosacáridos que son versiones incompletas de éstas y que carecen principalmente de residuos terminales de sulfato, ácido siálico y fucosa. GalNAc= N-acetilgalactosamina; GlcNAc= N-acetilglucosamina; Asn= asparagina. Las preparaciones de gonadotropinas recombinantes producidas por células CHO, carecen de estructuras con residuos de GlcNAc bisectantes (estructuras c y g), de ácido siálico ligado en posición α 2,3 y de sulfatos terminales. (Reproducida con la autorización de Ulloa-Aguirre A y cols (1999) *Endocrine*, 11, 205-215 y de Humana Press, Inc.). B: Patrón representativo de distribución por carga de la FSH humana intrahipofisaria después de su separación por cromatografía. Cada pico de inmunoreactividad representa una isoforma de la FSH (áreas sombreadas con el color azul). La flecha indica la adición de 1.0 M de cloruro de sodio para recuperar las formas unidas al soporte de la columna a un pH de 4.0. El primer pico de la izquierda contiene a las moléculas que fluyeron a través de la columna sin restricción (pH > 7.0).

1996a). El tratamiento de mujeres hipogonádicas con antagonistas de la GnRH conduce a la producción de isoformas de FSH con un cociente B/I reducido, probablemente debido a una alteración en la glicosilación (Dahl *et al*, 1988).

La mayor resolución para la separación de isoformas se obtiene mediante técnicas que separan por carga como el isoelectroenfoque (IEF) o el cromatoenfoque (CF). Este último método ofrece la ventaja adicional de que las proteínas que se encuentran fuera de la ventana del pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas y nuevamente separadas a través de un intervalo de pH diferente, sin que exista pérdida significativa de la actividad (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982). Ha sido demostrado que las isoformas de FSH tienen predominantemente carga negativa, ya que sus puntos isoelectricos (pI) que corresponden a valores de 5.5 a 3.4, contrastan con lo que ha sido descrito para las isoformas de LH (Robertson *et al*, 1977). La naturaleza ácida de las isoformas de FSH, se debe primordialmente a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (aproximadamente 87%) con residuos terminales de ácido siálico (Green y Baenziger, 1988).

La rata y el hámster han sido los modelos experimentales más utilizados para la caracterización del pleomorfismo de la FSH. Por medio del IEF o del CF, varios grupos de investigadores han caracterizado detalladamente la distribución de las diversas isoformas de FSH tanto *in vitro* como *in vivo* durante diversas condiciones fisiológicas y experimentales (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). En extractos hipofisarios de hámsters y ratas, hembra y macho, se ha demostrado la presencia de 6 a 7 isoformas inmunoactivas de FSH. Asimismo, Chappel *y cols.*, en 1983 (b) demostraron que en la hipófisis de ratas hembras prepúberes existen todas las isoformas de FSH observadas en las ratas adultas; sin embargo, antes de la pubertad la mayoría (60-70%) de la FSH inmunoactiva migra hacia regiones con un pI fuertemente ácido (3.4-4.9). En la etapa de la apertura vaginal, es posible observar un incremento significativo en la proporción de algunas isoformas menos ácidas de FSH (pI=5.0-

6.0) que son las que poseen mayor unión al receptor y mayor actividad biológica *in vitro*. Por lo tanto, pareciese que durante la pubertad la hipófisis adquiere la capacidad de transformar el porcentaje de las isoformas existentes al aumentar la cantidad relativa de las que presentan mayor actividad biológica. Durante la maduración sexual en la rata macho, la aparición de formas ácidas (pI de 4.9 a 4.0) se presenta al final de la espermatogénesis y de la separación balano-prepucial (Ulloa-Aguirre *et al*, 1986). En otro estudio realizado en ovejas hembra, se examinaron los cambios en la distribución de las isoformas de FSH en paralelo con los cambios en la secreción de FSH bioactiva, demostrándose que al inducir la pubertad existe un cambio marcado en la distribución de isoformas de FSH circulante hacia aquellas isoformas menos ácidas (Padmanabhan *et al*, 1992).

En el varón 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 (Ulloa-Aguirre *et al*, 1992a; Stanton *et al*, 1996; Zambrano *et al*, 1996), como en suero (Wide, 1982) y en orina (Ulloa-Aguirre *et al*, 1992b). Asimismo, se han llevado a cabo dos estudios en los cuales se han descrito diversas isoformas de la gonadotropina en sujetos puberales; sin embargo, ambos estudios demuestran resultados parciales y poco generalizables debido a diseños experimentales inadecuados. En un primer estudio, Phillips y Wide (1994) analizan una muestra basal única, además de muestras tomadas a los 30, 60 y 90 minutos pos GnRH de 10 púberes (que se encontraban en estadio de desarrollo puberal 2, 3, 4 ó 5). En este trabajo los autores no especifican en que estadio se encontraba cada uno de los sujetos estudiados, por lo cual no se puede inferir cual era la respuesta observada para cada estadio puberal. La única conclusión válida de este estudio es que las isoformas de FSH, al igual que las de LH, tienden a ser más básicas después del estímulo exógeno con GnRH; sin embargo, hay que considerar que los 10 sujetos fueron estudiados únicamente a los 30 y a los 60 minutos, ya que solamente en 4 de ellos se pudo obtener muestra a los 90

minutos. Asimismo, al haber obtenido una muestra basal única, se limita la interpretación que se le pueda dar a este trabajo. En el segundo estudio Phillips *y cols.*, (1997) tratan de demostrar que de manera basal las formas moleculares de FSH difieren entre los diversos estadios puberales. Ahora bien, solamente se colectó una muestra basal, lo cual también hace poco generalizables a los resultados. Además, esta muestra fue tomada indistintamente a las 0200 o a las 0400 horas. Estos autores no consideraron que la actividad de la GnRH hipotalámica durante la pubertad se incrementa inicialmente durante los pulsos nocturnos episódicos de secreción (Boyar *et al*, 1972), por lo cual no es experimentalmente correcto tomar una sola muestra en condiciones que podrían ser diferentes para cada sujeto. En ninguna parte del estudio se indican los volúmenes testiculares de cada uno de los sujetos y de los 40 niños estudiados cuatro presentaban talla baja, sin indicarse si ésto era debido a una deficiencia de hormona de crecimiento (total o parcial) o a una talla baja constitucional; además, en este segundo estudio no se estimuló con GnRH. Como se puede observar, el diseño experimental en ambos estudios es limitado, razón por la cual los resultados obtenidos solamente podrían demostrar fenómenos aislados en cuanto a la distribución de isoformas de gonadotropinas durante la pubertad.

Con base en lo anterior, consideramos relevante investigar los posibles cambios tanto en la actividad inmunológica, la actividad biológica así como la distribución relativa de las diversas isoformas circulantes de FSH durante el proceso puberal en el varón. La demostración de la existencia de cambios en los aspectos antes mencionados a través de los diferentes estadios puberales en condiciones basales así como con diferentes dosis del estímulo con GnRH, permitirá definir y entender con mayor precisión el proceso puberal en el humano.

OBJETIVOS

- ❖ Determinar la actividad inmunológica y la actividad biológica *in vitro* de la FSH tanto en condiciones basales como después de estímulos repetidos con GnRH a dosis submáxima (sensibilidad) y suprafisiológica (reserva), durante los diversos estadios de pubertad del varón. Comparar la relación de la actividad biológica con la actividad inmunológica entre los diferentes estadios puberales del varón, en las condiciones experimentales descritas.
- ❖ Separar e identificar las diversas formas moleculares de la FSH secretada durante los diversos estadios de pubertad del varón, en condiciones basales y después de estímulos repetidos con GnRH.

HIPOTESIS

- ❖ Las actividades inmunológica y biológica *in vitro* de la FSH, en condiciones basales y después de estímulos repetidos con GnRH, presentan cambios en los diferentes estadios de la pubertad en el varón.
- ❖ Las isoformas circulantes de la FSH presentan cambios en su distribución por carga dependiendo del estadio puberal presente en el momento de la obtención de la muestra.

SUJETOS Y METODOS

Se incluyeron 40 varones sanos (Tanner 1, entre 8 y 12 años n=8; Tanner 2, entre 10 y 14 años n=8; Tanner 3, entre 11 y 16 años n=9; Tanner 4, entre 12 y 16 años n=7; Tanner 5, entre 23 y 28 años de edad n=8) clasificados de acuerdo con lo propuesto por Marshall y Tanner (1970), tomándose como parámetro de referencia el volumen gonadal (Tabla 1). Para realizar el estudio, se obtuvo aprobación tanto del comité de estudios en humanos (Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"), así como de los adultos y de los padres de los niños participantes, los cuales fueron seleccionados de la población general.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Comparativo, analítico, longitudinal, experimental.

CRITERIOS DE INCLUSION

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

CRITERIOS DE EXCLUSION

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

CRITERIOS DE ELIMINACION

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

TABLA 1
ESTADIOS DE TANNER

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

OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

A cada uno de los participantes se les colocó un catéter corto (aguja nº 21) en una vena antecubital media hora antes de iniciar el estudio. La recolección de las muestras de sangre siempre se inició a las 0800 hs. Previo a la obtención de cada muestra, se desecharon 0.4 ml correspondientes a la solución salina administrada para mantener la vena permeable.

Inicialmente se tomaron 3 ml de sangre para la cuantificación de LH, FSH, testosterona (T) y estradiol (E_2). A cada sujeto se le extrajo posteriormente 1.5 ml de sangre cada 10 minutos durante 2 horas en forma basal; posterior a ello, se administraron 10 μ g de GnRH sintética (SERONO de México D.F., S.A. de C.V.) en bolo i.v. rápido y se extrajeron 1.5 ml de sangre cada 10 minutos durante 4 horas. Al finalizar esta etapa, se administraron 90 μ g de GnRH i.v. y se continuó con el muestreo antes indicado por 4 horas más. (Figura 5a).

Durante todo el estudio, los participantes permanecieron en posición de decúbito e ingirieron una dieta estándar baja en grasas a las 0900 hs y a las 1400 hs.

MÉTODOS

Cada muestra sanguínea permaneció durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de que se coagulase. Posteriormente, fueron centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 15 minutos. El suero obtenido de cada muestra (aproximadamente 900 μ l) se separó en 3 alícuotas:

1) Una alícuota de 100 μ l utilizada para la cuantificación de FSH por IFMA en cada una de las muestras tomadas a lo largo de las 10 horas de estudio (61 muestras) (Figura 5a).

2) Una alícuota de 300 μ l para constituir los 5 grupos de fracciones para el bioensayo (Figura 5b).

3) Una alícuota de 500 μ l para constituir las 3 pozas para el cromatofoco (Figura 5c).

Estas alícuotas se congelaron a -20°C hasta el día en que se llevaron a cabo los análisis correspondientes.

PROTOCOLO GENERAL DE ESTUDIO

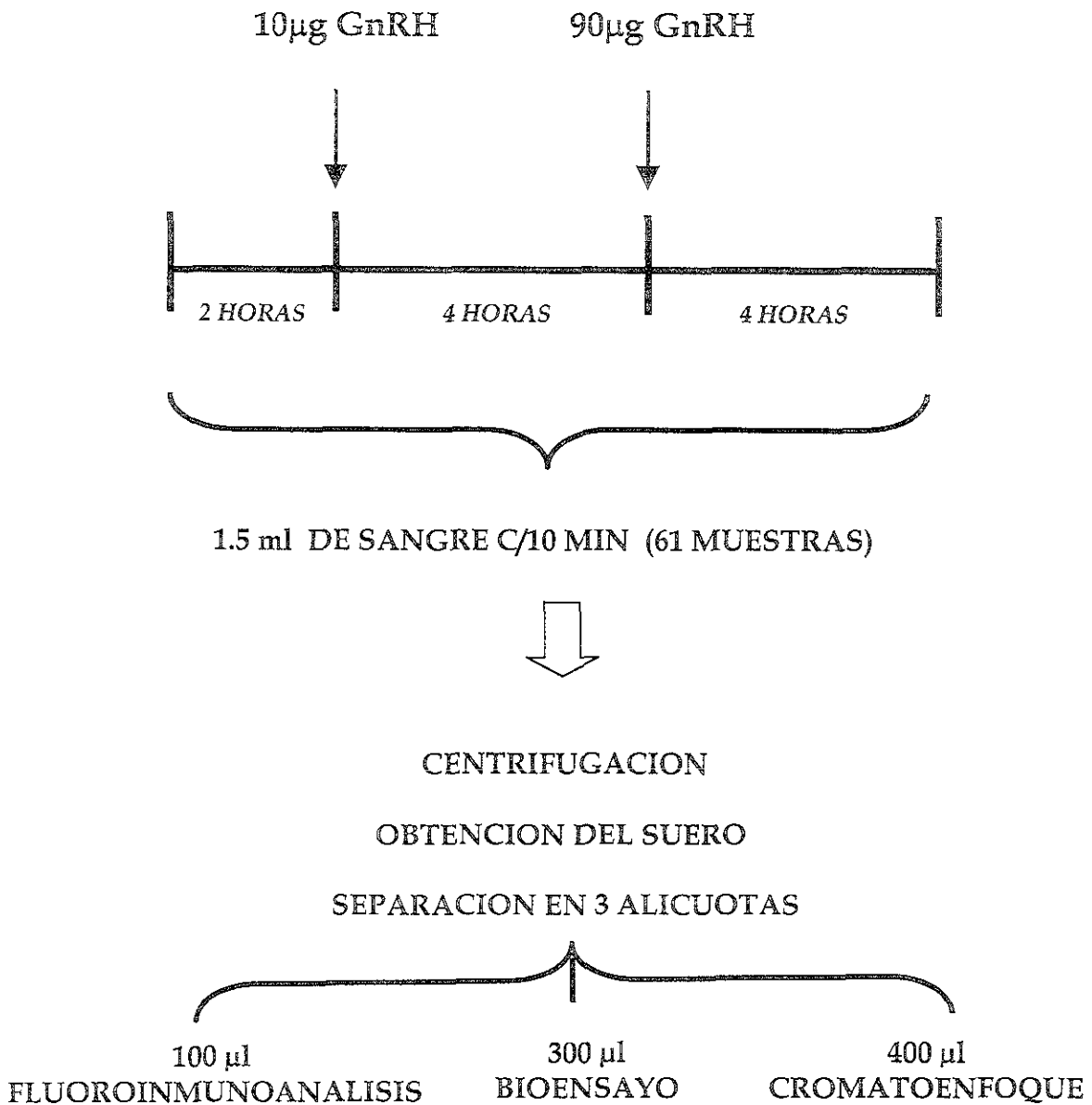


FIGURA 5a: Protocolo experimental y procesamiento de las muestras llevado a cabo en 40 varones normales en diferentes estadios de Tanner.

PROTOCOLO DE ESTUDIO
(ACTIVIDAD BIOLÓGICA *in vitro* DE FSH)

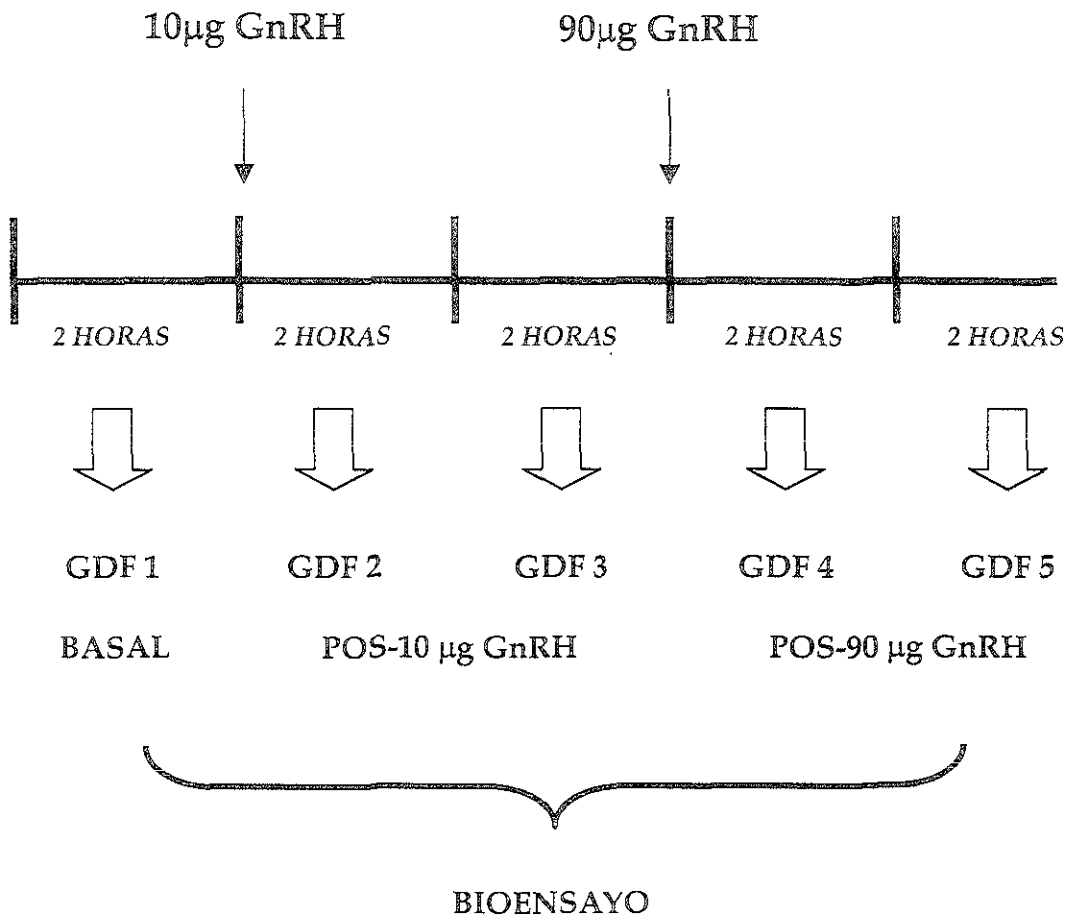


FIGURA 5b: Protocolo experimental y procesamiento de las muestras llevado a cabo en 40 varones normales en diferentes estadios de Tanner.

GDF: Grupo de Fracciones (condiciones experimentales)

**PROTOCOLO DE ESTUDIO
(SEPARACION DE LAS ISOFORMAS DE FSH)**

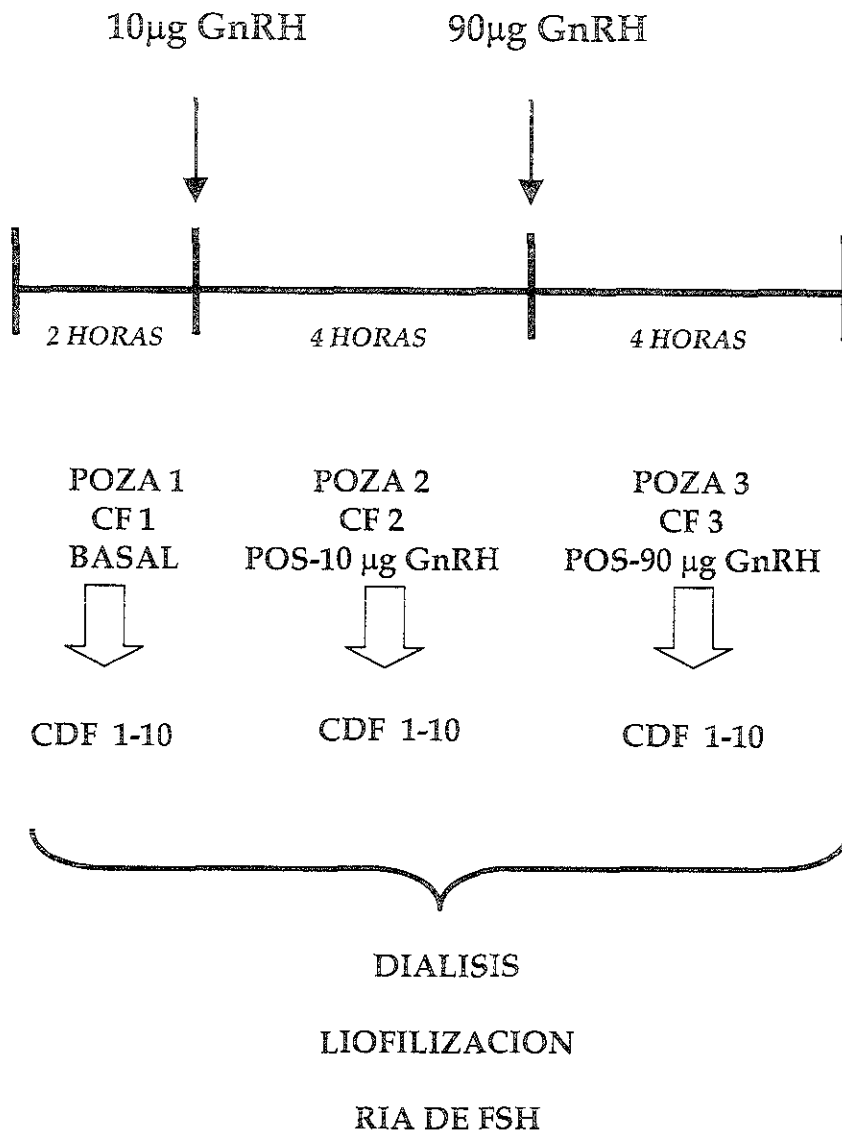


FIGURA 5c: Protocolo experimental y procesamiento de las muestras llevado a cabo en 40 varones normales en diferentes estadios de Tanner.

CF: Cromatofoco

CDF: Concentrado de Fracciones (condiciones experimentales)

Las concentraciones circulantes de FSH, se determinaron mediante IFMA empleando un estuche comercial (DELFA, Wallac Oy, Turku, Finlandia) utilizando como estándar la preparación hipofisiaria LER-907 (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIADDK), Bethesda, MD, EUA). Las concentraciones de LH, fueron determinadas mediante un ensayo inmunométrico (Zambrano *et al*, 1996) empleando reactivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, Londres, Reino Unido). La preparación estándar de LH se encuentra calibrada contra la preparación de referencia internacional LH 80/552 (Olivares *et al*, 2000). Los resultados de FSH y LH se encuentran expresados en UI/L de acuerdo con la 2ª preparación internacional de referencia (2º IRP-HMG). Los coeficientes de variación entre y dentro de los análisis fueron de 9% y 5% para LH y de 5% y 4% para FSH respectivamente. La testosterona y el estradiol fueron cuantificados por RIA, utilizando reactivos proporcionados por la OMS. Los coeficientes de variación inter e intra análisis para testosterona fueron menores al 8.0% y al 7.0 %, mientras que para estradiol fueron menores al 7.5% y al 7.0% respectivamente.

Para determinar la actividad biológica *in vitro* de la FSH se constituyeron 5 grupos de fracciones (GDF) para cada sujeto, correspondientes a las 2 horas basales (GDF 1), primeras 2 horas pos10 µg de GnRH (GDF 2), siguientes 2 horas pos10 µg de GnRH (GDF 3), primeras 2 horas pos90 µg de GnRH (GDF 4) y últimas 2 horas pos90 µg de GnRH (GDF 5) (Figura 5b).

Con el fin de evaluar el patrón de distribución de las diversas isoformas de FSH tanto en condiciones basales como después de los estímulos con 10 y 90 µg de GnRH, se constituyeron tres pozas por separado para cada sujeto, correspondientes a las dos horas basales (poza 1), las cuatro horas pos10 µg de GnRH (poza 2), y las cuatro horas pos90 µg de GnRH (poza 3). Cada una de las pozas fue transferida a bolsas de diálisis con una permeabilidad de 12,000-14,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA), dializándose 24 horas inicialmente con

agua bidestilada desionizada y posteriormente con carbonato de amonio 0.01 M durante 24 horas más. Finalmente, cada una de las pozas fue liofilizada con el fin de ser resuspendida en el menor volumen posible para su separación por el cromatofoco (Figura 5c).

Fluoroímmunoanálisis de FSH (IFMA)

El IFMA de FSH se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Lövgren y cols., (1984) y Hemmilä y cols., (1984) (Figura 6). El IFMA es un ensayo de dos sitios en fase sólida, fluoroinmunométrico con dos anticuerpos monoclonales procedentes de ratón, que están dirigidos a dos determinantes antigénicos diferentes en la molécula de FSH humana. Los estándares, controles y muestras que contienen FSH reaccionan con los anticuerpos monoclonales inmovilizados en la placa, los cuales están dirigidos hacia un epítotope de la subunidad β de FSH. Los anticuerpos marcados con europio, dirigidos hacia un sitio específico de la subunidad α de la FSH, reaccionan con la molécula de FSH enlazada al anticuerpo en fase sólida. La solución intensificadora disocia los iones de europio unidos al anticuerpo en la misma solución, formándose quelados altamente fluorescentes con los componentes de dicha solución. La fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de FSH en la muestra.

Se utilizó como estándar la preparación LER-907 a concentraciones de 0.25 a 100.0 ng de FSH inmunoreactiva disuelta en amortiguador de fosfatos 0.05 M con una concentración de sal de 0.15 M. Los resultados fueron expresados en UI/L en relación a la segunda preparación de referencia internacional de gonadotropinas (2° IRP-HMG). Para evitar las variaciones interanálisis entre las muestras de un mismo sujeto, cada serie se analizó en la misma corrida. Las variaciones interanálisis se determinaron utilizando las mismas muestras control en todas las corridas. Para determinar las variaciones intranálisis se utilizaron controles de calidad comerciales (Immunoassay Tri-level control, Lot. 012, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) colocadas al inicio, mitad y final de cada uno de los ensayos. La finalidad de

FLUOROINMUNOANALISIS DE FSH

ESTANDAR LER-907 Y MUESTRAS PROBLEMA (25 μ l)



SOLUCION AMORTIGUADORA (200 μ l)



INCUBACION 2 MINUTOS (AGITACION RAPIDA)



INCUBACION 3 HORAS (AGITACION LENTA)



LAVADO DE LAS PLACAS



TRAZADOR DILUIDO (200
 μ l)



INCUBACION 30 MINUTOS



LAVADO DE LAS PLACAS



SOLUCION INTENSIFICADORA (200 μ l)



AGITACION LENTA 5 MINUTOS



LECTURA EN EL FLUOROMETRO

FIGURA 6: Técnica de fluoroinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de la FSH.

cuantificar las concentraciones de FSH a lo largo del estudio fue el de estimar, tanto la actividad inmunológica de la hormona como sus niveles máximos, en condiciones basales y bajo el estímulo con 10 μg y 90 μg de GnRH.

Bioensayo *in vitro* de FSH

Previo al análisis de la bioactividad de cada uno de los grupos de fracciones (GDF), cada muestra se inactivó por calentamiento durante 10 minutos a 56°C (Gudermann, 1994). Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de evitar el efecto inhibitor no específico de factores presentes en el suero en la formación de AMPc (Lee *et al*, 1990; Sluss y Schneyer, 1992); ya que se ha demostrado que con este tratamiento no se altera la inmunoreactividad ni la bioactividad de la FSH. Con el fin de validar lo anterior, se utilizaron muestras de suero pertenecientes a 10 sujetos Tanner 5, a estos sueros se les determinó la actividad inmunológica antes y después de la inactivación (calentamiento 10 min a 56°C), obteniéndose aproximadamente el 95% de recuperación en todos los casos.

La actividad biológica *in vitro* de los concentrados, correspondientes a cada uno de los GDFs se determinó mediante un bioensayo que cuantifica el AMPc en células humanas renales fetales HEK-293 transfectadas con el ADNc del receptor recombinante para FSH humana (hFSH), siguiendo la técnica descrita por Zambrano *et al*, 1999 (Figura 7). Estas células, donadas por el Dr. Aaron J.W. Hsueh (de la Universidad de Stanford, CA, EUA), fueron cultivadas en Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Gibco, BRL NY, EUA) complementado con 5% de suero fetal de ternera (SFT) (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co.), 100 mg/ml de geneticina (Gibco, BRL), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Gibco, BRL), ajustando el pH a 7.2-7.3, en cajas de 24 pozos de 16 mm.

BIOENSAYO DE FSH CON CELULAS HEK-293

50,000 CELULAS EN 100 μ l DE MEDIO
A CADA POZO DE CULTIVO



CURVA ESTANDAR (LER-907) DILUIDA CON
SUERO HUMANO LIBRE DE GONADOTROPINAS (100 μ l)



ADICION DE LAS MUESTRAS PROBLEMA (GDF 1-5)
25, 50, 75 Y 100 μ l



AFORAR A 100 μ l CON SUERO LIBRE DE GONADOTROPINAS



INCUBACION (24 HORAS A 37 C)



EXTRACCION DE CELULAS Y MEDIO DE CULTIVO



CALENTADO DEL PRODUCTO (3 MINUTOS A 95 C)



RADIOINMUNOANALISIS DE AMPc

FIGURA 7: Técnica de bioensayo utilizada para la medición de la actividad biológica de la FSH

Se procedió a validar el bioensayo utilizando suero humano libre de gonadotropinas conteniendo <3 UI/L (SHLG), perteneciente a una mujer clínicamente sana bajo tratamiento con anticonceptivos durante por lo menos 3 meses antes del estudio. Se realizaron 4 curvas estándar con LER-907, disueltas cada una con diferentes concentraciones del SHLG (5, 10, 15 y 20%). Al ser expuestas a la línea celular HEK-293, cada una de las curvas, fue capaz de estimular la producción de AMPc de manera dosis-dependiente, por lo tanto se utilizaron 25, 50, 75 y 100 μ l del suero de los pacientes y se aforaron al 20% con el SHLG, de tal forma que todos los pozos del bioensayo contenían 20% de suero humano y 2.5 de suero fetal.

A cada pozo de cultivo correspondiente a la curva estándar se le agregaron 300 μ l de medio DMEM complementado con 2.5% SFT, 0.2 M 3-isobutil-1-metilxantina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO EUA), 50,000 células en 100 μ l de medio y 100 μ l de la dosis estándar (LER-907), la cual fue preparada en SHLG. A cada pozo de las muestras desconocidas se le agregaron por triplicado 300 μ l de medio y 25, 50, 75 y 100 μ l de cada uno de los GDFs de FSH aforados a 100 μ l con SHLG. El medio y las células fueron extraídos después de 24 horas de incubación a 37°C en un incubador húmedo con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. El producto se calentó a 95°C por 3 minutos y posteriormente se almacenó a -20°C, hasta el momento de la cuantificación de su contenido de AMPc total (intra y extracelular) por RIA. La sensibilidad de los análisis fue de 3.125 ng de LER-907.

Radioinmunoanálisis de AMPc

Los especímenes procedentes del cultivo fueron analizados en su contenido de AMPc por RIA, modificándose la metodología descrita por Stuner et al, (1969) (Figura 8). El RIA se llevó a cabo utilizándose como estándar el AMPc (Adenosina 3', 5' monofosfato cíclico) (81c-0220) (Sigma). El anticuerpo empleado fue el AMPc CV-27 del NIADDK a una dilución final de 1:50,000 con acetato de sodio 50mM, albúmina sérica bovina (ASB) al 0.1%, pH 6.1. Como

RADIOINMUNOANALISIS DE AMP_c

DILUCION DEL SOBRENADANTE PROCEDENTE DEL CULTIVO
(1:10 v/v) CON ACETATO DE SODIO 5mM, pH 4.7



ACETILACION DE LA CURVA ESTANDAR Y DILUCIONES
25 µl DE TRIETILAMINA Y ANHIDRIDO ACETICO (2:1 v/v)



CURVA ESTANDAR AMP_c (81c-0220) (100 µl)



MUESTRA PROBLEMA (100 µl)



2-0-MONOSUCCINIL TIROSIL-METIL ESTER DE AMP_c
RADIOMARCADO (100 µl)



ANTICUERPO DE AMP_c CV-27 (100 µl)



INCUBACION (18-24 HORAS A 4°C)



DETENCION DE LA REACCION (3 ml ETANOL FRIO)



CENTRIFUGACION POR 30 MIN (3000 rpm 4°C)



DECANTADO DEL SOBRENADANTE



MEDICION DE LA RADIATIVIDAD DEL PRECIPITADO

FIGURA 8: Técnica de Radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de AMP_c.

trazador se utilizó 2-O-monosuccinil tirosil-metiléster de AMPc (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA), radiomarcado con ^{125}I (Amersham International Limite, Reino Unido) por el método de Cloramina T (Greenwood *et al*, 1963). Para incrementar la sensibilidad del ensayo, todas las muestras se acetilaron junto con los estándares, agregándoles 25 μl de trietilenamina y anhídrido acético en una proporción 2:1 v/v, diluyéndose en acetato de sodio 5mM, pH 4.7. Posteriormente, el ensayo fue incubado a 4°C durante 24 horas, la reacción fue detenida con 3 ml de etanol frío y los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Por último, se decantó el sobrenadante y a partir de los inmunoprecipitados se determinó la radiactividad unida al anticuerpo empleando un contador para radiaciones gamma (Packard Instrument Company, II, EUA).

Cromatofoco de FSH

El CF es un método mediante el cual las proteínas son separadas al interaccionar la carga de su superficie con un soporte de carga inmovilizado. Las isoformas son recuperadas en el eluato cuando el pH del gradiente de elución iguala al punto isoeléctrico (pI) de la proteína. El CF ofrece la ventaja adicional sobre otros métodos de separación en que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo de pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y sometidas nuevamente al procedimiento a través de diferentes gradientes de pH (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). Debido a la naturaleza ácida de las isoformas de la FSH, en este estudio se utilizó un gradiente de pH desde 7.5 hasta 3.0.

El CF de FSH se realizó de acuerdo al método descrito por Ulloa-Aguirre y *cols.*, (1990a,b) (Figura 9). 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 inicio (imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4). Cada una de las series de sueros liofilizados, fueron resuspendidas en el menor volumen posible (2.5-5.0 ml) del

CROMATOENFOQUE DE FSH

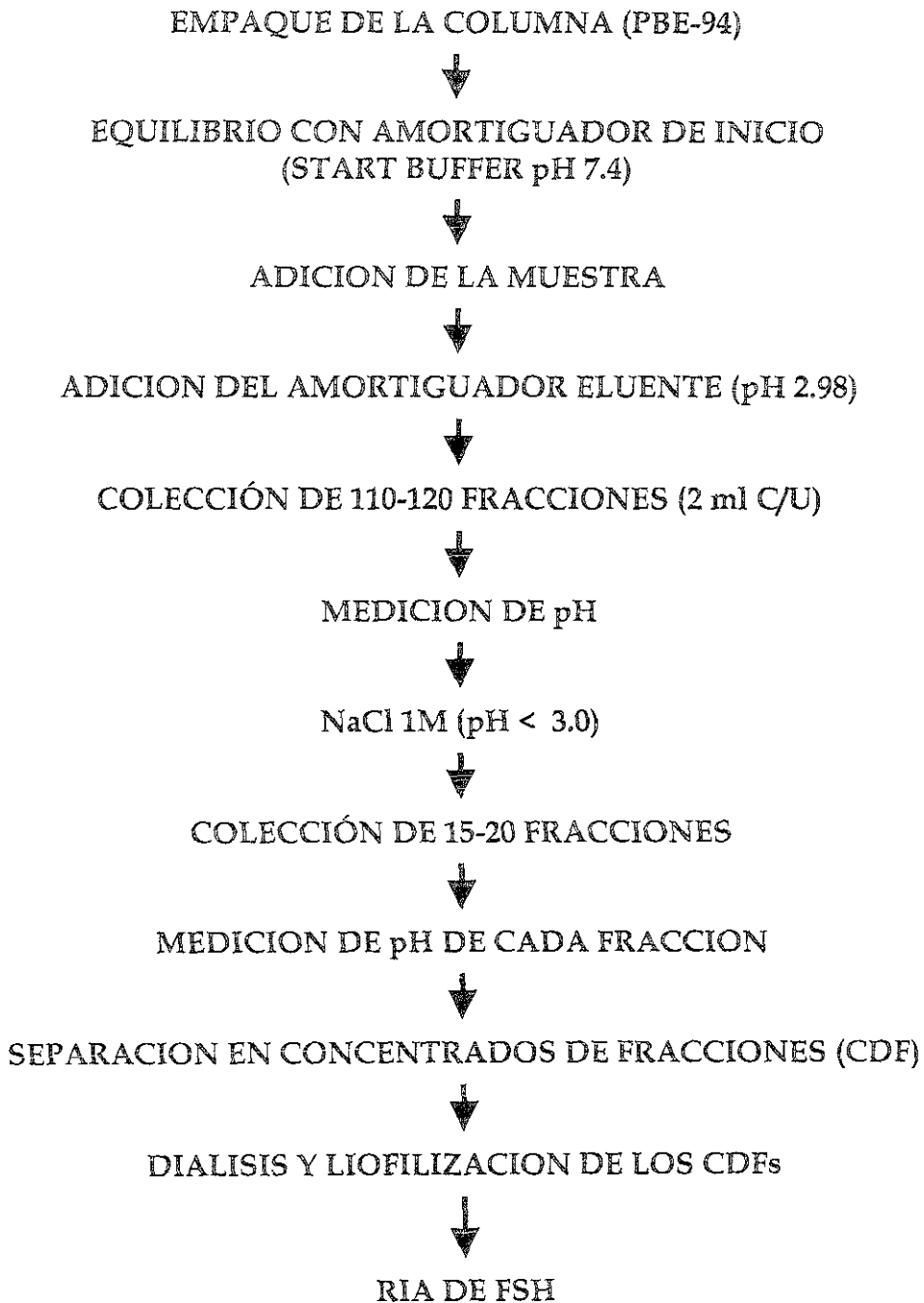


FIGURA 9: Técnica de cromatoenfoque seguida para la separación de las isoformas de las muestras problema.

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 Polybuffer-74 (pH=3.0), con el fin de evitar la exposición de la muestra a valores extremos de pH. Tanto el intercambiador iónico como los amortiguadores empleados en el CF se degasificaron durante 30 minutos antes de su utilización. La muestra fue depositada en la columna y una vez incorporada, se agregó el amortiguador Polybuffer-74 (pH=2.98). Posteriormente, se recolectaron entre 110 y 120 fracciones de 2 ml cada una a 4°C. El amortiguador de corrimiento fue sustituido por una solución de NaCl 1 M al detectar en alguna de las fracciones un valor de pH menor o igual a 3.0. Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de recuperar los componentes unidos en el valor menor de pH (3.0) (pico de sal). Se recolectaron 20 fracciones adicionales y se procedió a medir el pH de cada una de las mismas. Las fracciones se agruparon en intervalos de 0.5 unidades de pH [en total 10 concentrados de fracciones (CDF)]: pH mayor de 7.0 (CDF 1), entre 6.99 y 6.5 (CDF 2), entre 6.49 a 6.0 (CDF 3), entre 5.99 y 5.5 (CDF 4), entre 5.49 y 5.0 (CDF 5), entre 4.99 y 4.5 (CDF 6), entre 4.49 y 4.0 (CDF 7), entre 3.99 y 3.5 (CDF 8), entre 3.49 y 3.0 (CDF 9) y el pico de sal (CDF 10), pH < 3.0. Cada uno de estos concentrados, fue dializado por separado durante 48 horas a 4°C con agua bidestilada y desionizada y posteriormente con una solución de carbonato de amonio 0.01M durante 24 horas adicionales. Finalmente, las muestras fueron liofilizadas y posteriormente resuspendidas en el menor volumen posible de agua bidestilada desionizada previo al análisis de su contenido de FSH por RIA.

RIA de FSH

El RIA para determinar las concentraciones de FSH en cada uno de los CDF, así como en cada GDF que se empleó en el bioensayo *in vitro*, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Ulloa-Aguirre y *cols.*, (1992a) (Figura 10). Los resultados fueron expresados en ng

RIA DE FSH

CURVA ESTANDAR LER-907



MUESTRA PROBLEMA CDFs (100 μ l)



AFORAR A 200 μ l CON PBS-Gel



AGREGAR FSH-I RADIOMARCADA (100 μ l)



AGREGAR ANTI-hFSH-6



INCUBAR DURANTE 18-24 HORAS



ADICION DEL 2° ANTICUERPO



DETENCION DE LA REACCION (AGUA FRIA)



CENTRIFUGACION POR 30 MIN (3000 rpm, 4°C)



DECANTADO DEL SOBRENADANTE



MEDICION DE LA RADIATIVIDAD DEL PRECIPITADO

FIGURA 10: Técnica de radioinmunoanálisis utilizada para la cuantificación de las isoformas de FSH luego de su separación por cromatoenfoque.

LER-907/fracción. Con el fin de evitar variaciones interanálisis entre las muestras provenientes de un mismo sujeto (CDFs) ó serie de columnas (basal, GnRH 10 y 90 µg), todas las muestras de un individuo se incluyeron en una misma corrida.

Se utilizaron reactivos donados por el NIADDK utilizándose como estándar de FSH a la preparación LER-907 a concentraciones de 1.15 ng a 307.6 ng diluída en amortiguador PBS 0.05 M, gelatina 0.1%, pH 7.4 (PBS-Gel). El anticuerpo policlonal fue el anti-hFSH-6, (dilución final 1:200,000) y como trazador se utilizó el estándar hFSH-I-3 radiomarcado con ^{125}I (Amersham International Limited, Reino Unido) por el método de la Cloramina-T (Greenwood *et al*, 1963). El procedimiento del RIA consistió en agregar 100 µl de amortiguador PBS-Gel, 100 µl de la muestra problema o de la dosis de la curva estándar, 100 µl de hFSH- ^{125}I (15,000 cpm), 100 µl de anti-hFSH a una dilución de trabajo 1:50,000 (final 1:200,000) preparado en PBS, EDTA 0.05 M (PBS-EDTA) pH 7.4 y suero normal de conejo (SNC) al 1%. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente por 18 a 24 horas. Posteriormente se añadieron a cada tubo 200 µl del 2º anticuerpo (suero de carnero inmunizado con gamma globulina de conejo) a una dilución de 1:10 con PBS 0.05 M con polietilenglicol al 8% (con la finalidad de precipitar los complejos inmunes) y se incubó por 18 a 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 2 ml de agua bidestilada fría y se centrifugó a 3,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y se determinó la radiactividad en los precipitados empleando un contador para radiaciones gamma. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de recuperación de FSH total sometida al cromatofluore.

ANALISIS ESTADISTICO

Con el fin de analizar las diferencias en las concentraciones hormonales basales, en la secreción total de FSH (áreas bajo la curva), así como en el cociente B/I entre los diferentes estadios puberales, se utilizó ANOVA de una vía seguido por la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para analizar las diferencias entre las 5 condiciones experimentales en un mismo estadio de Tanner se utilizó ANOVA en bloques y comparaciones múltiples con prueba de Tukey.

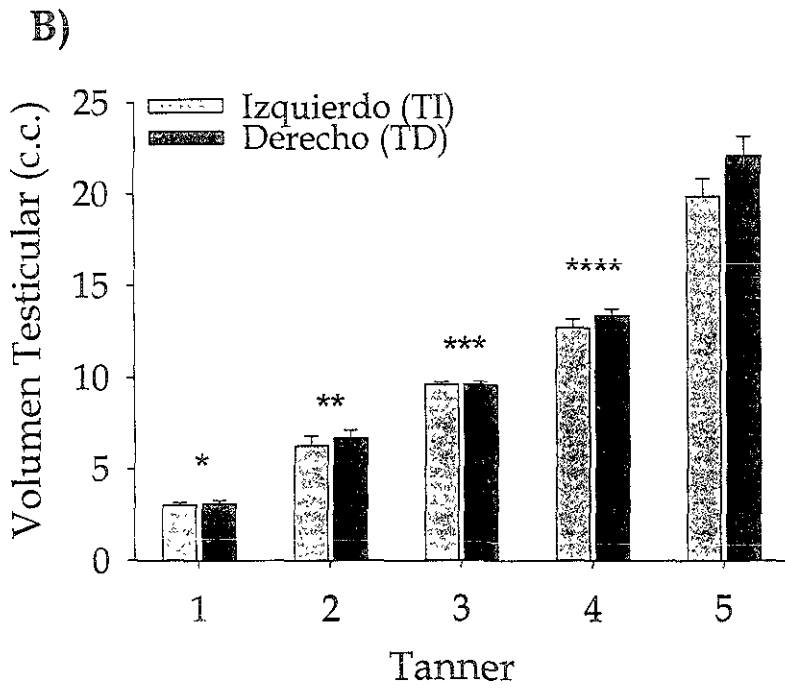
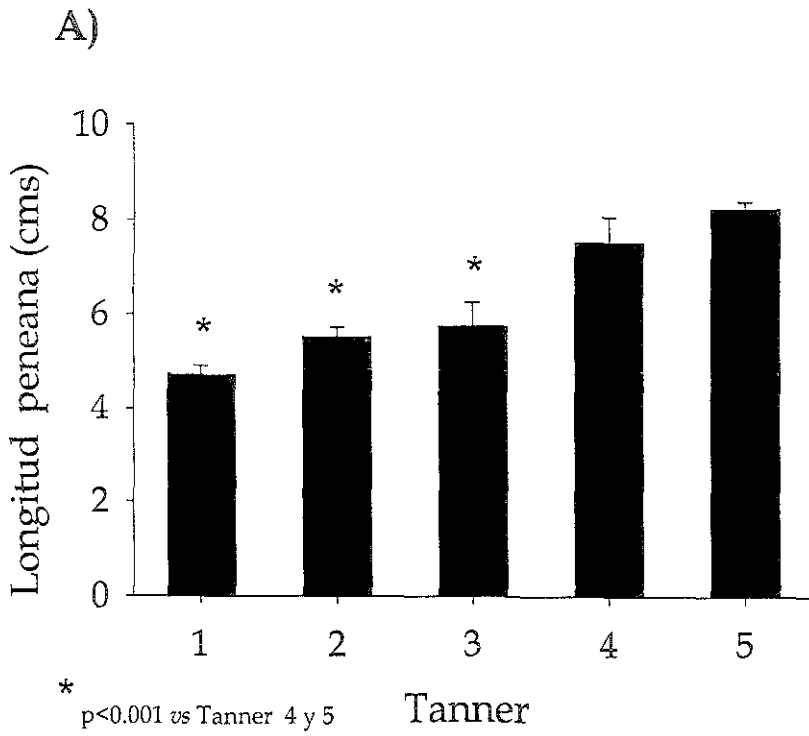
Para evaluar las diferencias existentes en la distribución de las diversas isoformas de FSH entre los 5 grupos de Tanner, tanto en condiciones basales como después de 10 y 90 μg de GnRH, se empleó ANOVA de una vía seguido por la prueba de rangos múltiples de Duncan. Con el fin de evaluar las diferencias de las diversas isoformas dentro de un mismo estadio de Tanner, en condiciones basales y después de los estímulos con GnRH, se empleó la prueba de Wilcoxon.

RESULTADOS

La exploración física de los sujetos estudiados siempre fue realizada por los mismos dos observadores, entre los cuales existió concordancia en todos los casos, en relación con el estadio de Marshall y Tanner al que pertenecía cada individuo. Las características clínicas más relevantes de cada uno de los sujetos incluidos en el estudio, así como las diferencias entre los mismos, se encuentran detalladas en la Figura 11. En ninguno de los casos se observó reacción adversa alguna a la GnRH durante la prueba de estimulación, ni tampoco ningún tipo de complicación durante el desarrollo del estudio. Todos los sujetos presentaron concentraciones basales de LH, FSH, testosterona y estradiol dentro de los límites establecidos como normales. Los valores de cada uno de los diferentes grupos estudiados se encuentran detallados en la Tabla 2.

Actividad Inmunológica

El IFMA se llevo a cabo con el fin de analizar la actividad inmunológica de cada una de las muestras obtenidas en cada sujeto estudiado. Las concentraciones de FSH presentaban fluctuaciones posiblemente correspondientes a la secreción pulsátil y a la vida media de la hormona. Todos los sujetos presentaron respuesta significativa tanto al estímulo con 10 µg de GnRH, como al estímulo con 90 µg de GnRH; en todos los casos se observó una mayor respuesta al estímulo con 90 µg que al estímulo con 10 µg. Los picos máximos de respuesta después de la dosis de 10 µg de GnRH, se encontraron entre los 20 y los 140 minutos (mediana de 40 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 1, 3 y 4 y mediana de 30 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 2 y 5). Posterior al estímulo con 90 µg de GnRH, los picos máximos de respuesta se observaron entre los 20 y los 120 minutos (mediana entre 60 y 70 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 1-3 y mediana entre 30 y 40 minutos para los sujetos en estadio de Tanner 4 y 5) (Figura 12).



* $p < 0.001$ vs TI y TD Tanner 2, 3, 4 y 5

** $p < 0.001$ vs TI y TD Tanner 3, 4 y 5

*** $p < 0.001$ vs TI y TD Tanner 4 y 5

**** $p < 0.001$ vs TI y TD Tanner 5

Figura 11. Características clínicas de los 40 sujetos en los 5 estadios de Tanner
A) Longitud peneana B) Volumen testicular.

TABLA 2
CONCENTRACIONES HORMONALES BASALES

SUJETO	LH (UI/L)	FSH (UI/L)	T (ng/ml)	E2 (pg/ml)
Tanner 1	1.20±0.39 ^a	3.94±0.09 ^a	0.34±0.04 ^a	22.05±2.70 ^a
Tanner 2	2.23±0.40 ^b	7.14±0.14 ^b	1.93±0.42 ^b	26.36±3.15 ^b
Tanner 3	2.28±0.49 ^b	6.25±0.11 ^b	1.91±0.50 ^b	31.81±6.71
Tanner 4	3.71±0.70	10.16±0.82	4.37±0.35	36.17±3.87
Tanner 5	5.65±0.89	8.60±0.06	5.09±0.41	43.45±4.20

Los resultados se expresan como X ± EE

^a p<0.05 vs LH Tanner 2, 3, 4 y 5

^b p<0.05 vs LH Tanner 5

^a p<0.05 vs FSH Tanner 2, 3, 4 y 5

^b p<0.05 vs FSH Tanner 4 y 5

^a p<0.05 vs T Tanner 2, 3, 4 y 5

^b p<0.05 vs T Tanner 4 y 5

^a p<0.05 vs E₂ Tanner 2, 3, 4 y 5

^b p<0.05 vs E₂ Tanner 5

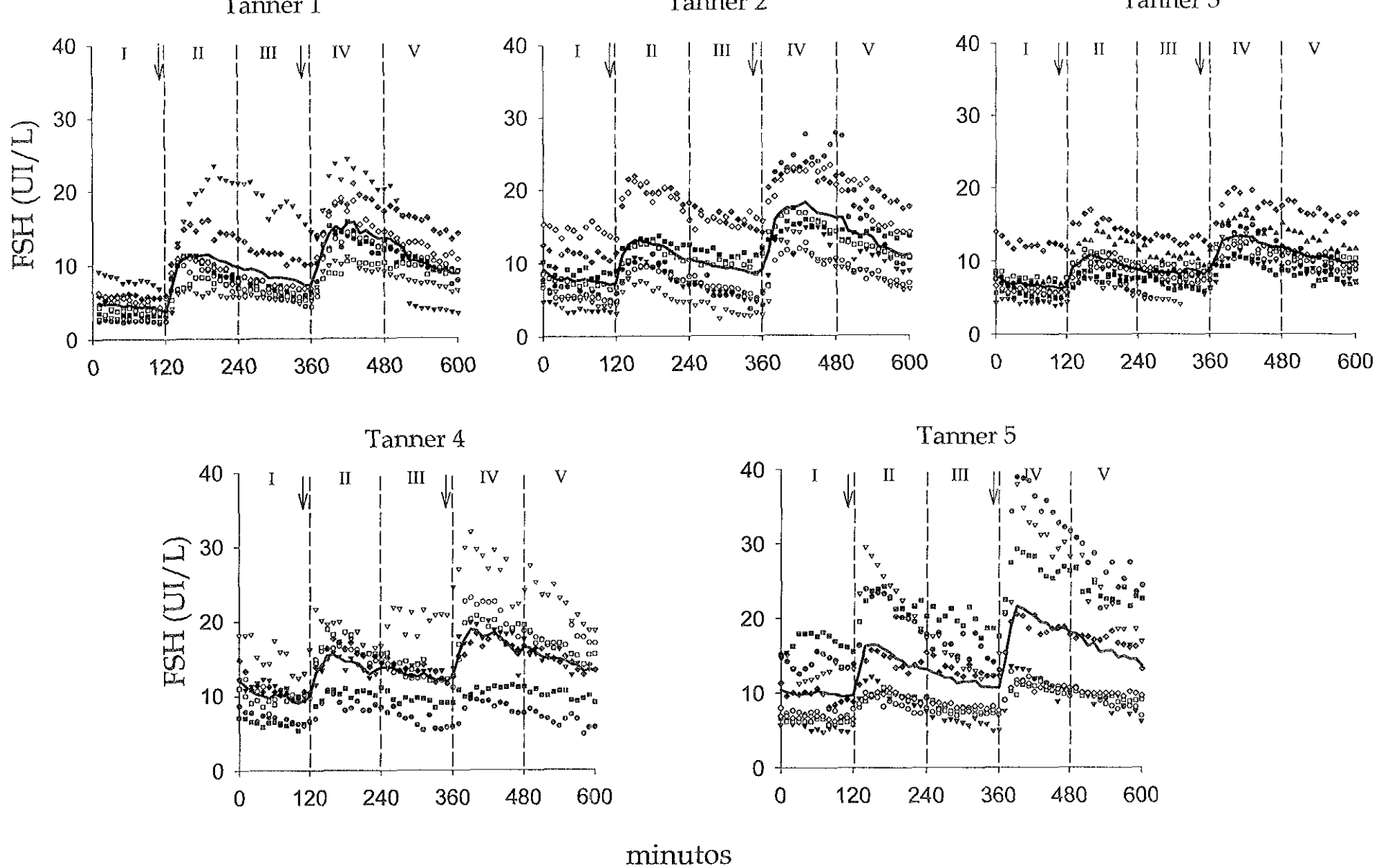


Figura 12. Concentraciones en suero de FSH basales y después de estímulos repetidos con GnRH exógena en cuarenta sujetos en los diferentes estadios de pubertad. Los diferentes símbolos representan a los distintos sujetos, la línea continua en cada gráfica es el promedio de las concentraciones de FSH, la primera flecha indica el momento de la administración de la dosis de 10 µg de GnRH en tanto que la segunda indica la inyección de la dosis de 90µg de GnRH.

Con el fin de evaluar las diferencias existentes en la cantidad de secreción total de FSH entre los 5 grupos estudiados, se procedió a analizar las áreas bajo la curva de la producción de FSH, utilizándose para ello el modelo matemático descrito por Tai (1994). Las 10 horas totales del protocolo experimental fueron divididas en 5 grupos diferentes: área 1 (2 horas basales), área 2 (primeras 2 horas pos10 µg de GnRH), área 3 (siguientes 2 horas pos10 µg de GnRH), área 4 (primeras 2 horas pos90 µg de GnRH), y área 5 (últimas 2 horas pos90 µg de GnRH) (Tabla 3).

Al hacer las comparaciones de cada una de las áreas bajo la curva (1-5) en los diferentes estadios de Tanner, únicamente hubo diferencia en el área bajo la curva 1, correspondiente a los sujetos clasificados como Tanner 1, ésta difirió significativamente del área 1 de los individuos en estadio 2, 3, 4 y 5 de Tanner ($p < 0.01$); en el resto de las áreas 2, 3, 4 y 5 de los otros 4 estadios de Tanner no existió diferencia significativa. Por otro lado, al comparar las cinco áreas bajo la curva de secreción de FSH dentro de cada estadio de Tanner, se observó que el área 1 (basal) en todos los estadios de Tanner fue menor que las áreas 2, 4 y 5 ($p < 0.05$). Asimismo, el área 4 de todos los estadios de Tanner fue mayor que las áreas 2 y 3 ($p < 0.05$). Por último, el área 5 en todos los estadios de Tanner fue significativamente menor que el área 4 ($p < 0.05$).

TABLA 3
 ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE FSH
 AREAS BAJO LA CURVA
 (X±EE)

ESTADIO DE TANNER	AREA BAJO LA CURVA (UI/L/2 HRS)				
	1	2	3	4	5
1	543.10±74.85 ^{a,*}	1166.06±162.05 [#]	917.17±167.95 [#]	1554.53±156.66 ^{&}	1136.98±104.54
2	928.11±151.55 [*]	1329.62±195.28 [#]	1019.18±184.57 [#]	1846.26±197.00 ^{&}	1411.15±152.58
3	817.97±91.43 [*]	1089.70±96.07 [#]	936.33±79.03 [#]	1392.21±96.14 ^{&}	1156.91±98.81
4	1210.81±136.69 [*]	1570.41±144.90 [#]	1402.45±180.32 [#]	1916.91±261.21 ^{&}	1597.86±210.10
5	1188.24±180.47 [*]	1628.58±250.80 [#]	1262.81±188.21 [#]	2130.23±387.57 ^{&}	1710.08±284.21

^a p<0.01 vs Tanner 2, 3, 4 y 5 en la misma área

^{*} p<0.05 vs área 2, 4 y 5 en el mismo estadio de Tanner

[#] p<0.05 vs área 4 en el mismo estadio de Tanner

[&] p<0.05 vs área 5 en el mismo estadio de Tanner

Actividad Biológica

La actividad biológica relativa *in vitro*, utilizando el estándar hipofisiario LER-907, fue calculada considerando cada dosis (25, 50, 75 y 100 μ l) analizada, y se expresó como el cociente de la actividad biológica/inmunológica (B/I). Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPc en forma dosis dependiente de manera significativa, en la línea celular HEK-293 (Figuras 13-17, Tabla 4). Al hacer las comparaciones del cociente B/I entre los diferentes estadios de Tanner, se observó que el cociente basal B/I de FSH fue menor en los sujetos Tanner 1 al compararlo con el de los sujetos Tanner 2, 3, 4 y 5 ($p < 0.05$). Las mismas diferencias se encontraron en el GDF 2 y el GDF 5. El cociente B/I de los GDFs 1 y 5 pertenecientes a los sujetos Tanner 2, difirió significativamente de aquellos encontrados en los Tanner 3 y 4 (Tabla 4. Figura 18).

Al comparar los resultados obtenidos de cada GDF entre un mismo estadio de Tanner, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los sujetos clasificados como Tanner 1; el cociente B/I del GDF 4 fue mayor que el GDF 1 ($p < 0.05$), y que el GDF 5 ($p < 0.05$). En el resto de los estadios de Tanner no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tanner 1

- LER-907
- GDF 1
- ▼ GDF 2
- ▽ GDF 3
- GDF 4
- GDF 5

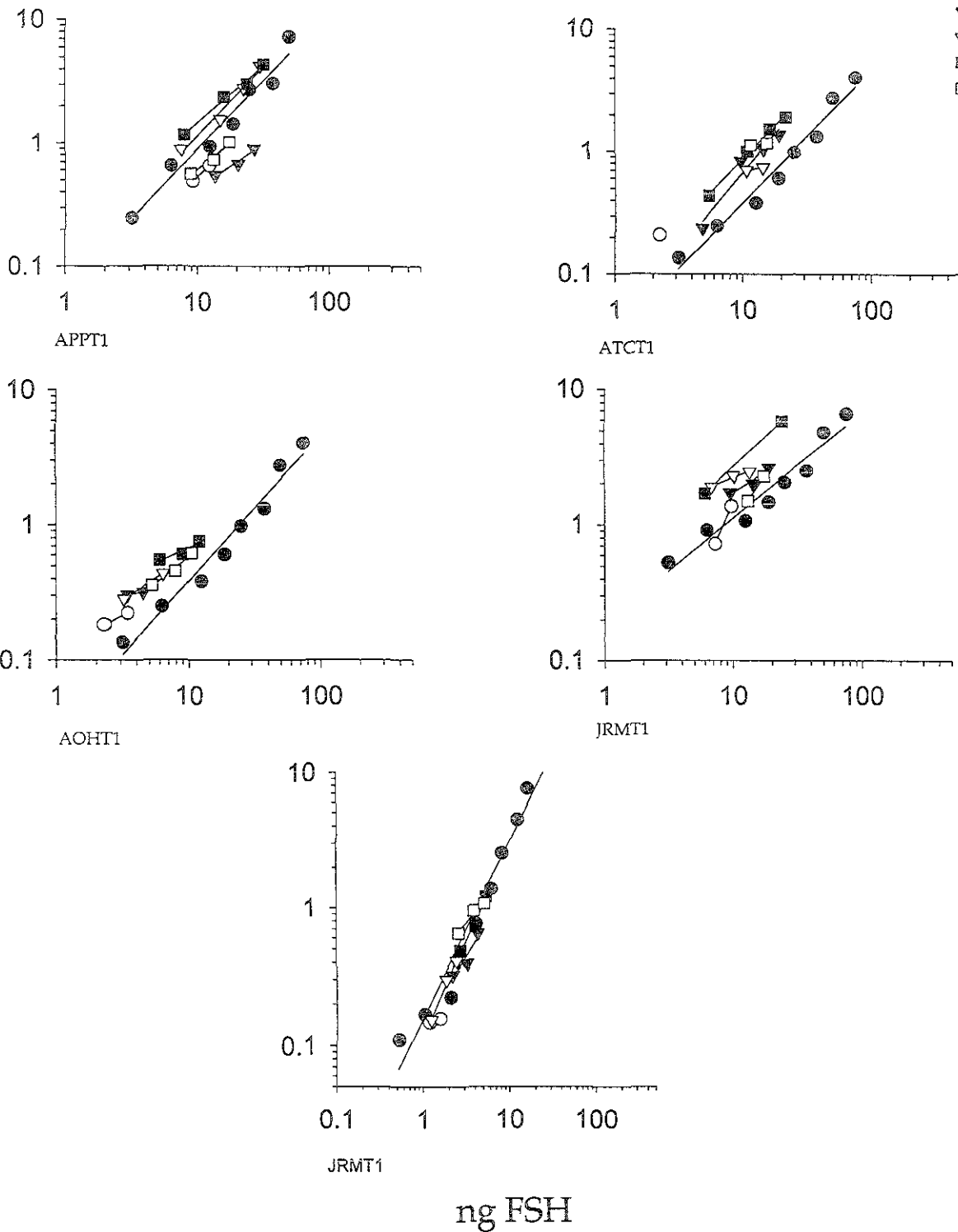


Figura 13. Cinco gráficas representativas de las dosis-respuesta de los GDFs pertenecientes a 5 sujetos en estadio de Tanner 1. Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Tanner 2

- LER-907
- GDF 1
- ▼ GDF 2
- ▽ GDF 3
- GDF 4
- GDF 5

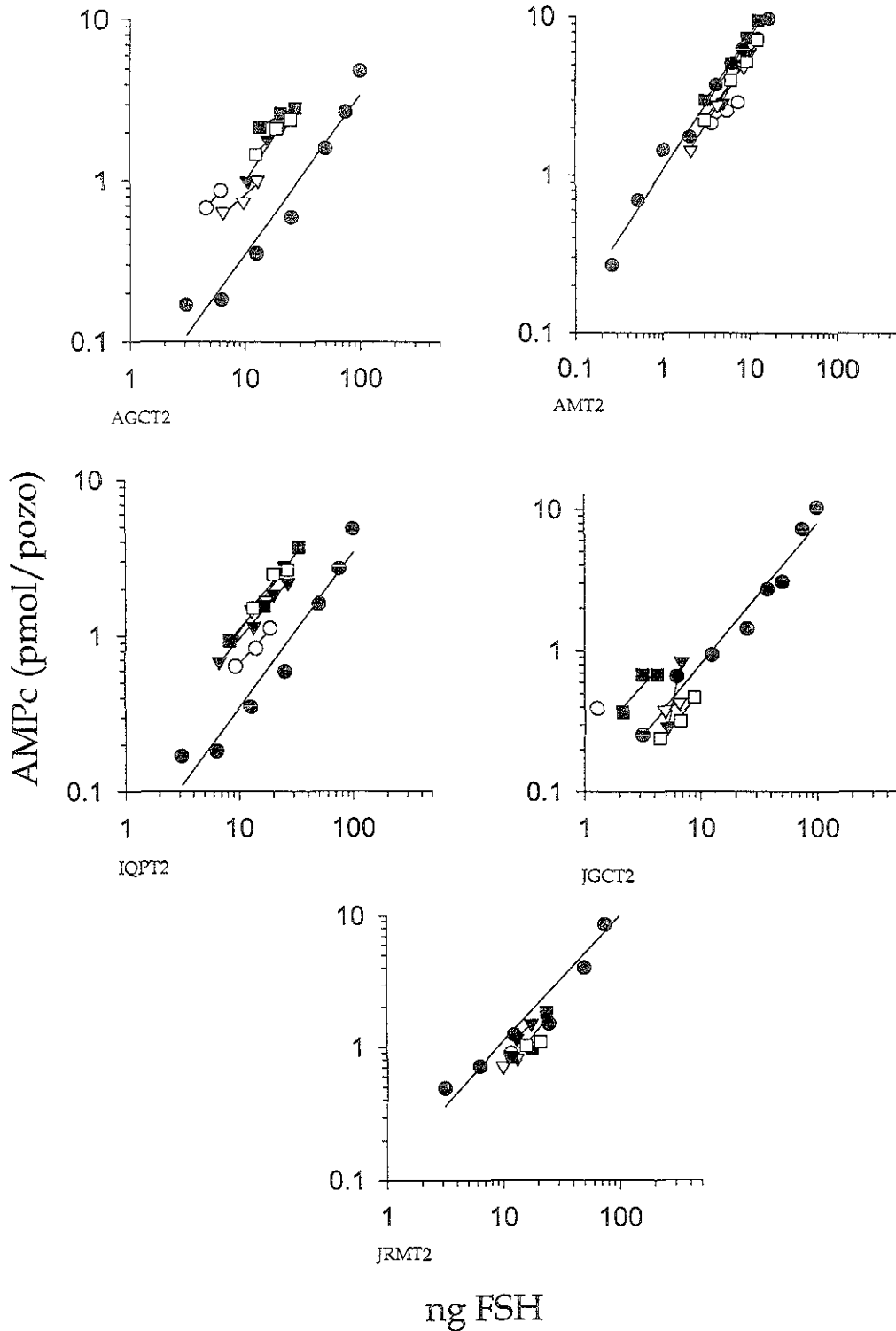


Figura 14. Cinco gráficas representativas de las dosis-respuesta de los GDFs pertenecientes a 5 sujetos en estadio de Tanner 2. Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPC de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Tanner 3

- LER-907
- GDF 1
- ▼ GDF 2
- ▽ GDF 3
- GDF 4
- GDF 5

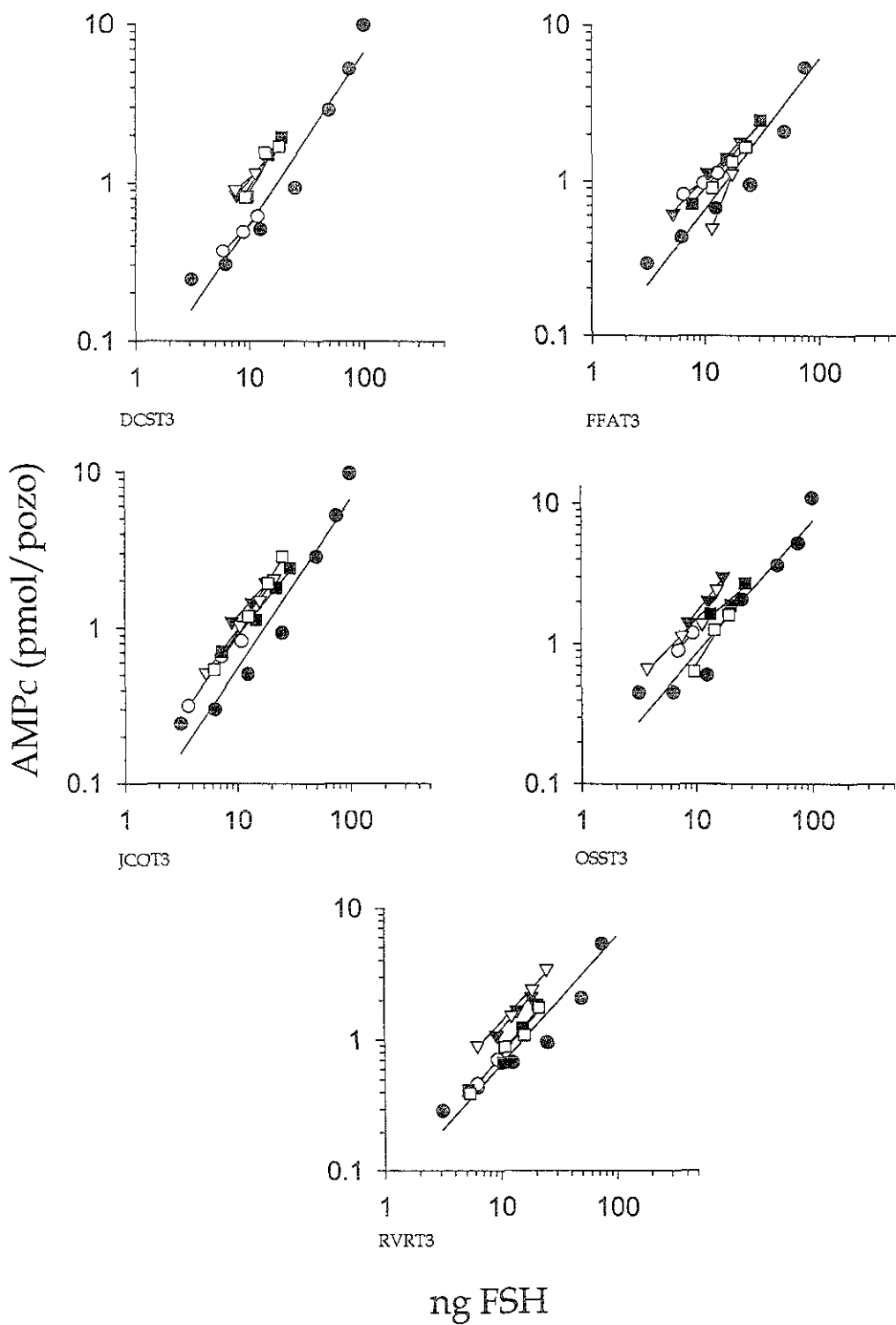


Figura 15. Cinco gráficas representativas de las dosis-respuesta de los GDFs pertenecientes a 5 sujetos en estadio de Tanner 3. Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Tanner 4

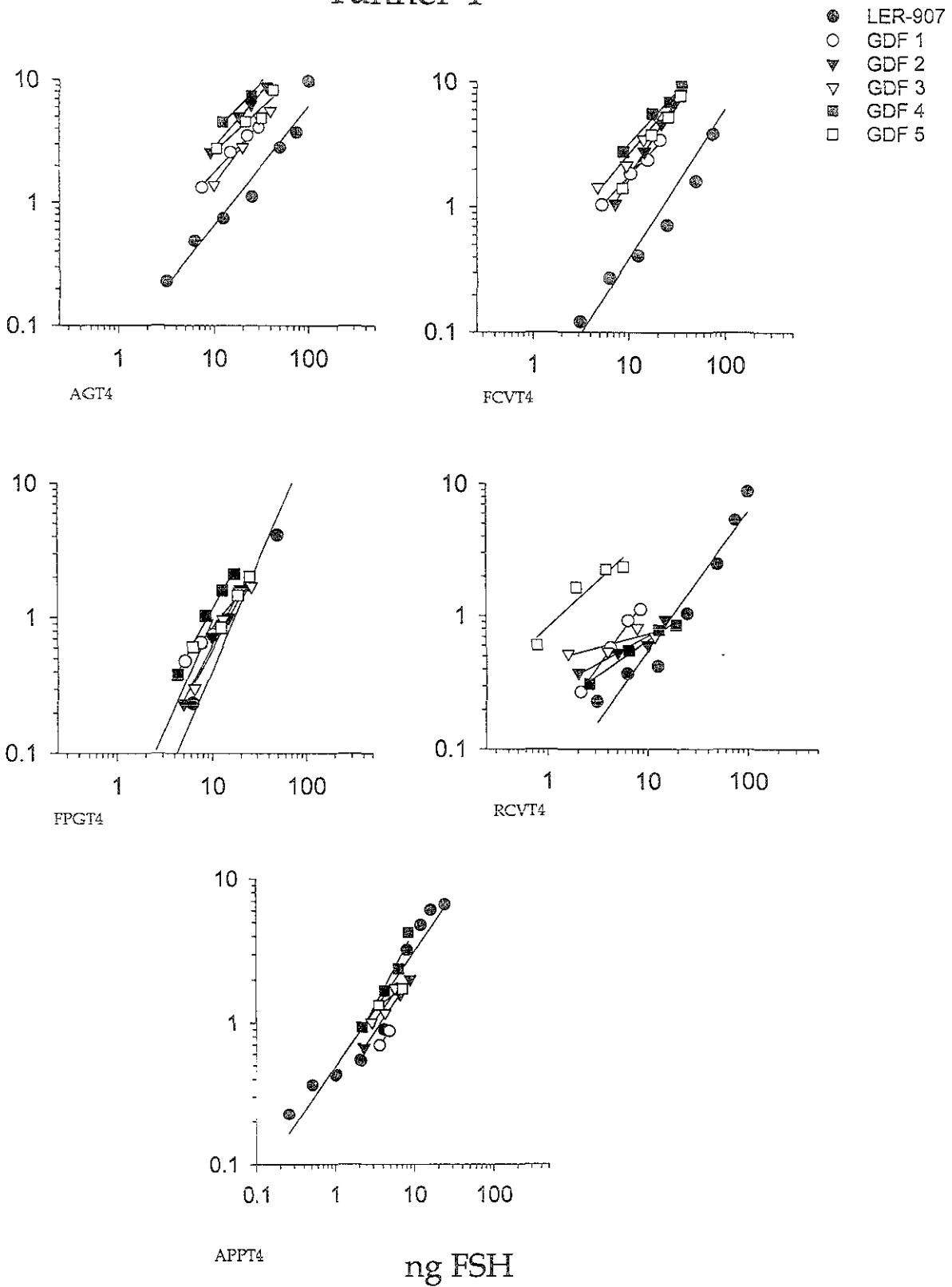


Figura 16. Cinco gráficas representativas de las dosis-respuesta de los GDFs pertenecientes a 5 sujetos en estadio de Tanner 4. Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Tanner 5

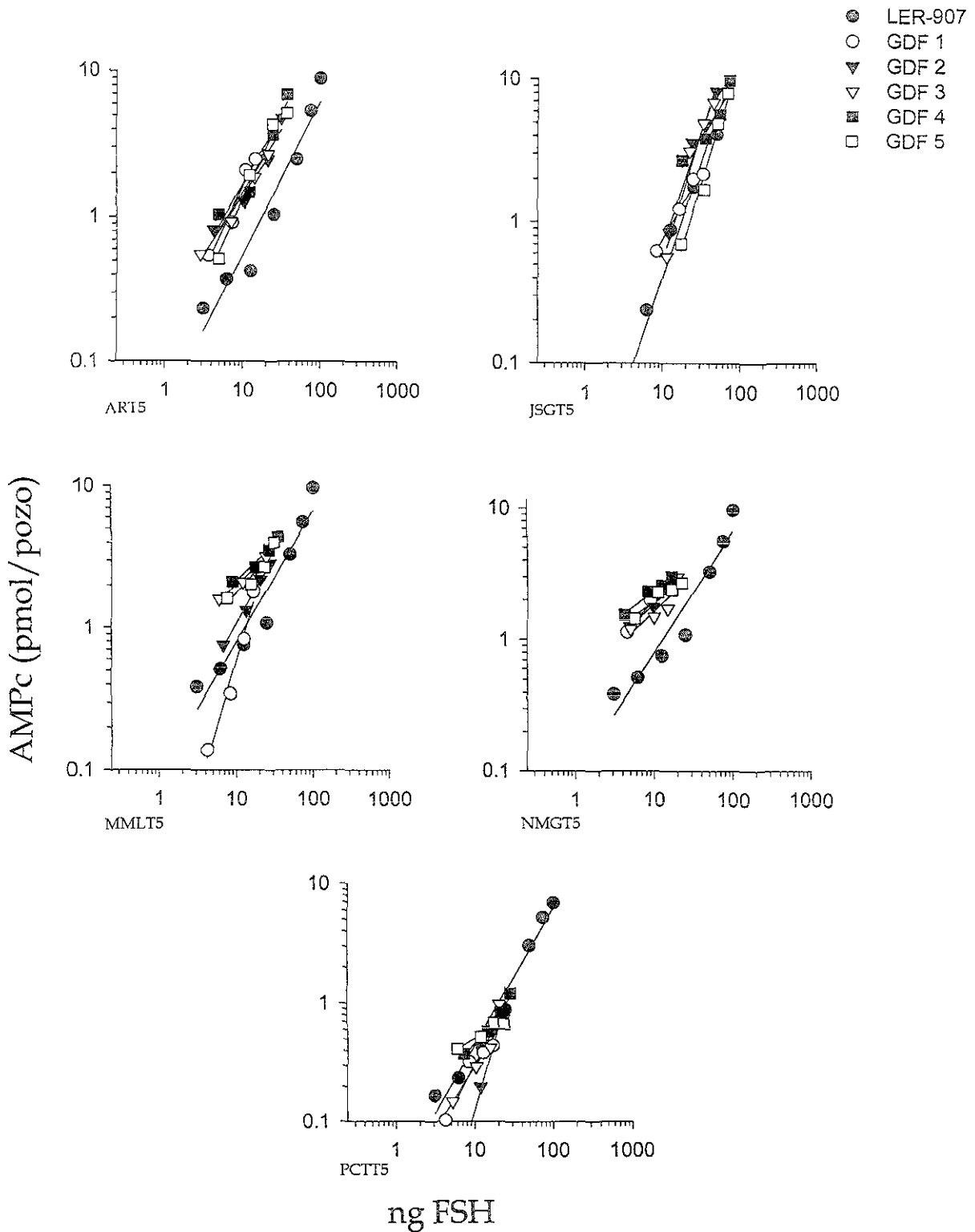


Figura 17. Cinco gráficas representativas de las dosis-respuesta de los GDFs pertenecientes a 5 sujetos en estadio de Tanner 5. Cada uno de los GDFs fue capaz de inducir la producción de AMPc de manera dosis dependiente en la línea celular HEK-293.

Cociente B/I

ESTADIO DE TANNER	GRUPO DE FRACCIONES (GDF)				
	1	2	3	4	5
1 (n=8)	1.33±0.30 ^{*a}	1.49±0.34 [*]	1.76±0.43	2.12±0.32 ^b	1.35±0.29 [*]
2 (n=8)	1.62±0.34 ^{&}	1.73±0.44	2.27±0.85	2.76±0.94	1.66±0.45 ^{&}
3 (n=9)	2.28±0.20	3.01±0.11	3.11±0.37	2.82±0.42	2.73±0.35
4 (n=7)	2.96±0.38	3.05±0.41	3.16±0.49	3.56±0.60	3.06±0.49
5 (n=8)	2.77±0.63	2.61±0.51	2.72±0.56	2.79±0.51	2.65±0.46

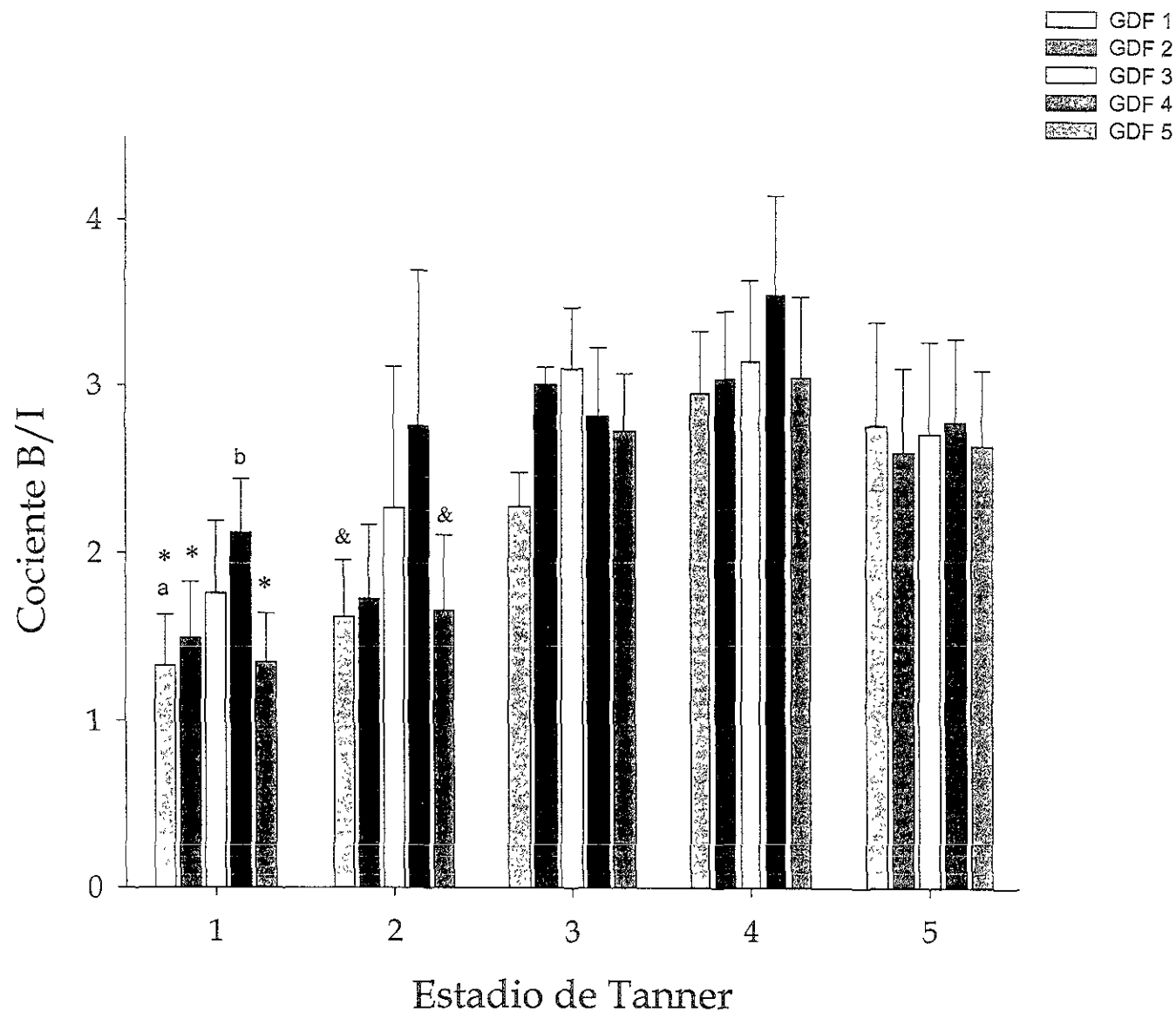
^{*}p<0.05 vs Tanner 2, 3, 4 y 5 en el mismo GDF

[&]p=0.05 vs Tanner 3 y 4 en el mismo GDF

^ap<0.05 vs GDF 4 en el mismo estadio de Tanner

^bp=0.017 vs GDF 5 en el mismo estadio de Tanner

TABLA 4. Cociente Bioensayo/Inmunoensayo de los GDFs de los 40 sujetos en los 5 estadios de Tanner .



* $p < 0.05$ vs Tanner 2, 3, 4 y 5 en el mismo GDF
 & $p < 0.05$ vs Tanner 3 y 4 en el mismo GDF

^a $p < 0.05$ vs GDF 4 en el mismo estadio de Tanner

^b $p = 0.017$ vs GDF 5 en el mismo estadio de Tanner

Figura 18. Cociente bioensayo/inmunoensayo (B/I) de FSH de los diferentes grupos de fracciones (GDFs) de suero de los 40 sujetos en los 5 estadios de Tanner. Cada una de las barras representa a la media \pm el error estándar del cociente B/I, en la línea celular HEK-293.

Isoformas de FSH

Con el fin de cuantificar a las isoformas producidas en los diferentes estadios de Tanner antes y después de los estímulos con GnRH, se procedió a agruparlas en intervalos de pH de 0.5 [en total 10 concentrados de fracciones (CDF)]. La mayoría de las concentraciones de FSH de los diferentes CDFs (1-10) se detectaron en una región lineal recta de la curva estándar del RIA de FSH (Figura 19). El análisis de las muestras de suero por CF demostró que en todos los individuos estudiados, bajo las 3 condiciones experimentales (basal, pos10 μg y pos90 μg de GnRH), se presentaron múltiples isoformas de FSH inmunorreactiva, las cuales eluyeron en un intervalo de pH entre 7.5 y 3.0, además de aquellas fracciones recuperadas después de agregar 1.0 M/L NaCl a las columnas de CF (pico de sal). En todos los sujetos estudiados, así como en las diversas fases del estudio, las isoformas de la gonadotropina fueron recuperadas predominantemente en aquellos valores de pH que se encontraron por debajo de 4.5, incluyéndose el pico de sal. Más aún, el mayor porcentaje de isoformas recuperadas en los diferentes grupos de pacientes y en las 3 condiciones experimentales, se encontró agrupado en el intervalo de pH de los GDF 7 y 8 que corresponde a un intervalo de pH entre 4.49 y 3.5 (Figura 20).

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

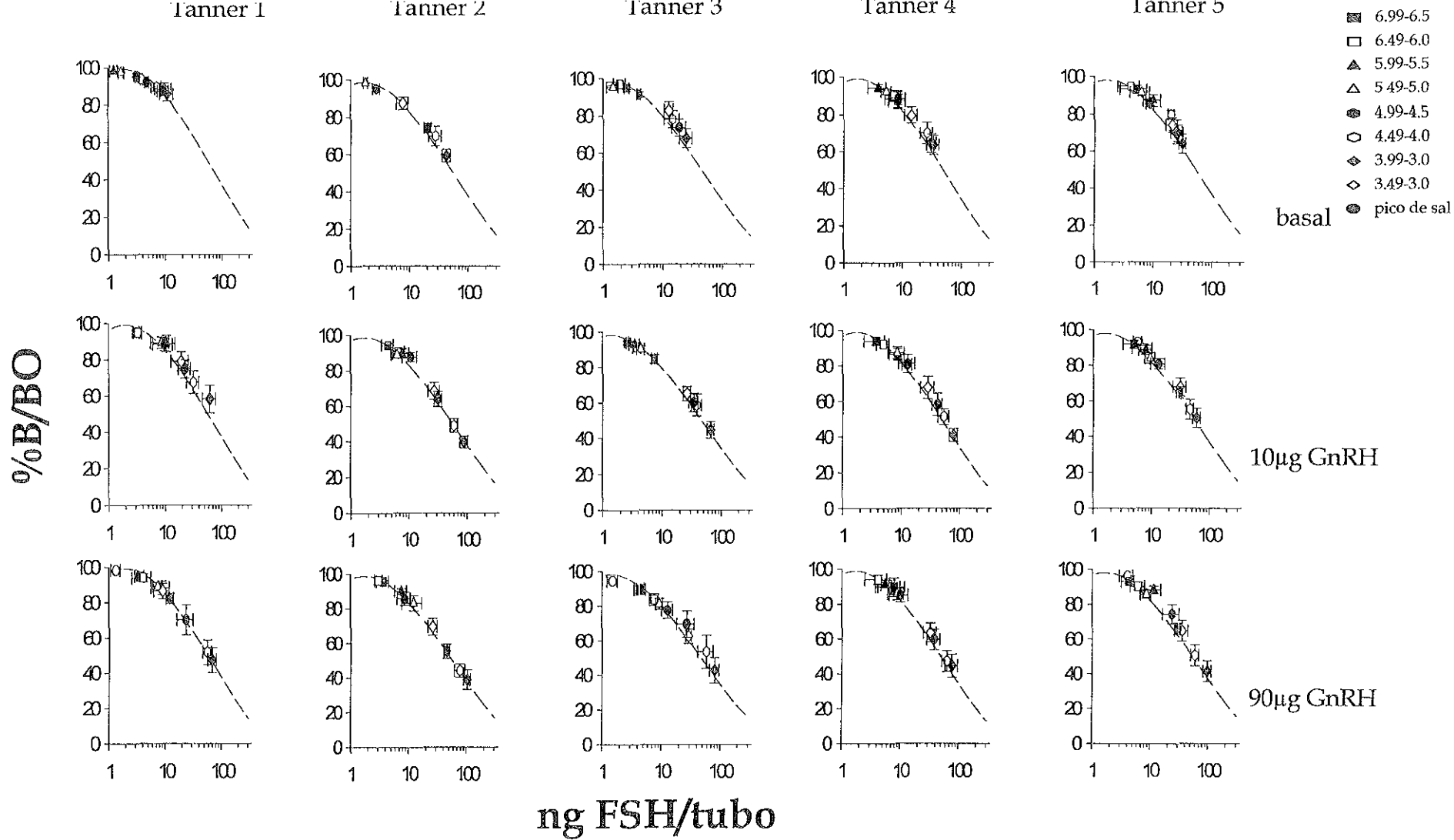


FIGURA 19. Curvas estándar del sistema RIA de FSH (línea continua) y las posiciones de las muestras desconocidas (símbolos). Cada símbolo representa el promedio \pm la desviación estándar de la dosis y el porcentaje de unión observada para cada conjunto de concentrado de fracciones (n=10) basales y estimulados con GnRH.

ISOFORMAS DE FSH EN LOS CINCO ESTADIOS DE TANNER

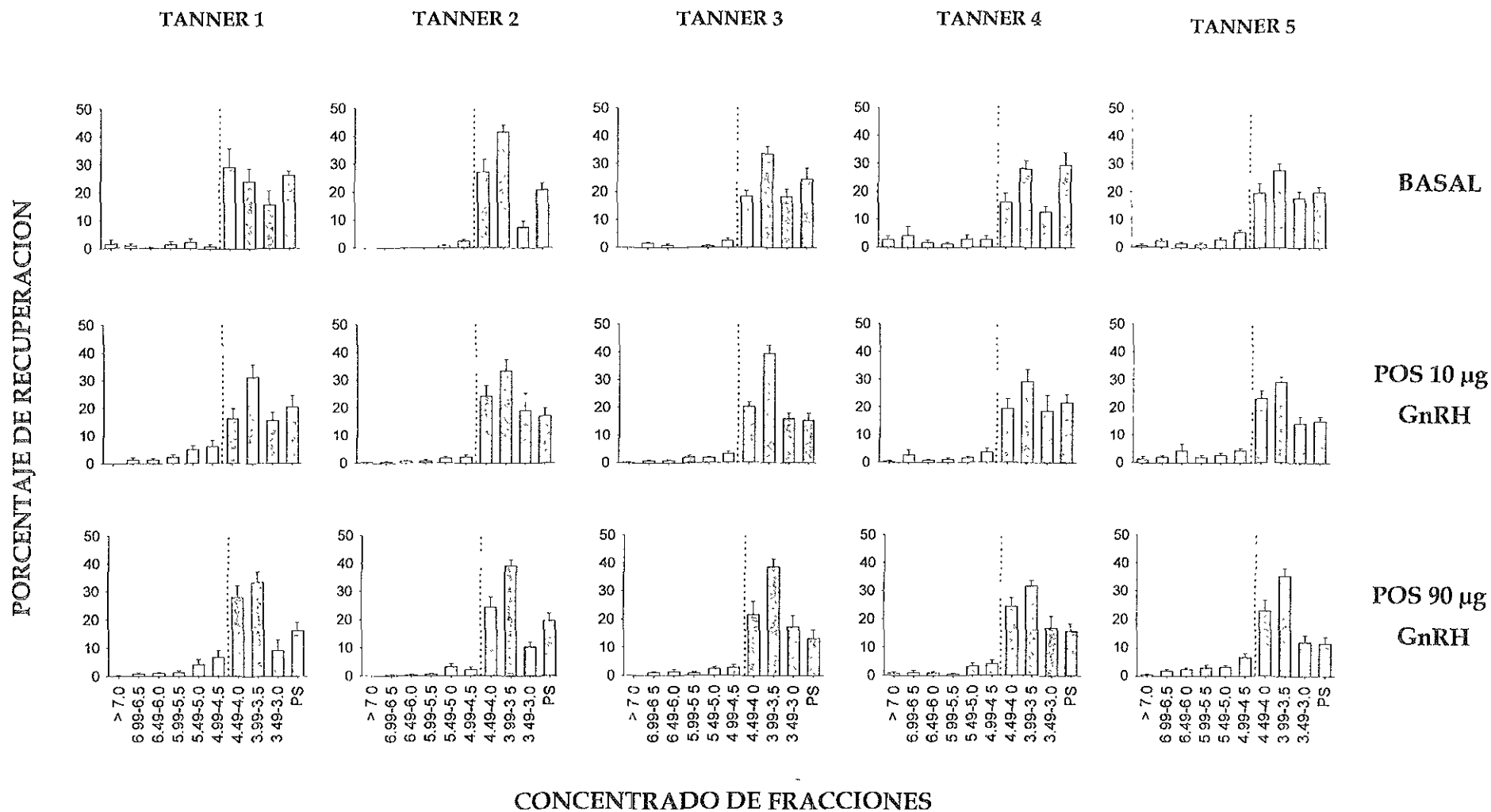


FIGURA 20. Patrón de distribución por carga de la FSH circulante después de su separación por cromatofoco en los diferentes estadios de Tanner. Cada una de las barras representa a la media \pm el error estándar de los porcentajes de FSH recuperada después del cromatofoco de cada una de las muestras basales (panel superior) y estimuladas con 10 (panel intermedio) y 90 µg de GnRH (panel inferior). La línea vertical discontinua indica un valor de pH de elución de 4.5.

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 o iguales a 4.5.

Las comparaciones entre los diferentes grupos de sujetos estudiados demostraron que en condiciones basales, los sujetos que se encontraban en estadio 4 y 5 de Tanner presentaban una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas ($\text{pH} \geq 4.5$) que las observadas en aquellos sujetos en estadios 1, 2 y 3 de Tanner. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al comparar Tanner 1 vs 4 y 5; 2 vs 4 y 5 y 3 vs 4 y 5 (Tabla 5, Figuras 20-21). Al llevar a cabo la comparación entre grupos después del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH se observó que los sujetos en estadio de Tanner 1 y 5 presentan una mayor abundancia de las isoformas menos ácidas que aquellos individuos Tanner 2, 3 y 4. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) al comparar Tanner 1 vs 2, 3 y 4 y Tanner 5 vs 2, 3 y 4. La distribución de las isoformas entre los diversos grupos estudiados después del estímulo con $90 \mu\text{g}$ de GnRH demostró que los sujetos en Tanner 5 tienen una mayor abundancia de las isoformas menos ácidas que los sujetos Tanner 2 y 3 ($p < 0.05$) (Tabla 5, Figuras 20-21). Al comparar las respuestas a ambos estímulos con GnRH dentro de un mismo estadio de Tanner, se detectó un incremento en el porcentaje de las formas menos ácidas en los sujetos Tanner 1, 2 y 3 con respecto a los basales ($p < 0.05$) (Tabla 5, Figuras 20-21). En los sujetos en estadio 4 y 5 no se observaron diferencias significativas; asimismo, no se presentaron diferencias entre los estímulos con $10 \mu\text{g}$ y $90 \mu\text{g}$ de GnRH en ninguno de los estadios de Tanner.

Los cambios en la distribución de las isoformas de FSH fueron expresados como el cociente de la proporción relativa de isoformas de FSH con valores de pH menores a 4.5 entre aquellas con valores iguales o por arriba de dicho pH (Figura 22). Las comparaciones entre los diferentes estadios de Tanner, tanto en condiciones basales, como después del estímulo con $10 \mu\text{g}$ de GnRH, demostraron un incremento de este índice en los sujetos en estadio 2 en relación

Distribución de las isoformas de FSH recuperadas en valores de pH mayores y menores de 4.5 en los diferentes estadios de Tanner

	pH > 4.5 (%) X ± EE	pH < 4.5 (%) X ± EE
Tanner 1 n=8	basal 7.42 ± 1.39 ^{a,*} 10 µg 16.09 ± 3.46 ^b 90 µg 14.09 ± 3.92	92.59 ± 1.39 83.82 ± 3.46 85.87 ± 3.92
Tanner 2 n=8	basal 3.27 ± 0.79 ^{a,*} 10 µg 6.13 ± 2.12 90 µg 6.65 ± 1.84 ^c	96.71 ± 0.79 93.83 ± 2.12 93.32 ± 1.84
Tanner 3 n=9	basal 5.24 ± 1.38 ^{a,*} 10 µg 8.90 ± 1.33 90 µg 8.93 ± 2.81 ^c	94.73 ± 1.38 91.21 ± 1.33 91.05 ± 2.81
Tanner 4 n=7	basal 13.04 ± 4.08 10 µg 10.76 ± 2.48 90 µg 11.19 ± 3.80	86.93 ± 4.08 89.21 ± 2.48 88.81 ± 3.80
Tanner 5 n=8	basal 15.58 ± 2.67 10 µg 18.36 ± 3.51 ^b 90 µg 15.80 ± 2.75	84.37 ± 2.67 81.53 ± 3.51 82.34 ± 2.75

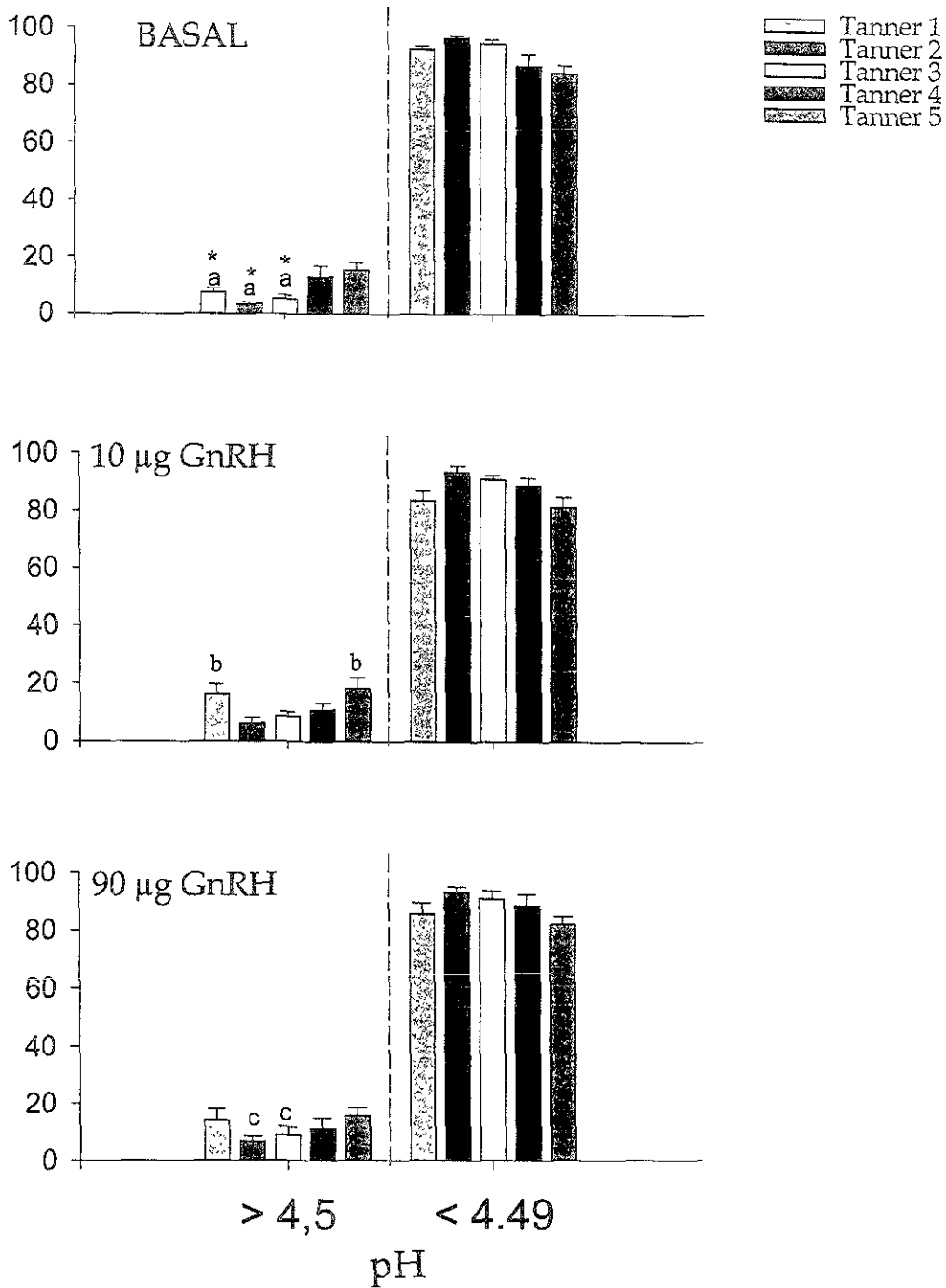
^a p < 0.05 vs basal Tanner 4 y 5

^b p < 0.05 vs pos10µg GnRH Tanner 2, 3 y 4

^c p < 0.05 vs pos90 µg GnRH Tanner 5

* p < 0.05 vs pos10 y pos90 µg GnRH en el mismo estadio de Tanner

% RECUPERACION



a $p < 0.05$ vs basal Tanner 4 y 5

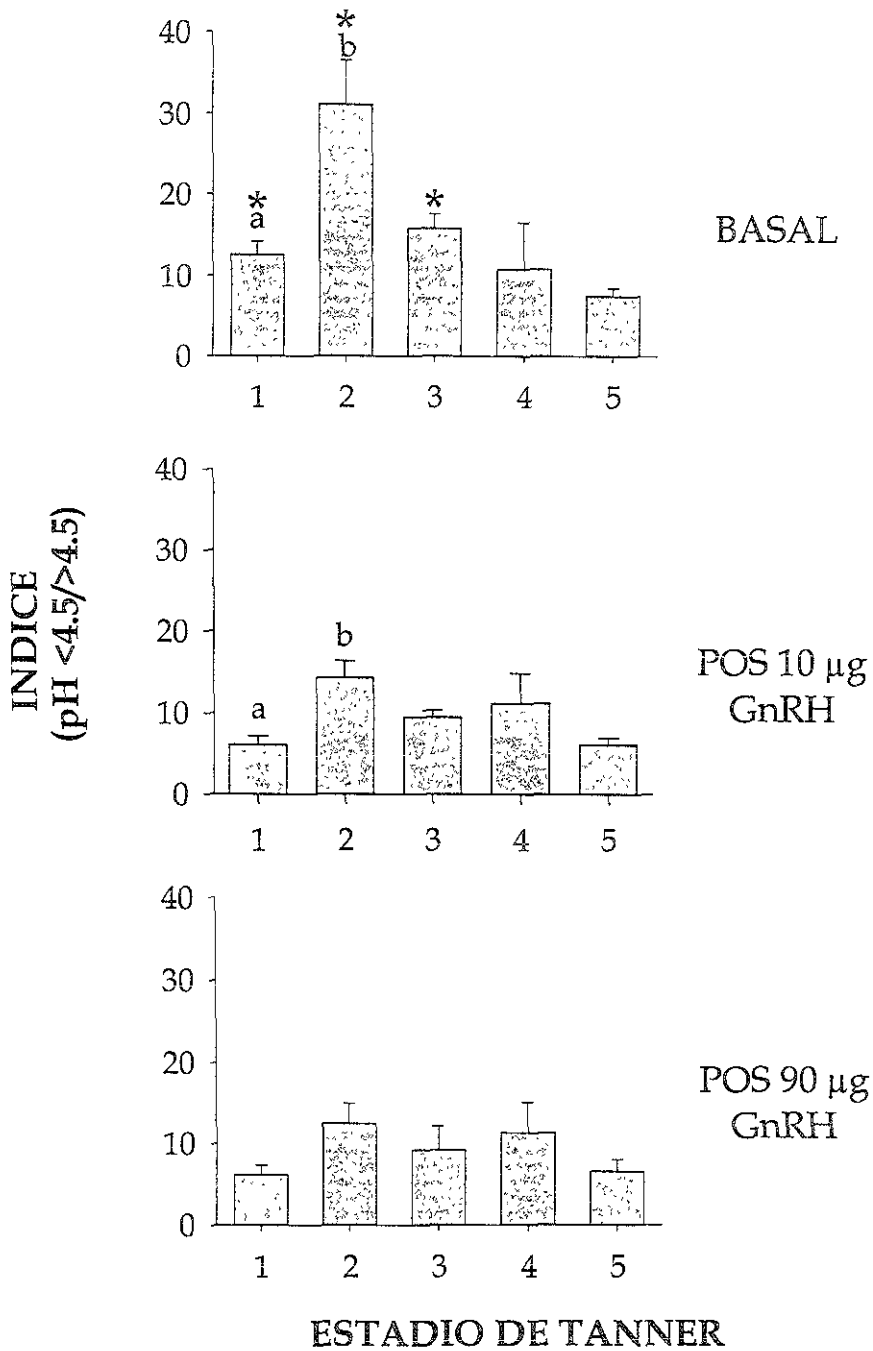
b $p < 0.05$ vs pos10 µg GnRH Tanner 2, 3 y 4

c $p < 0.05$ vs pos90 µg GnRH Tanner 5

* $p < 0.05$ vs pos10 y pos90 µg GnRH en el mismo estadio de Tanner

Figura 21. Cambios en el porcentaje de abundancia relativa de las diversas isoformas de FSH con valores de pH de elución menor o igual a 4.49, en relación con aquellas en las cuales los valores de elución de pH fueron mayores o igual a 4.5.

INDICE DE ISOFORMAS DE FSH



^a $p < 0.05$ vs Tanner 2 en la misma condición experimental

^b $p < 0.05$ vs Tanner 3, 4 y 5 en la misma condición experimental

* $p < 0.05$ vs pos10 y pos90 µg GnRH en el mismo estadio de Tanner

Figura 22. Índice de las isoformas de FSH con valores de pH < 4.5 entre aquellas con valores de pH > 4.5.

con aquellos que se encontraban en estadio 1 de Tanner, así como un decremento paulatino de dicho índice a partir del estadio 3, encontrándose diferencia significativa al comparar Tanner 1 vs 2 y Tanner 2 vs 3, 4 y 5 ($p < 0.05$). Posterior al estímulo con 90 μg de GnRH no se encontraron diferencias significativas. El índice de isoformas $<4.5/\geq 4.5$, en los estadios 1, 2 ó 3 de Tanner presentó una tendencia a disminuir considerablemente después de ambos estímulos con GnRH, en relación con lo encontrado en condiciones basales, encontrándose diferencias al comparar los valores basales vs 10 y 90 μg de GnRH en los 3 primeros estadios de pubertad, mientras que en los sujetos en estadio 4 y 5 de Tanner el índice se mantuvo en valores similares.

Al comparar la distribución de las isoformas <4.5 entre los diferentes estadios de Tanner, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones experimentales.

DISCUSION

La GnRH liberada por el hipotálamo en forma pulsátil, estimula la secreción de ambas gonadotropinas por la hipófisis anterior (Bridges *et al*, 1994). Tanto la LH como la FSH, secretadas también de manera pulsátil, estimulan a las gónadas en sus funciones gametogénica y esteroidogénica (Bousfield *et al*, 1994). El eje hipotalámo-hipófisis-gónada permanece en un período de relativa quietud durante la infancia y no es sino hasta la pubertad cuando se activa nuevamente. Los mecanismos precisos que reactivan el eje no han sido dilucidados hasta la fecha (Mitamura *et al*, 1999, 2000).

La FSH, al igual que la LH y otras hormonas peptídicas, es almacenada en gránulos de las células secretoras y liberada en forma bifásica. La secreción inicial que sigue a un estímulo submáximo con GnRH (sensibilidad) se considera que es debida a una poza metabólica presintetizada almacenada en gránulos cercanos a la membrana celular que es fácilmente liberable; mientras que la liberación tardía que ocurre al estimular con una dosis farmacológica del decapeptido (reserva), posiblemente requiere de la síntesis de *novo* y de la activación del sistema de microtúbulos y microfilamentos (Bremner *et al*, 1974; Beitins *et al*, 1977; Conn *et al*, 1995; Potau *et al*, 1999).

Con el fin de investigar de manera precisa la secreción de FSH inmunológica y biológicamente activa, a través del desarrollo puberal y de evaluar la secreción hormonal después de estímulos repetidos con GnRH (sensibilidad y reserva hipofisarias), se estudiaron 40 varones normales distribuidos en los 5 estadios de Tanner de desarrollo puberal. En todos los sujetos estudiados, las concentraciones de la FSH fluctuaron a lo largo de las 2 horas basales, lo que se explica con base en la secreción pulsátil y la vida media de la hormona, como ya ha sido demostrado previamente (Mitamura *et al*, 1999). El haber cuantificado la hormona de manera basal, únicamente durante 2 horas, no nos permitió determinar y caracterizar la presencia de pulsos, ya que la vida media plasmática de la FSH

es de 4 horas aproximadamente (Manzella *et al*, 1995). Como ya ha sido informado previamente, conforme los individuos avanzan a un estadio de Tanner más maduro, las concentraciones basales de FSH tienden a ser mayores, aunque hay que considerar que existen imbricaciones de las mismas entre los diversos estadios de Tanner (Tabla 2, Figura 12) (Mitamura *et al*, 1999).

Todos los individuos estudiados respondieron significativamente tanto al estímulo con 10 µg de GnRH, como al estímulo con 90 µg de GnRH, habiendo sido la respuesta mayor siempre al segundo estímulo (Figura 12). La liberación de una cantidad menor después del primer estímulo demuestra que el tamaño de la primera poza metabólica es menor y que la hipófisis posee la capacidad de sintetizar una mayor cantidad de hormona en respuesta a una segunda administración de GnRH. Este patrón de respuesta apoya el concepto, conocido desde hace muchos años, de la presencia de 2 componentes diferentes en cuanto a la síntesis y secreción de FSH liberable en la hipófisis anterior; uno que se secreta inmediatamente y el otro que se libera de manera tardía (Wang *et al*, 1976). Una explicación alterna o complementaria es que se produjese un efecto de impregnación, lo que condicionaría una mayor respuesta al segundo estímulo. Este fenómeno ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo al realizar estímulos testiculares repetidos con gonadotropina coriónica a lo largo de la pubertad en el varón (Ulloa-Aguirre *et al*, 1985).

Los estímulos con 10 µg y 90 µg de GnRH, indujeron mayores concentraciones en suero de FSH conforme el estadio de Tanner era mayor; sin embargo, existieron imbricaciones entre algunos individuos pertenecientes a un estadio de Tanner y otros que se encontraban en un estadio de Tanner diferente (Figura 12). Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en los que se ha observado una tendencia a una mayor respuesta, en términos de FSH, a un estímulo único de GnRH conforme avanza el estadio de desarrollo puberal (Potau *et al*, 1999).

Las diferencias encontradas en el área bajo la curva correspondiente a las 2 horas basales (área 1) de los sujetos en estadio 1 de Tanner vs el área 1 de los Tanner 2, 3, 4 y 5 demuestran que las concentraciones en suero de FSH en los sujetos prepuberales es menor a la de los sujetos que ya han iniciado la pubertad. Al comparar las áreas 2, 3, 4 y 5 (concentraciones estimuladas con GnRH) entre los diferentes grupos de sujetos estudiados, no existió diferencia significativa, aunque fue clara una tendencia a un mayor incremento durante los estadios 4 y 5 de Tanner. En todos los estadios de Tanner, la diferencia entre las áreas 2, 4 y 5 al compararse con el área 1, demostró que ambos estímulos liberaron cantidades significativamente mayores de FSH tanto de la poza metabólica de sensibilidad como de la poza metabólica de reserva, confirmándose hallazgos previos (Wang, 1976) En todos los estadios de Tanner el área bajo la curva de las primeras 2 horas después del estímulo con 90 µg de GnRH (área 4) fue significativamente mayor que el área bajo la curva de las primeras 2 horas (área 2) y las últimas 2 horas después del estímulo con 10 µg de GnRH (área 3). Este resultado nos indica que a lo largo de la pubertad, la reserva hipofisiaria es mucho mayor, en términos absolutos, que la sensibilidad. En este estudio, pudimos demostrar que en condiciones basales, los sujetos prepuberales secretan cantidades menores de FSH con respecto al resto de los estadios de Tanner lo cual confirma reportes previos (Mitamura *et al*, 1999). Estos resultados sugieren que la FSH puede desempeñar un papel importante para el inicio de la pubertad. Por otro lado, las pozas de sensibilidad y reserva liberadas con los estímulos repetidos con GnRH no se modifican a través del proceso puberal.

Hasta ahora no se ha determinado con precisión cómo se encuentra la actividad biológica de las gonadotropinas a lo largo del proceso puberal en el humano. En la actualidad, solamente existen publicados 3 estudios, los cuales se llevaron a cabo empleando sistemas heterólogos de bioensayo en células de Sertoli y de la granulosa de la

rata (Beitins *et al*, 1990; Kletter *et al*, 1993; Kasa-Vubu *et al*, 1993) que pretendieron delimitar las diferencias existentes en la actividad biológica de las gonadotropinas a lo largo de esta etapa de la vida. Sin embargo, en estos trabajos solamente se cuantificó una muestra única de manera basal en los individuos estudiados, lo cual, debido a la variación fisiológica de las gonadotropinas tanto por su vida media como por su pulsatilidad hace que los resultados obtenidos pudiesen ser cuestionables. De hecho dos de los estudios, los cuales pertenecen al mismo grupo de trabajo (Beitins *et al* 1990; Kletter *et al*, 1993), demuestran resultados contradictorios. En el estudio publicado por Beitins y *cols.* (1990), se demostró que la actividad biológica de la FSH se incrementaba en el estadio 2 en relación con el estadio 1 y en el 4 en relación con el 3; sin embargo, en el estudio de Kletter y *cols.* (1993), se demostró que la bioactividad disminuía en el estadio 2 en relación con el 1, así como al comparar los resultados obtenidos en los individuos en estadio 3 en relación con aquellos estudiados en estadio 4 de Tanner. Por último, el estudio practicado por Kasa-Vubu y *cols.* en 1993, en el cual también se obtuvo una muestra única de sangre, indicó que existe un incremento en las concentraciones de FSH tanto inmunoactiva como bioactiva en los primeros estadios de pubertad (1, 2 y 3) encontrándose una meseta después del estadio 3. Estos hallazgos también son cuestionables por las razones metodológicas antes expuestas.

En el presente estudio, se utilizó un bioensayo homólogo de FSH para estudiar la potencia biológica *in vitro* de la mezcla de isoformas secretadas de la hipófisis en respuesta a la GnRH endógena (basal) y exógena. En condiciones basales, el cociente B/I mostró un incremento significativo en los estadios de Tanner 2, 3, 4 y 5 al compararse con los sujetos Tanner 1. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Beitins y *cols* (1990), únicamente en que la actividad biológica aumenta en el estadio 2 de la pubertad en relación con los sujetos prepuberales. Asimismo, el cociente B/I obtenido inmediatamente después de la administración i.v. de la dosis de 10 µg de GnRH exógena, fue menor en los sujetos Tanner 1

en relación con los sujetos Tanner 2, 3, 4 y 5. La administración de la dosis de 90 μg , mostró las mismas diferencias en el cociente B/I pero no inmediatamente, sino en la tercera y cuarta horas después del estímulo. Los resultados tanto de la actividad inmunológica como de la actividad biológica en condiciones basales, indican que la secreción de FSH se incrementa en cantidad y en calidad a partir del estadio 2 de la pubertad, manteniéndose en valores similares a lo largo del proceso puberal. Sin embargo, al cuantificar la sensibilidad y la reserva hipofisiaria entre los diferentes estadios de Tanner, se observó que la secreción de FSH no se modifica en cantidad y si en calidad a partir del estadio 2 y también se mantiene en valores similares a lo largo de la pubertad.

Al llevar a cabo las comparaciones de la sensibilidad y la reserva en un mismo estadio de Tanner únicamente se encontraron diferencias en los sujetos Tanner 1, el cociente B/I obtenido inmediatamente después del estímulo con 90 μg de GnRH, fue mayor que el B/I basal así como del B/I de la tercera y cuarta horas después del mismo. En el resto de los estadios de Tanner no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El hecho de haber encontrado diferencias en el cociente B/I después de los estímulos con GnRH solamente en los sujetos prepuberales, se podría explicar con base en que aquellos individuos prepuberales no tienen concentraciones suficientes de GnRH endógenas, pero sí tienen la capacidad de responder de manera importante al estímulo farmacológico en términos de FSH bioactiva.

Las concentraciones en suero de ambas gonadotropinas se incrementan progresivamente conforme avanza el desarrollo puberal, partiendo de valores relativamente bajos, característicos de la etapa prepuberal, hasta alcanzar concentraciones de adulto en las últimas etapas puberales (Tanner 4). Diversos estudios han sugerido que además de los cambios cuantitativos, existen cambios cualitativos tanto de LH como de FSH a lo largo de la pubertad (Phillips y Wide, 1994; Phillips *et al*, 1997), ya que ha sido ampliamente demostrado

que dichas glicoproteínas no son hormonas de estructura única sino que están constituidas por un grupo de isoformas. Cada isoforma posee características biológicas particulares como son su capacidad de unión al receptor, vida media plasmática y bioactividades *in vitro* e *in vivo*, características éstas que se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas particulares (Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a; Ropelato *et al*, 1999; Castro-Fernández *et al*, 2000). En humanos se han llevado a cabo dos estudios en sujetos puberales, en los cuales se determinó la carga media de FSH (Phillips y Wide, 1994; Phillips *et al*, 1997); sin embargo, ambos estudios demuestran resultados parciales y poco generalizables debido a diseños experimentales limitados, además de que la metodología utilizada (electroforesis en columnas de agarosa al 0.1%) fué de baja resolución y a que las determinaciones se realizaron por IFMA, un método que puede subestimar a las isoformas menos sializadas (Observaciones no publicadas; Zambrano *et al*, 1996). Debido a esto, los resultados obtenidos solamente podrían demostrar fenómenos aislados, en cuanto a los cambios cualitativos de FSH durante la pubertad.

En este trabajo hemos demostrado que la FSH en los varones y en todos los estadios puberales es altamente heterogénea y es secretada de la hipófisis como una mezcla de isómeros, ya que se observó la presencia de múltiples componentes de FSH inmunorreactiva a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado. En los 5 grupos estudiados, así como en todas las fases del estudio, las isoformas circulantes de la gonadotropina tuvieron predominantemente un pH menor de 4.5. La predominancia de dichas isoformas en la circulación, también ha sido descrita en estudios realizados en humanos en la fase folicular y en la fase lútea del ciclo menstrual, (Zambrano *et al*, 1995; Anobile *et al*, 1998), durante la menopausia (Wide y Hobson, 1983), así como en estudios en los cuales se ha manipulado experimentalmente el ambiente endócrino utilizándose agonistas de GnRH (Wide *et al*, 1996a, Savastano *et al*, 1998) o el tratamiento con progestágenos (Wide *et al*, 1996b). Los hallazgos del presente trabajo demuestran que, independientemente de si el varón se encuentra en la fase prepuberal o ya es

un adulto totalmente desarrollado, las isoformas altamente sializadas siempre predominarán, lo cual puede explicarse por la sobrevivencia selectiva en la circulación de las isoformas con mayor vida media, así como por la producción y secreción disminuidas de las formas con menor vida media (las menos ácidas) (Wide y Hobson, 1986; Ulloa-Aguirre *et al*, 1995a). Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de que las formas más ácidas predominan en todas las condiciones, éstas lo hacen en menor proporción en los sujetos en estadio 4 y 5 que en aquellos en otros estadios de Tanner. Este hallazgo podría uede equipararse con lo encontrado en la mujer normal durante la fase periovulatoria (fase de mayor actividad hipotálamo-hipofisiaria), ya que en dicha fase se secretan una mayor cantidad de formas moleculares menos ácidas en relación con las secretadas en las fases folicular y lútea, lo cual podría estar relacionado con la mayor capacidad de estas isoformas para potenciar los efectos de la LH en la ruptura folicular (Timossi *et al*, 1998), a diferencia de la mayor abundancia de isoformas más ácidas durante la fase folicular temprana y la fase lútea; esto último podría relacionarse con fenómenos que requieren de un estímulo más prolongado, como la proliferación celular, y menos intenso en factores inhibitorios de la síntesis y secreción de la FSH (Wide y Hobson, 1983; Padmanabhan *et al*, 1988; Zambrano *et al*, 1995).

En condiciones basales, los sujetos que se encontraban en los estadios 4 y 5 de Tanner presentaron una mayor abundancia relativa de las formas menos ácidas ($\text{pH} \geq 4.5$) en relación con los sujetos que se encontraban en estadio 1, 2 ó 3 de Tanner, encontrándose diferencias significativas al comparar Tanner 1 vs 4 y 5; Tanner 2 vs 4 y 5 y Tanner 3 vs 4 y 5. Estos resultados contrastan con lo encontrado por Wide (1989) en donde la carga media de FSH hipofisiaria en los prepúberes era más básica que aquellas encontradas en los adultos. Sin embargo, hay que considerar que estas diferencias pueden deberse a que en el trabajo previamente citado se estudió la carga media de la hormona y a que se obtuvo una sola muestra. En el presente trabajo, la menor proporción de isoformas menos ácidas en aquellos sujetos en

estadio 1, 2 y 3, y el aumento en la proporción de las mismas en los estadios 4 y 5 de Tanner, pudiese deberse a los cambios en la síntesis de estos isómeros, promovida por el ambiente endocrinológico existente en las diferentes etapas del desarrollo puberal, ya que como se observa en la Tabla 2 las concentraciones de testosterona se incrementan paulatinamente a partir del estadio 2 de Tanner, lo que podría desviar la producción de las isoformas hacia las formas más ácidas, como se evidenció en lo encontrado en los estadios 2 y 3; sin embargo, el incremento progresivo en las concentraciones de estradiol así como en la exposición a GnRH, podría provocar que la proporción de las isoformas más sializadas disminuya y por ello en los estadios 4 y 5 de Tanner nuevamente predominen aparentemente las menos ácidas. Esta posibilidad concuerda con lo informado acerca de la actividad de algunas glicosiltransferasas, como las sialiltransferasas, N-acetilgalactosamina transferasa y galactosa-N-acetiltransferasa, las cuales pueden ser moduladas a nivel hipofisiario por los estrógenos, lo que podría influir sobre el grado de sialización y sulfatación de las diferentes hormonas glicoproteicas (Smith y Baenzinger, 1988; Dharmesh y Baenzinger, 1993; Damián-Matsumura *et al*, 1999).

Por otro lado, al igual que lo descrito por Phillips *y cols.* (1997), la proporción relativa de las isoformas más ácidas fué mayor en el estadio 2 que en el estadio 1 de Tanner. Sin embargo, estos autores encuentran que no existen cambios del estadio 3 en adelante, mientras que nuestro estudio revela que a partir del estadio 3 la proporción relativa de las isoformas más ácidas disminuye progresivamente, siendo incluso menor en los estadios 4 y 5 que en el estadio 1 (Tabla 5). Estas diferencias encontradas en condiciones basales son todavía más relevantes al observar los resultados expresados como el cociente entre las isoformas < 4.5 y ≥ 4.5 (Figura 22), ya que los sujetos en estadio 2 de Tanner presentan un índice 4.16 veces mayor que aquellos sujetos en estadio 5. Este índice disminuyó gradualmente a partir del estadio 2 hasta el estadio 5; sin embargo, los individuos en estadio 1 de Tanner presentaron un índice que se encontraba en valores entre aquellos individuos en estadio 3 y en estadio 4 de Tanner. En

condiciones basales, las diferencias en los CDFs con pH mayores a 4.5 entre los diferentes estadios de Tanner se encontraron al comparar los Tanner 1, 2 y 3 vs Tanner 4 y 5 (Figura 20), lo que demuestra que el incremento en la proporción de las isoformas menos ácidas es un fenómeno relacionado con la maduración sexual. En todos los grupos estudiados, los individuos presentaron variaciones en la proporción relativa de las isoformas mayores y menores a pH 4.5 después de los estímulos con GnRH. Luego de los estímulos con 10 y 90 μg de GnRH, solamente en los Tanner 1, 2 y 3 aumentó la proporción de las isoformas menos ácidas, encontrándose cambios importantes en el índice $<4.5/ \geq 4.5$. La respuesta al estímulo con GnRH en los Tanner 1, 2 y 3 concuerda con diversos estudios llevados a cabo en modelos animales (Galle *et al*, 1983; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992c), así como en uno practicado en pacientes con hipogonadismo hipergonadotrópico (Wide y Albertsson-Wikland, 1990). Asimismo, estos hallazgos concuerdan con lo observado al estimular con GnRH a niños que se encontraban en la pubertad (Phillips y Wide, 1994). Al igual que lo observado al comparar a los diversos grupos estudiados en condiciones basales, pudimos observar que luego del estímulo con 10 μg de GnRH, el incremento proporcional en la respuesta de los individuos en estadio 1 de Tanner se encontró entre aquellos individuos en fases de mayor maduración (estadios 4 y 5). Los cambios observados en la distribución de las isoformas de FSH después de la estimulación con GnRH pudiesen deberse a cambios en la glicosilación inducida por GnRH o las hormonas esteroides, a la mayor detección de isoformas de vida media corta o una combinación de estos factores. Para interpretar estos resultados, hay que considerar que la administración del decapeptido, aún en dosis de 10 μg , constituye una prueba farmacológica y que los cambios observados no pueden ser totalmente extrapolables al considerar las condiciones fisiológicas existentes al inicio y durante la pubertad. La tendencia a sintetizar isoformas más básicas después de la administración de GnRH, puede ser debida a una secreción selectiva de dicho tipo de isoformas (Wide y Albertsson-Wikland, 1990; Zalesky y Grotjan, 1991) o a que determinadas isoformas

poseen una sobrevida selectiva, ya que las isoformas más básicas de FSH tienen una vida media menor (Blum y Gupta, 1985; Ulloa-Aguirre *et al*, 1992a, 1999b). Consecuentemente, las isoformas menos ácidas encontradas en suero después del estímulo con GnRH representarían a las formas recientemente sintetizadas y la proporción entre las mismas se vuelve más ácida cuando las isoformas menos ácidas desaparecen rápidamente de la circulación (Wide, 1986, Timossi *et al*, 2000).

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

Sumamente interesante es el hallazgo de que en todas las condiciones experimentales, los individuos en estadio 1 de Tanner presentan valores intermedios en relación con los grupos (Tanner 4 y 5) antes descritos. Hay que considerar que los niños en estadio 1 de Tanner se encontraban por iniciar la pubertad, ya que todos los sujetos pasaron a estadio 2 de Tanner antes de que se cumplieran 6 meses de haberse practicado el estudio. Es un hecho bien conocido que la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis a las bajas concentraciones de esteroides gonadales difiere durante la infancia en relación con lo observado en la pubertad y en la vida adulta, y la inmadurez en la síntesis o las bajas concentraciones de testosterona y estradiol pudiesen ser la explicación de la proporción de isoformas con pH mayor de 4.5 observado en los sujetos en estadio 1 de Tanner (Sizonenko, 1978; Grumbach y Kaplan, 1990; Mitamura *et al*, 1999). Las diferencias encontradas entre la proporción relativa de las isoformas de FSH en condiciones basales al compararse con lo encontrado después de los estímulos con 10 y 90 µg de GnRH en aquellos sujetos en estadio 1, 2 ó 3 de Tanner, pero no en los demás

grupos, se podría explicar con base en que aquellos individuos que no han iniciado pubertad o se encuentran en las primeras fases de esta etapa, no tienen concentraciones suficientes de GnRH endógena, pero sí responden de manera importante al estímulo farmacológico. Esto parecería indicar que conforme el estadio de Tanner en el que se encuentra cada individuo, lo que determina el incremento en las isoformas menos ácidas es la GnRH endógena y/o la sensibilidad que la hipófisis presenta a la misma, lo cual es altamente dependiente de los esteroides gonadales (Ulloa-Aguirre *et al*, 1992c). Los mecanismos intrínsecos que regulan los cambios de las isoformas de FSH durante la pubertad en el humano no han sido bien definidos, y aunque nuestros resultados contribuyen a un mejor entendimiento de dichos mecanismos, no permiten aún definirlos con precisión. Las diferencias en carga observadas reflejan variaciones en el grado de sialización, y son significativas en lapsos cortos, lo que hace poco probable que los andrógenos o la inhibina sean los responsables de ello, debido a que estos factores reguladores se incrementan gradualmente a lo largo de todo el proceso puberal (Raivio *et al*, 1998; Mitamura *et al*, 1999; Raivio *et al*, 2000). Aún más, la castración de adultos no afecta a las isoformas de FSH (Wide, 1982) y la administración de testosterona no posee efectos en las isoformas en aquellos hombres con síndrome de Klinefelter (Harsch *et al*, 1993). Con base en estos trabajos, en los hallazgos del presente estudio y en el hecho de que el tratamiento con GnRH altera la glicosilación *in vitro* de la molécula de LH (Liu *et al*, 1976; Vogel *et al*, 1986; Ramey *et al*, 1987), podríamos postular, que de operar un mecanismo como este último en el caso de la FSH, existiría un efecto directo de la GnRH, modulado por los cambios en la concentración de estradiol circulante, sobre la regulación de la microheterogeneidad.

En resumen, los resultados del presente estudio nos permiten concluir que existen variaciones en la abundancia relativa de las isoformas de la FSH circulante a lo largo del proceso puberal, lo cual posiblemente condiciona cambios en el cociente B/I de la hormona. No sobra considerar que para atribuir un significado fisiológico al fenómeno del pleomorfismo de

FSH es necesario demostrar, como lo hemos hecho en este estudio, que las diversas isoformas son secretadas a la circulación y así alcanzan la célula blanco, y que la producción y secreción de las isoformas se encuentra hormonalmente regulada. Sin embargo, quedaría por demostrar en una etapa siguiente, el que los cambios en la glicosilación de las isoformas alteren la actividad biológica neta de la hormona *in vivo* y que por lo tanto tengan un impacto fisiológico en la maduración sexual del varón.

BIBLIOGRAFIA

- Albanese C, Christin-Maitre S, Sluss PM, Cowley WF, Jameson JL. Development of a bioassay for FSH using the recombinant human FSH receptor and a cAMP responsive luciferase reporter gene. *Mol Cell Endocr* 101:211, 1994.
- Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Lannering B, *et al.* Twenty four hour profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and estradiol levels: A semilongitudinal study throughout puberty in healthy boys. *J Clin Endocr Metab* 82:541, 1997
- Anderson RA, Irvine DS, Balfour C, *et al.* Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod* 13:4, 1998
- Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, *et al.* Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod* 4:7, 1998.
- Ascoli M. Internalization and degradation of receptor-bound human chorionic gonadotropin in Leydig tumor cells. Fate of the hormone subunits. *J Biol Chem* 257:13306, 1982.
- Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E, *et al.* Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. *FASEB J* 12:11, 1998
- Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 3:91, 1982.
- Beitins IZ, Dufau ML, O'Loughlin K, *et al.* Analysis of biological and immunological activities in the two pools of LH released during constant infusion of luteinizing hormone releasing (LHRH) in men. *J Clin Endocr Metab* 45:605, 1977.
- Beitins IZ, Padmanabhan V, Kasa-Vubu J, *et al.* Serum bioactive follicle-stimulating hormone concentrations from prepuberty to adulthood: a cross-sectional study. *J Clin Endocr Metab* 71:1022, 1990
- Blum WFP, Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released *in vitro* and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol* 105:29, 1985.
- Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, *et al.* A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 256:5121, 1981
- Boyar R, Finkelstein J, Roofwarg H, *et al.* Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med* 287:582, 1972.
- Bousfield GR, Perry WM, Ward DN. Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. En: Knobil E, Neill JD (Eds): *The physiology of reproduction*, ed 2. New York, Raven Press Ltd, 1994 pp 1749-1792.

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

Bridges NA, Hindmarsh PC, Matthews DR, *et al*. The effect of changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency on puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 79:841, 1994.

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

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

Castro-Fernández C, Olivares A, Söderlund D, *et al*. A preponderance of circulating basic isoforms of luteinizing hormone (LH) is associated with decreased plasma half-life and biological-to-immunological ratio in obese men. *J Clin Endoc Metab*, 85:4603, 2000.

Catt KJ, Dufau ML. Gonadotropic hormones. biosynthesis, secretion, receptors, and actions. En Yen SSC, Jaffe RB (Eds). *Reproductive Endocrinology*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders, 1991, pp 105-151.

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

Chappel S, Buckler D, Kelton C, *et al*. Follicle stimulating hormone and its receptor: future perspectives. *Hum Reprod*, 13: 18, 1997.

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

Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 28:196, 1983b.

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

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

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

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

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

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

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

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

Culler MD, Negro-Vilar A. Destruction of testicular Leydig cells reveals a role of endogenous inhibin in regulating follicle-stimulating hormone secretion in the adult male rat. *Mol Cell Endocrinol* 70:89, 1990.

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

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

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

Damián-Matsumura P, Zaga V, Sánchez-Hernández C, *et al*. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 23:153, 1999

D'Antonio M, Borrelli F, Datola A, *et al*. Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Hum Reprod* 14.5, 1999.

Dharmesh SM, Baenzinger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferase that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90.11127, 1993.

Dunkel L, Alfthan H, Stenman U, *et al*. Pulsatile secretion of LH and FSH in prepubertal and early pubertal boys revealed by ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assays. *Pediatr Res* 27.215, 1990.

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

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baensinger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄ – 4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2 Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67:1103, 1991.

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

Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, *et al*. In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* 127:93, 1990

Ganong WF. Review of medical physiology. Appleton & Lange. Norwalk, Conn 13th Ed, 1987.

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

Grasso P, Deziel MR, Reichert LE. Synthetic peptides corresponding to residues 551 to 555 and 650 to 653 of the rat testicular follicle-stimulating hormone (FSH) receptor are sufficient for post-receptor modulation of Sertoli cell responsiveness to FSH stimulation. *Reg Pept* 60:177, 1995a.

Grasso P, Leng N, Reichert Jr LE. A synthetic peptide corresponding to the third cytoplasmic loop (residues 533 to 555) of the testicular follicle-stimulating hormone receptor affects signal transduction in rat testis membranes and in intact cultured rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 110:35, 1995b.

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

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

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

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

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

Hassing JM, Padmanabhan V, Kelch RP, *et al*. Differential regulation of serum immunoreactive luteinizing hormone and bioactive follicle-stimulating hormone by testosterone in early pubertal boys. *J Clin Endocr Metab* 70:1082, 1990.

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

Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, *et al*, Differential control of gonadotropin secretion in the human: Endocrine role of inhibin. *J Clin Endocr Metab* 83:1835, 1998

Hemilä I, Dakubu S, Mukkala VM, *et al*. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assay. *Annal Biochem* 137:335, 1984.

Jaakkola T, Ding YQ, Kellokumpu-Lehtinen, *et al*. The ratios of serum bioactive/immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in various clinical conditions with increased and decreased gonadotropin secretion: reevaluation by a highly sensitive immunometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1496, 1990

Kasa-Vubu JZ, Padmanabhan V, Kletter GB, *et al*. Serum bioactive luteinizing and follicle-stimulating hormone concentrations in girls increase during puberty. *Pediatr Res* 34:829, 1993.

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

Kletter GB, Padmanabhan V, Brown MB, *et al*. Serum bioactive gonadotropins during male puberty: a longitudinal study. *J Clin Endocr Metab* 76:432, 1993.

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

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

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

Lee DW, Sheldon RM, Reicher LE. Identification of low and high molecular-weight follicle-stimulating hormone receptor-binding inhibitors in human follicular fluid. *Fertil Steril* 53:830, 1990

Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic GnRH on incorporation of radioactive glucosamine, and amino acids into LH and total protein by rat pituitaries "in vitro". *Endocrinology* 98:151, 1976

Lovgren T, Hemmila I, Pettersoon K, *et al.* Determination of hormones by time-resolved fluoroimmunoassay. *Talanta* 31:909, 1984.

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

Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47:155, 1991.

Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. En. Martin L, Ganong WF, (Eds). *Frontiers in Neuroendocrinology.* Raven Press, p.p 239, 1988.

Marshall WA, Tanner JM. Puberty En: Flakner F, Tanner JM (Eds). *Human Growth.* New York: Plenum Press, p.p.117, 1986.

Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44:291, 1969

Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13, 1970.

Matera C, Freda PU, Ferrin M, Wardlaw SL. Effect of chronic opioid antagonism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in hyperprolactinemic women. *J Clin Endocr Metab* 80:540, 1995.

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

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* 43:393, 1971.

Mayo KE. Inhibin and activin. Molecular aspects of regulation and function. *Trends Endocrinol Metab* 5:407, 1994.

Mc Cann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH releasing activity in hypothalamic extracts. *Soc Exp Biol Med Proc* 104:432, 1960.

McNatty KP, Isaacs KL, Gentle L, *et al.* Bioactive and immunoreactive FSH concentrations in ewe and ram lambs over the first year of life. *Anim Reprod Sci* 51:155, 1998.

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

Mitamura R, Yano K, Suzuki N, *et al.* Diurnal Rhythms of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and testosterone secretion before the onset of male puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 84:29, 1999

Mitamura R, Yano K, Suzuki N, *et al.* Diurnal Rhythms of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone, and estradiol secretion before the onset of female puberty in short children. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1074, 2000

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

Olivares A, Cárdenas M, Timossi C, *et al.* Reactivity of different LH and FSH standards and preparations in the World Health Organization matched reagents for enzyme-linked immunoassays of gonadotrophins *Hum Reprod* 15:2285, 2000

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

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

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

Pfaff DW, McEwen BS. Actions of estrogen and progestins on nerve cells. *Science* 219:808, 1981.

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocr Metab* 82:3103, 1997.

Phillips DJ, Wide L Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocr Metab* 79:814, 1994.

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

Potau N, Ibañez L, Sentis M, *et al.* Sexual dimorphism in the maturation of the pituitary-gonadal axis, assessed by GnRH agonist challenge. *Eur J Endocrinol* 141:27, 1999.

Raivio T, Perheentupa A, McNeilly A, *et al.* Biphasic increase in serum inhibin B during puberty: A longitudinal study of healthy finnish boys. *Pediatr Res* 44:552, 1998

Raivio T, Saukkonen S, Jaaskeläinen J, *et al.* Signaling between the pituitary gland and the testes: inverse relationship between serum FSH and inhibin B concentrations in boys in early puberty. *Eur J Endocrinol* 142:150, 2000

- Ramey JW, Highsmith RF, Wilfinger WW, *et al*. The effects of gonadotrophin-releasing hormone, and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultures rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120:1503, 1987.
- Rebar R, Yen SSC, Vandenberg G, *et al*. Gonadotropin responses to synthetic LRF: dose-response relationship in men. *J Clin Endocr Metab* 36:10, 1973.
- Reiter EO, Grumbach MM. Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 44:595, 1982.
- Reyes-Fuentes A, Chavarria ME, Aguilera G, *et al*. Deconvolution analysis of bioassayable LH secretion and half-life in men with idiopathic oligoasthenospermic. *Int J Androl* 20:118, 1997.
- Robertson DM, Van Damme MP, Diczfalusy E. Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Mol Cell Endocrinol* 9:45, 1977.
- Ropelato MG, García-Rudaz MC, Castro-Fernández C, *et al*. A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocr Metab* 84:4629, 1999.
- Savastano S, Tommaselli AP, Valentino R, *et al*. Changes in the glycosylation pattern of circulating gonadotropins after acute administration of gonadotropin-releasing hormone in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 138:1, 1998.
- Schally A, Arimura A, Baba Y, *et al*. Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43:1334, 1971.
- Simon M, Weinbauer GF, Grcmoll J, *et al*. Role of FSH in male gonadal function. *Ann Endocrinol* 80:2, 1999.
- Sizonenko PC. Endocrinology in preadolescents. I. Hormonal changes during normal puberty. *Am J Dis Child* 132:704, 1978.
- Sluss PM, Schneyer AL. Low molecular weight follicle-stimulating hormone receptor binding inhibitor in sera from premature ovarian failure patients. *J Clin Endocr Metab* 74:1242, 1992.
- Smith PL, Baenzinger JU. A pituitary N-Acetylgalactosamine transferase that specifically recognizes glycoprotein hormones. *Science* 242:930, 1988.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 125:133, 1996.

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

Stuner A, Kipnis C, Utiger D, *et al.* Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3'5'cyclic phosphate. *Proc Nat Acad Sci* 64:367, 1969

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

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

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

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

Timossi CM, Damián-Matsumura P, Dominguez-Gonzalez A, Ulloa-Aguirre A. A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analog in phenobarbital-blocked proestrus rats. *Mol Hum Reprod* 4:1032, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez MR, *et al*. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat. isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrin* 110:539, 1986.

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

Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, 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 Endocr Metab* 61:926, 1985

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wide L, Hobson BM. Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. *Acta Endocrinol (Copenh)* 113:17, 1986

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

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

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

Wide L. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112:336, 1986.

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

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

Wu FC, Butler GE, Keinar CJ, *et al.* Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male. A study using deconvolution analysis and an ultrasensitive immunofluorometric assay. *J Clin Endocr Metab* 81:1798, 1996.

Ying YS. Inhibins, activins, and follistatins: Gonadal Proteins Modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9:267, 1988

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

Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cardenas M, Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Mol Hum Reprod* 2:563, 1996.

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

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

RECEIVED NOV 14 1999
RECEIVED

Reactivity of different LH and FSH standards and recombinant preparations in the World Health Organization matched reagents for enzyme-linked immunoassays of gonadotrophins

J. Olivares¹, M. Cárdenas², C. Timossi³, T. Zariñán^{2,3},
D. Díaz-Sánchez² and A. Ulloa-Aguirre^{2,3,4}

¹Research Unit in Developmental Biology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI, IMSS, ²Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, ³Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4, IMSS, Mexico DF, Mexico

To whom correspondence should be addressed at: Research Unit in Reproductive Medicine, Instituto Mexicano del Seguro Social, P.O. Box 99-065, Unidad Independencia, Mexico 10101, DF, Mexico. E-mail: aulloa@buzon.main.conacyt.mx

The immunoreactivity of various LH and FSH calibration standards and recombinant preparations in the enzyme-linked immunoassay (EIA) systems for gonadotrophins developed for the Special Programme of Research in Human Reproduction of the World Health Organization (WHO) were compared. The preparations tested included three LH and two FSH pituitary standards (calibrated against LH 80/552 and 68/40 and FSH 78/549 respectively) provided with the EIA or radioimmunoassay WHO matched reagent kits, the pituitary preparation LER-907, and recombinant human LH (rhLH) and FSH (rhFSH). Simultaneous curve fitting of the EIA dose-response curves revealed no significant differences among the slopes generated by the WHO LH standards and LER-907; in contrast, no parallelism was found between the curves of rhLH and the pituitary-derived LH standards. No significant differences were found among the slopes of the curves elicited by the pituitary and recombinant FSH preparations. Each LH preparation exhibited a high degree of charge heterogeneity. Considerable variations in charge isoform distribution among the WHO LH standards, rhLH and LER-907 were also evident. In contrast, the FSH preparations were less heterogeneous and exhibited minor differences in charge distribution. Despite the existing differences in charge isoform distribution, all the pituitary-derived preparations as well as rhFSH seem appropriate for using as calibration standards in this particular EIA system.

Key words: enzyme-linked immunoassay/FSH/LH

including the pituitary gonadotrophins LH and FSH. The name and concept of the matched reagents originated not only from the necessity for all reagents forming part of an assay system to be matched to each other, but also, from the intention to provide the various WHO collaborative centres with identical, matched reagents for single- or multi-centre clinical trials, the analytical identity of reagents used in various WHO collaborating laboratories being a prerequisite for obtaining reliable and comparable results.

As a result of the progress in analytical techniques, the initial assay method (radioimmunoassay) to quantify pituitary gonadotrophins in serum was replaced approximately 5 years ago by enzyme-linked immunoassays (EIA). The change in the assay methodology has brought about some numerical differences in assay results. For example, in the 1994 WHO external quality assessment programme report, the ELISA results were, on average, numerically 30% lower for LH, while those obtained for FSH were 50% higher (WHO Technical Report, 1994). Among the reasons for these numerical discrepancies are the use of different antibodies (e.g. polyclonal antibodies in the radioimmunoassays versus monoclonal antibodies in the EIA) possessing distinct epitope specificities as well as the use of different pituitary preparations for constructing the standard curves, which may be differentially recognized by a determined set of antibodies, particularly by those of monoclonal origin (Pettersson *et al.*, 1991; Pettersson and Soderholm, 1991; Vermes *et al.*, 1991; Jeffcoate, 1993; Costagliola *et al.*, 1994a,b,c; Martin-Du-Pan *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994). In fact, significant variations in molecular composition (mainly determined by the sample source, type of particular oligosaccharide chains attached to the protein core of the molecule and purification methods used to isolate the glycoproteins) have been detected among some of the highly purified pituitary gonadotrophin preparations employed to calibrate the kit standards, which may be distinctly recognized by antibodies and cognate receptors (Chappel *et al.*, 1986; Simoni *et al.*, 1993; Chappel, 1995; Burgon *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1998). Further, it has been shown that the gonadotrophin glycoforms contained in crude pituitary extracts and recombinant preparations may be either equally or differentially identified depending on the particular antibody configuration of the immunoassay system employed for their quantitative estimation (Zambrano *et al.*, 1996; Oliver *et al.*, 1999).

In the present study, we analysed the dose-response curve profiles of various widely employed pituitary and recombinant gonadotrophin preparations in the EIA system provided by the WHO Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Immunoassay of Hormones (henceforth: the programme), and established their relative potency in this particu-

Introduction

Twenty five years ago, the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization (WHO), established a validation, standardization and distribution programme to provide a number of laboratories with reagents, the so-called matched reagents, for the assay of reproductive hormones in serum,

lar immunoassay. In addition, the behaviour of each preparation in the EIA system was correlated with its particular molecular composition as revealed by preparative chromatofocusing.

Materials and methods

Standards

The human LH preparations tested in this study were the partially purified LER-907 standard for radioimmunoassay of gonadotrophins [obtained from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) through the National Hormone and Pituitary Program (NHPP), Torrance, CA, USA], highly purified recombinant human LH (coded herein as rhLH for the purpose of the study) produced by Chinese hamster ovary (CHO) cells (kindly provided by Organon International BV, Oss, The Netherlands), the pituitary LH standard (coded herein as WHO INEN) prepared by the WHO Collaborating Center in Cuba (provided by the Cuba–Mexico WHO RIA Reagents Programme, Instituto Nacional de Endocrinología, La Havana, Cuba and Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Mexico City, Mexico) and calibrated against the WHO international reference preparation (IRP) of LH 80/552 (Storring and Gaines Das, 1993), the LH standard (coded herein as WHO 80/552C) contained in the LH EIA kit provided by the programme which is calibrated against the WHO IRP 80/552 and the LH standard preparation (coded herein as WHO 68/40C) intended to be used in the former programme's radioimmunoassay system, which was calibrated against the WHO IRP of LH 68/40 (Storring *et al.*, 1978). For FSH, the following were tested: the LER-907 standard, highly purified recombinant human FSH (rhFSH) produced by CHO cells (ORG 32489, Organon International) (Olijve *et al.*, 1996), a FSH standard preparation (WHO INEN) provided by the WHO Collaborating Center in Cuba and calibrated against the WHO IRP of FSH 78/549 (Storring and Gaines Das, 1989), and the FSH standard (coded herein as WHO 78/549C) contained in the FSH EIA kit provided by the programme, which has been calibrated against the WHO IRP 78/549.

Immunoassays of LH and FSH

Enzyme-linked immunoassays

The EIA of LH and FSH were performed employing reagents provided by the WHO Collaborating Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, London UK, following the instructions provided by the centre. The assays were of an immunometric ('sandwich') design and employed two anti-LH or anti-FSH monoclonal antibodies. In each EIA, the first antibody was directed against the β -subunit of the molecule and was attached to a magnetic particle, whereas the second antibody was directed against the α -subunit, and was labelled with alkaline phosphatase. These LH and FSH EIA systems exhibit $\leq 0.1\%$ and 0.03% cross-reactivity with highly purified FSH and LH respectively, and undetectable reactivity with growth hormone (GH) and prolactin. The intra- and interassay variables were $\leq 4.0\%$ and $\leq 8.0\%$ respectively. Results are expressed as ng or mIU as appropriate according to the particular standard preparation analysed.

Radioimmunoassays

The radioimmunoassay of LH was performed employing ^{125}I -labelled LH-I3 as the tracer (specific activity 70–90 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ protein), the reference preparation LER-907 as the standard and the antihuman LH-3, at a final dilution of 1:800 000, as the antiserum (Ropelato *et al.*, 1999). Cross-reactivity of this antiserum with highly purified FSH, GH and prolactin is $< 0.2\%$. The sensitivity of the assay was 0.7 IU/l. The FSH radioimmunoassay was performed employing ^{125}I -labelled FSH I-1 as the tracer (specific activity 60–70 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

protein), the LER-907 preparation as the standard and anti-human FSH-6 at final dilution of 1:250 000, as the antiserum (Timossi *et al.*, 1998). This antiserum exhibits less than 0.1% cross-reactivity with highly purified human LH and prolactin and undetectable reactivity with free α -subunit and GH. In both radioimmunoassay systems, LH and FSH isoforms displaced either ^{125}I -labelled FSH or LH from the antibody in a parallel fashion when tested at seven to 10 different dilutions; in fact, simultaneous curve fitting of the dose-response curves revealed no significant differences among the slopes generated by FSH and LH present in the LER-907 standard and concentration pools of the several isoforms fractionated by chromatofocusing (Zambrano *et al.*, 1996). All LH and FSH radioimmunoassay reagents were generously provided by the NIDDK through Dr A.F.Parkes from the NHPP. For both radioimmunoassays, the inter- and intra-assay coefficients of variation were < 13 and $< 8\%$ respectively. The results are expressed as ng of the LER-907 standard.

Preparative chromatofocusing of LH and FSH

Chromatofocusing of each gonadotrophin preparation was performed as described previously (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992; Castro-Fernández *et al.*, 2000) with some modifications. This technique allowed the separation of different gonadotrophin isoforms on the basis of charge which in all glycoprotein hormones is mainly determined by the amount of terminal sialic acid and/or sulphate residues present in the oligosaccharide structures of the molecule (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995b). Briefly, 2.0–2.7 IU of each WHO standard, $\sim 111 \mu\text{g}$ of LER-907, $\sim 5.0 \mu\text{g}$ of rhLH, and $\sim 50 \mu\text{g}$ of rhFSH were redissolved in phosphate (0.01 mol/l) buffered physiological (0.15 mol/l) saline and transferred to dialysis membrane tubing (molecular weight cut-off 12 000–14 000, Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA), dialysed at 4°C for 24 h against deionized water and thereafter against 0.01 mol/l ammonium carbonate (pH 7.5) and freeze-dried. Lyophilates were redissolved to one tenth of original volume in Pharmalyte pH 8–10.5-HCl (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) (1:45 dilution in deionized water, pH 7.0) and the suspension was then applied to the top of a 30×1 cm column of polybuffer exchange resin (PBE-118, Pharmacia Biotech), previously equilibrated for 18–24 h with 25 mmol/l triethylamine-HCl, pH 11.0, and chromatofocused at 4°C. Eluate fractions (2 ml each) were collected at a flow rate of 1 ml/4 min. The pH of each fraction was then measured, and when a limiting pH of 7.0 had been reached the eluent buffer (Pharmalyte-HCl) was changed by Polybuffer-74 (Pharmacia Biotech) diluted 1:8 in deionized water, pH 4.0, to elute proteins bound at pH 7.0–4.0. Proteins bound at the lower limiting pH (pH < 3.50 ; sialic acid peak) were finally recovered by the addition of 1.0 mol/l NaCl to the chromatofocusing column. The pH of each fraction was neutralized to pH 7.0 by the addition of either 200 μl 1.0 mol/l triethylamine-HCl pH 7.0 (to those fractions with an elution pH value of 11.0–7.0) or 1.0 mol/l imidazole-HCl pH 7.4 (to fractions recovered with elution pH values of 6.99 to < 4.0). Each fraction was stored frozen at -20°C until the day of the LH or FSH radioimmunoassays. All fractions from a single column were assayed in duplicate incubations in the same radioimmunoassay run. Recoveries of immunoactive LH and FSH after chromatofocusing were $75 \pm 5\%$ of the total amount applied to the columns. Each gonadotrophin preparation was chromatofocused in three separate runs.

Statistical analysis

Tests for parallelism among the slopes generated by the different gonadotrophin preparations in the EIA and the LH radioimmunoassays were performed following the method of DeLean *et al.* (1978). This method allows for simultaneous fitting and analysis of families of sigmoidal dose-response curves and describes the curves in terms

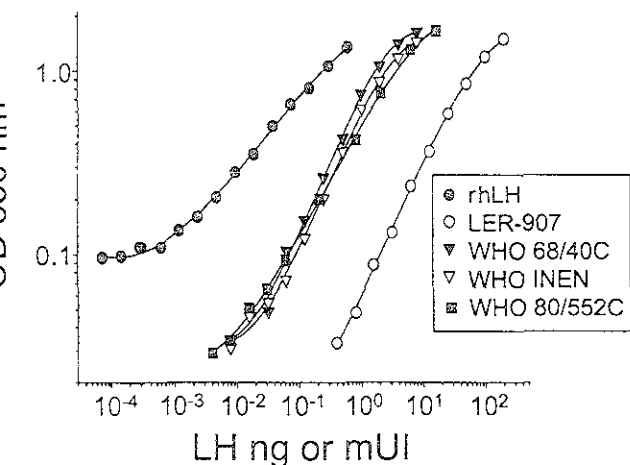


Figure 1. Representative dose-response curves of the different World Health Organization (WHO) LH standards, LER-907 and rhLH produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells in the WHO enzyme-linked immunoassay (EIA) system. OD = optical density.

Relative and half maximal responses (ED_{50}) and curve shape or steepness (slopes) were calculated. Relative potencies among the various preparations were calculated considering multiple points comprising the ED_{20} - ED_{80} interval.

Results

EIA of LH preparations

The dose-response curves of the different WHO standards, LER-907 and rhLH, in the LH EIA are shown in Figure 1. The profile of the dose-response curves elicited by the three WHO LH standards tested in the EIA system were superimposable and almost identical, simultaneous curve fitting of the dose-response curves revealed no significant differences among the slopes generated by the WHO LH standards (mean slope values: 1.27 ± 0.07 , 1.26 ± 0.07 and 1.13 ± 0.10 for WHO 68/40C, WHO INEN and 80/552C standards respectively; $n = 6$ EIA runs for each standard) and LER-907 (mean slope value 1.25 ± 0.07 ; $n = 6$). On the contrary, no parallelism was found between the curves generated by rhLH (mean slope value, 0.72 ± 0.08) and the WHO and LER-907 LH standards. This finding contrasted with the dose-response curve elicited by rhLH in the polyclonal antibodies-based radioimmunoassay, which was parallel with that of the LER-907 standard (Figure 2). The relative potency of each preparation tested in this LH EIA system is shown in Table I. The potency of LH contained in the WHO INEN standard was slightly higher than that of the WHO 80/552C standard and lower than that yielded by WHO 68/40C, the immunopotency of these two latter standards was nearly the same. According to this EIA system, the potency of the WHO standards was similar when expressed in terms of the LER-907 preparation and vice versa.

EIA of the FSH preparations

Representative dose-response curves elicited by the two WHO FSH standards, LER-907 and rhFSH, in the FSH EIA system are shown in Figure 3. Simultaneous curve fitting of the dose-response curves revealed no significant differences among the

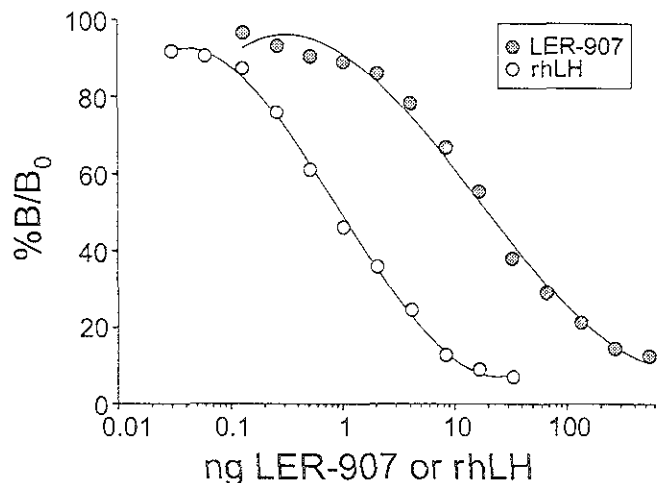


Figure 2. Representative dose-response curves elicited by rhLH produced in CHO cells and LER-907 in the LH radioimmunoassay. B/B_0 = Bound/Bound at dose zero.

Table I. Relative potencies (means and 95% confidence limits) of the different LH standards tested in the World Health Organization (WHO) LH enzyme-linked immunoassay (EIA) system

LH standard	68/40C (IU)	80/552C (IU)	INEN (IU)	LER-907 (μ g)
1 IU 68/40C	1	0.99 (0.92, 1.05)	1.16 (1.10, 1.20)	22.2 (21.6, 22.6)
1 IU 80/552C	1.04 (1.10, 0.97) ^a	1	0.84 (0.79, 0.88)	25.5 (24.2, 26.7)
1 IU INEN	0.882 (0.840, 0.910)	1.21 (1.15, 1.27)	1	23.5 (22.3, 24.7)
1 μ g LER-907	0.045 (0.044, 0.046)	0.040 (0.038, 0.042)	0.044 (0.041, 0.046)	1

^a95% confidence limits

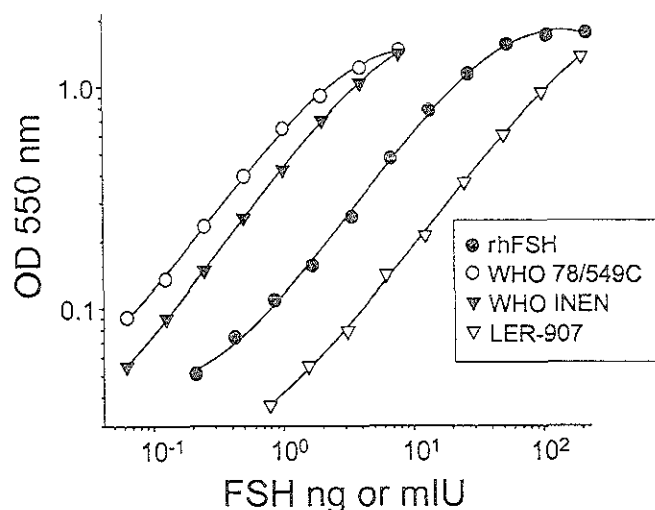


Figure 3. Representative dose-response curves of the different WHO FSH standards, LER-907 and rhFSH produced in CHO cells in the WHO EIA system.

slopes generated by the various preparations tested (mean slope values: 1.05 ± 0.05 , 1.07 ± 0.06 , 1.04 ± 0.04 and 1.12 ± 0.03 , for the 78/549C, WHO INEN, rhFSH and LER-907 standards respectively; $n = 6$ EIA runs for each preparation). On a weight-to-weight basis, rhFSH was approximately four times more potent than LER-907; the immunopotency of the FSH 78/549C kit standard was slightly higher than that of the WHO INEN standard when compared on a unit-to-unit basis (Table II).

Chromatofocusing of the LH and FSH standards and preparations

Figures 4 and 5 show the pH distribution pattern of immunoreactive LH and FSH after chromatofocusing of the various preparations analysed. As shown, each preparation contained two or more charge isoforms recovered within a pH window of 9.0 to 3.50 and 6.50 to 3.50 for the LH and FSH containing preparations respectively. In addition, all standards and prepara-

tions showed variable amounts of LH and FSH immunoreactivity in fractions corresponding to molecules bound at the low limiting pH, which were recovered after the addition of highly concentrated NaCl solution to the chromatofocusing column (salt peak). As depicted in Figure 4, the WHO 68/4 and 80/552C LH kit standards exhibited very similar charge distribution profiles; both standards contained negligible amounts (<3% of the total LH recovered) of LH molecule within the salt peak. In contrast, the WHO INEN, rhLH and LER-907 preparations presented a higher (6–16%) content of this strongly acidic LH species. Although the bulk (71–75% of total) of LH immunoreactivity in the WHO INEN standard and rhLH preparation was recovered at pH values <7, significant amounts of immunoreactivity (15–22% of total) were additionally detected at higher pH values; in fact, these two preparations presented the highest degree of charge heterogeneity (in terms of total number of LH components resolved by the charge-based separation technique employed). In general, LH contained in LER-907, rhLH and WHO INEN was more acidic than that present in the remaining WHO kit standards.

In the chromatofocusing system employed (pH window from 10.0 to <3.5), the bulk (<80% of total) immunoreactive FSH contained in the preparations analysed was recovered at pH values 5.20 to 3.50 and in the salt peak. Negligible amounts (<5%) of immunoreactive FSH material eluting at pH values 8.73 to 8.27 was consistently detected in the LER-907 standard (Figure 5). This latter preparation contained three major FSH charge isoforms that focused at pH values similar or close to those of the isoforms present in the WHO 78/549C standard. The elution profiles of rhFSH and the WHO INEN FSH standards were similar; both preparations exhibited a single broad

Table II. Relative potencies (means and 95% confidence limits) of the different FSH standards and preparations tested in the WHO FSH EIA system

FSH standard or preparation	78/549C (IU)	INEN (IU)	rhFSH (μ g)	LER-907 (μ g)
1 IU 78/549C	1	1.29 (1.21, 1.36)	9.86 (9.52, 10.20)	48.81 (47.20, 50.40)
1 IU INEN	0.80 (0.75, 0.84) ^a	1	8.28 (7.85, 8.70)	35.86 (33.80, 37.90)
1 μ g rhFSH	0.102 (0.099, 0.106)	0.124 (0.117, 0.130)	1	4.33 (4.16, 4.49)
1 μ g LER-907	0.021 (0.020, 0.022)	0.029 (0.027, 0.030)	0.234 (0.225, 0.243)	1

^a95% confidence limits

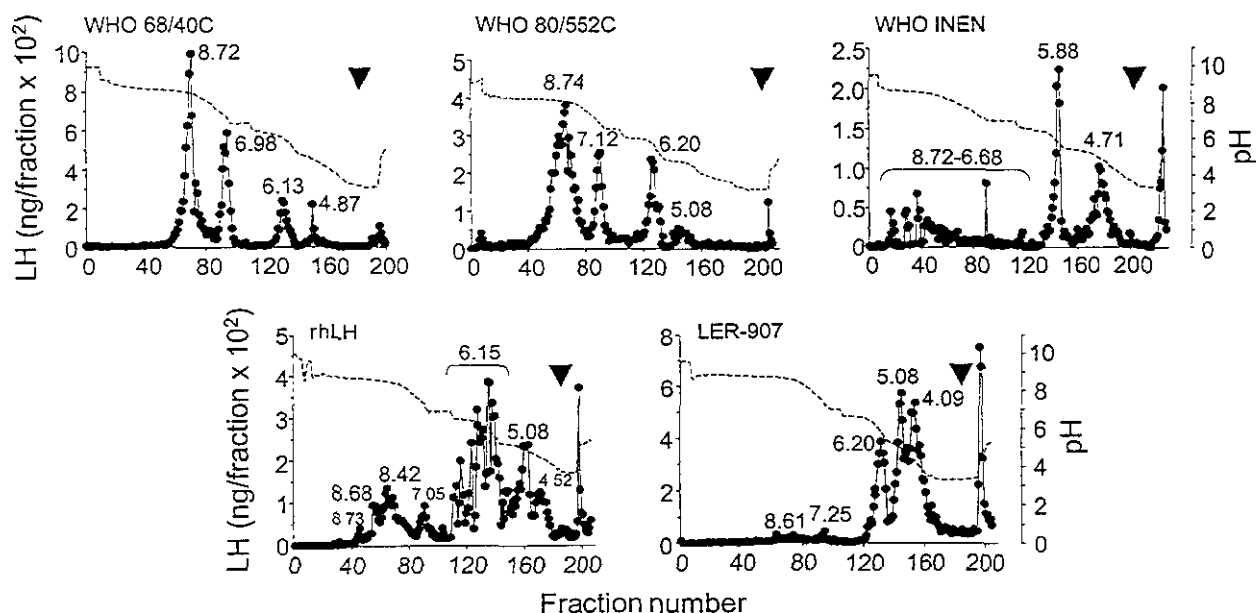


Figure 4. Representative profiles of pH distribution of immunoreactive LH after chromatofocusing of different LH standards and preparations. The elution pH value of the several isoforms present in each preparation are indicated. The arrowhead marks the addition of 1 mol/l NaCl to the chromatofocusing column.

H peak with a median pH value of 4.53–4.60 and a second large component recovered within the salt peak.

Discussion

Analysis of the dose-response curves of several LH standards and preparations in the EIA system, developed for the WHO International Programme of Research in Human Reproduction, revealed a close similarity among the curves elicited by WHO LH 68/40C, 80/552C and INEN standards. This agreement in dose-response curve profiles among the various WHO LH standards tested was in marked contrast with that exhibited by the rhLH preparation produced in CHO cells, whose absence of parallelism with the WHO and LER-907 curves was clearly noticeable. The non-parallelism exhibited by this particular preparation may be due either to vulnerability to matrix effects at low doses or to differences in molecular specificity of the matched monoclonal antibodies employed in this EIA system for the mixture of rhLH glycoforms contained in this particular preparation and that of the naturally occurring isoforms present in the preparations of pituitary origin. In fact, several differences in glycosylation exist between rhLH produced by CHO cells and pituitary LH: oligosaccharides in CHO cell-derived gonadotrophins are sialylated only in an $\alpha 2$ -mannose conformation, do not contain bisecting N-acetyl glucosamine residues and sulphated terminal glycosylation is missing (Hård *et al.*, 1990; Rafferty *et al.*, 1995; Amoresano *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1996). In addition, it is known that CHO cells have a limited ability to introduce complex branched carbohydrate structures onto the protein core in comparison with the naturally producing cells, the gonadotrophs (Hård

et al., 1990; Harris *et al.*, 1998). Several lines of evidence indicate that differences in glycosylation may affect the reactivity of glycoprotein towards certain antibodies (Papandreou *et al.*, 1990, 1991; Labbe-Julie *et al.*, 1992; Zerfaoui and Ronin, 1996). For example, removal of sialic acid from pituitary thyrotropin specifically abolished the binding of this natural glycoprotein to anti- β monoclonal antibodies (Zerfaoui and Ronin, 1996) and its deglycosylation led to a five-fold reduction in immunoreactivity toward certain anti- β polyclonal antibodies (Papandreou *et al.*, 1990). In the present study, the behaviour of rhLH in the WHO EIA contrasted with that exhibited in the radioimmunoassay, in which rhLH displaced 125 I-labelled LH from the antibody in a fashion similar to that shown by the pituitary-derived LER-907 standard, thus emphasizing the importance of the particular antibody configuration employed for determining the immunoreactivity of recombinant DNA-derived preparations. The overall data indicate that recombinant human LH produced by CHO cells is not a suitable preparation for use as the calibration standard in this particular monoclonal antibody-based EIA system and that all other WHO LH standard preparations tested may be indistinctly employed without significant variations in the final concentration results of the unknown samples.

In contrast to the set of LH preparations tested in the EIA system, the dose-response curves elicited by both the recombinant and pituitary FSH preparations were parallel to each other. Thus, differences in glycosylation between the CHO cell-derived preparation and the pituitary standards did not apparently influence to a considerable extent the reactivity of the former preparation toward the set of monoclonal antibodies employed in this FSH EIA system. Although the

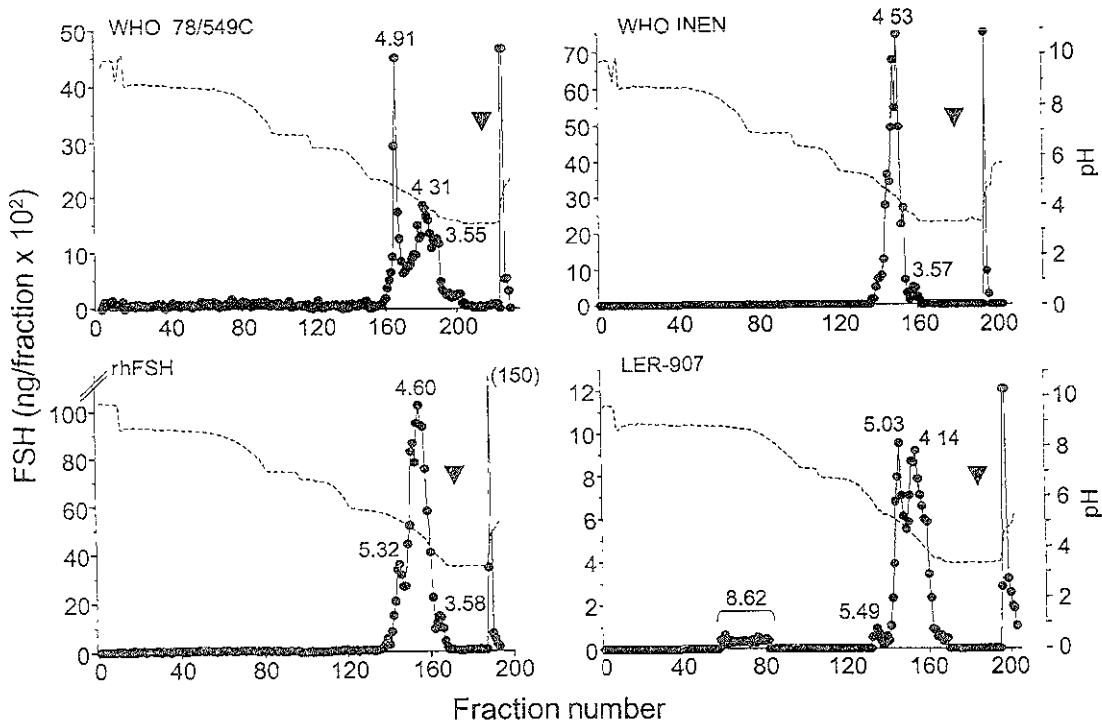


Figure 5. Representative profiles of pH distribution of immunoreactive FSH after chromatofocusing of different FSH standards and preparations. The elution pH value of the several isoforms present in each preparation are indicated. The arrowhead marks the addition of 1 mol/l NaCl to the chromatofocusing column.

present study does not unambiguously resolve whether the monoclonal antibodies employed reacted equally with all FSH preparations tested, the profile of the dose-response curves elicited by the four preparations indicates that all preparations may be used as calibration standards at least in this particular human FSH EIA.

All LH preparations exhibited a high degree of charge heterogeneity. In particular, the pH distribution profile exhibited by rhLH, LER-907 and the WHO INEN LH preparations was more acidic than that of the WHO 68/40C and 80/552C standards; these differences may be due to selective removal of the more or less basic isoforms during the purification procedures as well as to cell-specific (gonadotrophs and CHO cells) particularities in post-translational processing of the gonadotrophin molecule (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a). Interestingly, despite the marked differences in charge distribution between the WHO 68/40C and 80/552C preparations and the WHO INEN standard, their behaviour in the EIA system was remarkably similar as disclosed by their superimposed dose-response curves. This observation suggests that variability in distribution and/or conformation of terminally charged sugars in the isoforms contained in these pituitary preparations does not greatly influence their reactivity towards the particular antibodies employed by the EIA system. On the contrary, it appears that the high abundance of sialic acid attached exclusively in α 2,3 position and the complete absence of sulphate residues in the acidic rhLH molecules (which conform the bulk of immunoreactive material present in this preparation) influenced the reactivity of the monoclonal antibodies for this compound.

As previously reported, all FSH preparations tested exhibited a predominantly acidic pH distribution profile with the bulk of FSH immunoactivity recovered at elution pH values ≤ 5.0 . The charge distribution profile of all these FSH preparations varied considerably from that previously reported for FSH in crude pituitary extracts and serum, in which 10–25% of total FSH may be recovered at elution pH values > 4.50 (Simoni *et al.*, 1994; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995a,b; Zambrano *et al.*, 1995; Anobile *et al.*, 1998). In a previous study employing this particular EIA system, it was observed that the intrapituitary FSH isoforms with pH values 6.60 to < 3.80 elicited parallel dose-response curves whereas the less acidic/sialylated form (pH > 7.10) could not be accurately quantified due to significant non-concordance between this isoform and the corresponding standard curve (LER-907) (Zambrano *et al.*, 1996). How this reduced reactivity of the monoclonal antibodies of this EIA toward the less acidic FSH isoforms may affect the accuracy of the concentrations of FSH in serum is not known. It must be emphasized, however, that the abundance of this particular isoform in serum is extremely low and thus its presence in the mixture of variants released from the pituitary may be irrelevant at least in physiological conditions.

In summary, with the exception of rhLH produced in CHO cells, all LH and FSH preparations tested in the EIA systems provided by the WHO Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Immunoassay of Hormones (currently distributed through the non-profit organization Immunometrics Ltd, London, UK) elicited dose-response curves which were

parallel to each other across a wide range of concentration values. Although variations in purity and concentration of the various gonadotrophin preparations do not allow accurate establishment of the exact degree of cross-reactivity of monoclonal antibodies employed in these EIA kits toward standards tested, all the pituitary-derived preparations as well as rhFSH produced by CHO cells seem appropriate for use as calibration standards in this particular immunometric system. The impact of the differences in mixture of gonadotrophin isoforms between these particular preparations and the human serum on the accuracy of measurements of LH and FSH in serum samples by this and other immunometric assay systems is an issue that deserves to be scrutinized carefully.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr A.F. Parlow and the NIDDK National Hormone and Pituitary Program for the human FSH and LH radioimmunoassay reagents and to the WHO Centre for Research and Reference Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction, London, UK, for providing the LH and FSH reagents. This study received financial support from the Laboratory Methods Group, Human Reproduction Programme, WHO, Geneva, Switzerland and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), grant Z8589N), Mexico, D.F., Mexico.

References

- Amoresano, A., Siciliano, R., Orru, S. *et al.* (1996) Structural characteristics of human recombinant glyco hormones follitropin, lutropin and chorionic gonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells *Eur J. Biochem.* **242**, 608–618.
- Anobile, C.J., Talbot, J.A., McCann, S.J. *et al.* (1998) Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 631–639.
- Burgon, P.G., Stanton, P.G., Petterson, K. and Robertson, D.M. (1997) Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity *in vivo*, radioreceptor activity and immunoactivity. *Reprod. Fertil. Dev.*, **9**, 501–508.
- Castro-Fernández, C., Olivares, A., Söderlund, D. *et al.* (2000) Preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological-to-immunological ratio of gonadotrophin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone (LH) in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, in press.
- Chappel, S.C. (1995) Heterogeneity of follicle stimulating hormone: conformation and physiological function. *Hum. Reprod. Update*, **1**, 479–487.
- Chappel, S.C., Bashay, H.M. and Snyder, P.J. (1986) Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **113**, 311–316.
- Costaghiola, S., Niccoli, P. and Carayon, P. (1994a) Glycoprotein hormone isomorphism and assay discrepancy. *J. Endocrinol. Invest.*, **17**, 291–295.
- Costaghiola, S., Niccoli, P., Fiorentino, M. *et al.* (1994b) European collaborative study of luteinizing hormone assay: 1. Epitope specificity of luteinizing hormone monoclonal antibodies and surface mapping of pituitary urinary luteinizing hormone. *J. Endocrinol. Invest.*, **17**, 397–406.
- Costaghiola, S., Niccoli, P., Fiorentino, M. *et al.* (1994c) European collaborative study on luteinizing hormone assay: 2. Discrepancy among assay kits related to variation both in standard curve calibration and epitope specificity of kit monoclonal antibodies. *J. Endocrinol. Invest.*, **17**, 407–416.
- De Lean, A.P., Munson, P.J. and Rodbard, R. (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand binding and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.*, **235**, E97–E102.
- Hård, K., Melking, A., Damm, J.B.L. *et al.* (1990) Isolation and structural determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J. Biochem.*, **193**, 263–271.
- Harris, S.D., Anobile, C.J., McLoughlin, J.D. *et al.* (1998) Internal carbohydrate complexity of the oligosaccharide chains of recombinant human follitropin.

- ulating hormone (Pregon[®], Org 32489) a comparison with Metrodin and Metrodin-HP *Mol Hum Reprod.*, **2**, 807–811
- ate, S.L. (1993) Analytical and clinical significance of peptide hormone heterogeneity with particular reference to growth hormone and luteinizing hormone in serum. *Clin Endocrinol.*, **38**, 113–121
- de-Julie, C, Sergi, I, Canonne, C. *et al* (1992) Comparative mapping of human thyrotropin, gonadotropin and free subunits with antipeptide antibodies *Endocrinology*, **131**, 1999–2009
- bert, A., Talbot, J.A., Anobile, C.J. and Robertson, W.R. (1998) Gonadotrophin heterogeneity and biopotency implications for assisted reproduction *Mol Hum Reprod.*, **4**, 619–629
- in-Du-Pan, R.C., Horak, M. and Bischof, P. (1994) Clinical significance of invisible or partially visible luteinizing hormone *Hum Reprod.*, **9**, 87–1990.
- ve, W., de Boer, W., Mulders, J.W.M. *et al* (1996) Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Pregon[®]) *Mol Hum Reprod.*, **2**, 371–382
- er, R.L., Kane, J.W., Waite, A. *et al* (1999) Do immunoassays differentially detect different acidity glycoforms of FSH? *Clin Endocrinol (Oxf)*, **51**, 61–686
- andreou, M., Sergi, I., Benkirane, M. *et al* (1990) Carbohydrate dependent epitope mapping of human thyrotropin. *Mol Cell Endocrinol.*, **73**, 15–26.
- andreou, M., Sergi, I., Medin, C. *et al* (1991) Differential effect of glycosylation on the expression of antigenic and bioactive domains in human thyrotropin *Mol Cell Endocrinol.*, **78**, 137–150
- erson, K. and Soderholm, R.M.J. (1991) Individual differences in lutropin immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies *Clin Chem.*, **37**, 333–340
- erson, K., Ding, Y-Q. and Huhtaniemi, I. (1991) Monoclonal antibody-based discrepancies between two-sites immunometric test for lutropin. *Clin Chem.*, **37**, 1745–1748.
- erty, B., Mower, J.A., Ward, H.L. *et al* (1995) Differences in carbohydrate composition of FSH preparations detected with lectin-ELISA systems *Endocrinol.*, **145**, 527–533
- elato M.G., Garcia-Rudaz, M.C., Castro-Fernández, C. *et al* (1999) A reponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies appropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome *J Clin Endocrinol Metab.*, **84**, 4629–4636
- oni, M., Jockenhovel, F. and Nieschlag, E. (1993) Biological and immunological properties of the international standard FSH 83/575. Isoelectrofocusing profile and comparison with other FSH preparations *Acta Endocrinol (Copenh)*, **128**, 281–288
- oni, M., Jockenhovel, F. and Nieschlag, E. (1994) Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species *J Endocrinol.*, **141**, 359–367
- rring, P.L. and Gaines Das, R.E. (1989) The international standard for pituitary FSH: collaborative study of the standard and of four other purified human FSH preparations of differing molecular composition by bioassays, receptor assays and different immunoassay systems *J Endocrinol.*, **123**, 275–293
- rring, P.L. and Gaines Das, R.E. (1993) The second international standard for human pituitary LH: its collaborative study by bioassays and immunoassays *J Endocrinol.*, **138**, 345–359
- rring, P.L., Bangham, D.R., Cotes, P.M. *et al* (1978) The international reference preparation of human pituitary luteinizing hormone for immunoassay *Acta Endocrinol (Copenh.)*, **88**, 250–259.
- oot, J.A., Mitchell, R., Hoy, A.M. *et al* (1996) Recombinant human luteinizing hormone: a partial physicochemical, biological and immunological characterization. *Mol Hum Reprod.*, **2**, 799–806.
- lor, A.E., Khoury, R.H. and Crowley, W.F. (1994) A comparison of 13 different immunometric assay kits for gonadotropins: implications for clinical investigation *J Clin Endocrinol Metab.*, **79**, 240–247
- ossi, C., Barrios de Tomasi, J., Zambrano, E. *et al* (1998) A naturally occurring basicly charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity *in vitro Neuroendocrinology*, **67**, 153–163.
- oa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P. *et al* (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone *Hum Reprod.*, **7**, 23–30
- Ulloa-Aguirre, A., Zambrano, E., Timossi, C. *et al* (1995a) On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. A search into the immunological and biological attributes and the molecular composition of two preparations of urofollitropin *Arch. Med. Res.*, **26S**, 219–230
- Ulloa-Aguirre, A., Midgely, A.R. Jr, Bertins, I.Z. *et al* (1995b) Follicle-stimulating isohormones. Characterization and physiological relevance. *Endocr Rev.*, **16**, 765–787
- Vermes, I., Bonte, H.A., Sluijs Veer, G. and Schoemaker, J. (1991) Interpretations of five monoclonal immunoassays of lutropin and follitropin: effects of normalization with WHO standard. *Clin Chem.*, **37**, 415–421
- WHO Collaborating Centre for Research and References Services in the Immunoassay of Hormones in Human Reproduction (1994) *Annual Technical Report to the Human Reproduction Programme*. WHO, Geneva.
- Zambrano, E., Olivares, A., Mendez, J.P. *et al* (1995) Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.*, **80**, 1647–1656
- Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., Cárdenas, M. *et al* (1996) Studies on the relative *in-vitro* biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone *Mol. Hum Reprod.*, **2**, 463–571
- Zerfaoui, M. and Ronin, C. (1996) Glycosylation is the structural basis for changes in polymorphism and immunoreactivity of pituitary glycoprotein hormones *Eur. J. Clin Chem. Clin. Biochem.*, **34**, 749–753.

Received on March 16, 2000; accepted on August 7, 2000