

179
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS DE UNION AL RECEPTOR DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE HUMANA (hFSH) EN DIFERENTES TIPOS CELULARES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
TERESA DE JESUS ZARIÑAN GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

260147



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

ESTUDIOS DE UNION AL RECEPTOR DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE HUMANA (hFSH) EN DIFERENTES TIPOS CELULARES

realizado por TERESA DE JESUS ZARIÑAN GARCIA

con número de cuenta 8715763-7 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ

Propietario

DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES

Propietario

M.EN C. CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA

Suplente

DR. IGNACIO CAMACHO-ARROYO

Suplente

M.I.B.B. SAUL CANO COLIN.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
LABORATORIO DE MECANISMOS DE ACCION HORMONAL II;
EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION,
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN;
BAJO LA DIRECCION DE LA Dra. ELENA ZAMBRANO GONZALEZ.

AGRADEZCO A TODO EL PERSONAL DEL DEPTO. DE BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION POR LAS FACILIDADES PRESTADAS PARA
LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO; EN ESPECIAL A LOS
INTEGRANTES DEL LAB. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL II.

DEDICATORIA

Al Sr. Gonzalo Zariñán:

Porque siempre me dijiste que esto iba a ser la única herencia que me ibas a dejar, y no podías haberme dado una mejor, y sobre todo por ser mi padre. Mil gracias.

A la Sra. Teresa García:

Por tu apoyo y confianza, porque aún en los momentos de locura supiste que este era el mejor camino, y por ser mi madre. No tengo con que pagarte, simplemente puedo decirte ¡GRACIAS!

A Imelda, Ernesto, Ernesto y Claudia:

Por las copias y el apoyo que siempre brindaste; por las largas horas de plática con las que pude constatar que esta era mi mejor elección; por las preguntas que no pude responder, que me hicieron comprender que tenía que esforzarme todavía más; y por que ojalá comprendas que la vida está hecha de sacrificios, y que debes de luchar por alcanzar algún día tus propias metas.

A Virginia, Karina, Daniela y Alejandra:

Porque en el principio de esta travesía, tú fuiste la primera en estar presente; porque en algunas ocasiones me permiten penetrar en su pequeño mundo.

A Magdalena, Gerardo y Gerardo:

Por la computadora y porque tu casa siempre fue un buen refugio.

A Patricia, Gerardo y Alison:

Por que un día me impusiste un reto y me prometí que iba a luchar por alcanzarlo, por la enseñanzas buenas y malas.

A Gonzalo y Gonzalo Jr.:

muchas gracias por estar allí.

A Maru e Itzayana:

Por las largas noches de insomnio en la que compartía contigo mis dudas y temores, mis preguntas y anhelos y sobretodo por compartir conmigo tal vez sin saberlo tu mayor tesoro: ITZA; por ser un aliciente para luchar día con día.

A mis amigos:

Mireya, Rosa, Sandra, Omar, Arturo, Consta, Osvaldo, Chucho y Roberto, porque con cada uno he compartido momento importantes de mi vida, por que me han enseñado que la amistad se puede conservar aún en la distancia y el tiempo, por escucharme, por sus consejos y sobretodo por aceptarme como soy.

A Rosalina:

Porque en los últimos momentos estuviste allí incondicionalmente; la cuesta final fue más sencilla con tu ayuda, por estar en los momentos en que necesito un verdadero amigo, por permitirme ser tu amiga, por enseñarme que la vida es sólo un momento y que hay que disfrutarlo plenamente.

A todos aquellos que de alguna manera han formado parte de mi vida y de los cuales no recuerdo ahora los nombres, gracias por sus enseñanzas, en ocasiones buenas, otras malas.

A las personas que dudaron que este sueño podía ser realidad.

A lo que pudo haber sido y no fue, a los sueños truncados, a lo desaparecido.

A Chayo, Angélica, Conie, Juan Manuel y todos aquellos que hicieron más agradable la vida en la Facultad.

A DIOS:

Por que aún en mi pobre concepción de él, me permite descubrir en una mínima parte lo maravilloso de su creación.

A tí:

Por tu amor, confianza y apoyo, porque aún en la distancia y el tiempo logramos en algunos momentos mantener este amor. Porque a tu lado el camino fue más sencillo, por los libros, las lecciones, las preguntas y los sueños que algún día forjamos juntos, por los retos que me impusiste, por esto y por mucho más, pero principalmente porque te amo y te amaré siempre. Gracias Dielo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para la Dra. Elena Zambrano González, por su confianza, porque gracias a ella descubrí el mundo maravilloso de la investigación, por su apoyo y enseñanzas, por su regaños que me hicieron esforzarme cada día más, por esto y por muchas cosas más, sólo me resta decir: ¡MIL GRACIAS!, sin tu ayuda este sueño hubiera sido más difícil.

Al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre, por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio a su cargo.

A la M. en C. Aleida Olivares, por haberme aceptado en un primer momento, porque gracias a esto pude entrar en un mundo fascinante para mí como lo es la investigación, por las cosas compartidas hasta este momento.

A la Biol. Jorgelina Barrios, por tus consejos, por escucharme y por tu ayuda.

A la Biol. Cecilia Castro, porque lo que no sucedio en cuatro años en la facultad, la casualidad de encontrarnos aquí nos llevó a una amistad.

INDICE

	Páginas
RESUMEN _____	3
INTRODUCCION _____	4
ANTECEDENTES _____	6
ESTRUCTURA DE LA FSH. _____	6
SINTESIS DE LA FSH. _____	9
FUNCIONES DE LA FSH. _____	12
MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH. _____	15
RECEPTOR DE LA FSH _____	18
ISOFORMAS DE FSH Y SU RECEPTOR. _____	23
OBJETIVO _____	24
HIPOTESIS _____	25
MATERIAL Y METODOS. _____	26
EXTRACTOS HIPOFISIARIOS. _____	26
Separación de las isoformas de hFSH de los extractos hipofisarios por cromatoenfoque. _____	26
RIA de hFSH. _____	29
CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE RIÑÓN FETAL HUMANO TRANSFECTADAS CON EL RECEPTOR RECOMBINANTE PARA hFSH. _____	31
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE RATA. _____	31
OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE TESTÍCULO. _____	31

ENSAYO DE UNIÓN AL RECEPTOR	32
ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE RADIOMARCAJE DE hFSH-1-3 CON NaI¹²⁵	34
Radiomarcaje de hFSH por el método de lactoperoxidasa.	34
Radiomarcaje de hFSH por el método de Cloranina T.	34
Radiomarcaje por el método de Iodogen.	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
RESULTADOS	39
SEPARACIÓN POR CF DE LAS ISOFORMAS DE hFSH HIPOFISIARIAS	39
CUANTIFICACIÓN INMUNORREACTIVA DE LOS CONCENTRADOS HIPOFISIARIOS DE LAS ISOFORMAS DE hFSH	41
ENSAYOS DE UNIÓN AL RECEPTOR	42
Estandarización de radiomarcaje de hFSH con NaI ¹²⁵	42
Curvas de competencia y desplazamiento y comparación de unión entre las isoformas.	43
Relación RRA/I en los diferentes tipos celulares.	46
DISCUSION	50
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55

RESUMEN

La hormona estimulante del folículo (FSH) de diversas especies de animales, incluyendo al humano, es producida y secretada en múltiples formas moleculares. Las variantes o isoformas de la FSH difieren entre sí en su abundancia relativa y en sus propiedades biológicas. En el presente estudio se comparó la unión al receptor de las diversas isoformas hipofisarias de FSH humana (hFSH), utilizando diferentes sistemas celulares. La obtención de las isoformas hipofisarias de hFSH se realizó por el método del cromatofoco (intervalo de pH de 7.40 a 3.80); las isoformas aisladas fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA). Los ensayos de unión al receptor se realizaron en células de la granulosa de rata, membranas de testículo de rata y células transfectadas con el receptor recombinante para la hFSH (293-hFSHR).

En los radiorreceptores realizados en células de la granulosa de rata y membranas de testículo, las isoformas menos ácidas presentaron una mayor unión al receptor y por consiguiente una mayor relación radioreceptor/inmunorreactividad (RRA/I), comparadas con las isoformas más ácidas, las cuales tuvieron una menor unión al receptor. Sin embargo para los ensayos de unión al receptor realizados en las células 293-hFSHR, no se encontró una correlación entre el pH de elución de las isoformas y su unión al receptor ya que las diferentes isoformas de hFSH presentaron unión similar.

Estos resultados sugieren que para la unión al receptor interviene tanto la naturaleza y la estructura química del receptor como el tipo de isoforma de FSH. Es probable que la ausencia de correlación entre el pH de la isoforma y la relación RRA/I en las células 293-hFSHR se debe a que en estas células únicamente existe una población homogénea de receptores, los cuales poseen igual afinidad por las distintas isoformas de FSH.

INTRODUCCION

Los seres vivos se encuentran sujetos a diferentes modificaciones inducidas tanto por su entorno exterior como por su medio interno; es por eso que cuentan con mecanismos de control que les permiten regular su equilibrio fisiológico. En los mamíferos, el proceso de la reproducción abarca múltiples eventos en el que participan varios sistemas biológicos del organismo, entre ellos el sistema neuroendócrino. Un órgano que juega un papel muy importante en la regulación del fenómeno reproductivo es el hipotálamo, el cual sintetiza y secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que a su vez estimula a la hipófisis para que sintetice y secrete a las gonadotropinas hipofisarias: la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

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

La FSH no es una glicoproteína de composición única, ya que se sintetiza y secreta en múltiples formas moleculares o isoformas. Estructuralmente, éstas son diferentes en su patrón de glicosilación. Bioquímicamente cada una de ellas tiene propiedades físicoquímicas y biológicas particulares.

Las gonadotropinas ejercen sus efectos en las células blanco a través de la unión con receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática de dichas células. El receptor de la FSH pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, que se caracterizan por tener una región extracelular amino terminal muy larga, una región con 7 dominios transmembranales y una parte intracelular carboxilo terminal. Al unirse la FSH a su receptor se activa principalmente la vía de la adenilato ciclasa, teniendo como segundo mensajero al AMPc, el cual activa a la PKA (cinasa de

proteínas A), la cuál induce la fosforilación de diferentes proteínas y enzimas. En su forma fosforilada algunas enzimas son activadas y otras desactivadas, canalizando su efecto en diferentes rutas metabólicas.

Existen estudios que han demostrado que la unión al receptor de las isoformas de FSH humana (hFSH) varía dependiendo de los carbohidratos adicionados a la molécula base. Por otro lado, se han encontrado distintos transcritos del RNAm del receptor de FSH. Estos hallazgos pueden tener importantes implicaciones con respecto a la naturaleza de la interacción hormona-receptor y el subsecuente mecanismo de la transducción de señal.

La variedad de isoformas de FSH puede inducir a una gran diversidad de respuestas al unirse a su receptor, por lo tanto es de suponer que la vía de transducción de señal de dichas isoformas puede dar muy diferentes respuestas celulares.

En la presente tesis se comparó la unión al receptor de las isoformas de la hFSH hipofisaria en diferentes tipos celulares.

ANTECEDENTES

Una de las cualidades específicas de los seres vivos es la capacidad que tienen de reproducirse. En los mamíferos, la reproducción comprende una serie de mecanismos sumamente complejos en la cual están relacionados dos sistemas: el nervioso y el endócrino, cada uno con funciones muy específicas. Existe un órgano neuroendócrino que juega un papel muy importante en la regulación del fenómeno reproductivo: el hipotálamo, él cuál se encarga de la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)⁽¹⁾. Una vez que esta alcanza la circulación porta-hipofisiaria, es transportado hacia la hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y secreción de las hormonas glicoproteicas hipofisiarias: hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)⁽²⁾.

ESTRUCTURA DE LA FSH.

Las hormonas hipofisiarias FSH, LH y estimulante de la tiroides (TSH), así como la gonadotropina coriónica (CG), proveniente de la placenta, pertenecen a una misma familia de glicoproteínas. Estas hormonas son moléculas grandes y complejas con un peso molecular entre 28 y 38 kDa. En el caso de la FSH es de 30 kDa aproximadamente. Están formadas por dos cadenas polipeptídicas, la subunidad α y la subunidad β , asociadas de manera no covalente, dicha unión es de alta afinidad, lo que da estabilidad a la estructura cuaternaria del dímero⁽³⁾. La cadena α es idéntica en las 4 hormonas y es codificada por un solo gen⁽⁴⁾, mientras que la β es codificada por diferentes genes y es la que les confiere especificidad biológica e inmunológica⁽⁵⁾, ya que esta subunidad es

diferente en composición de aminoácidos en las cuatro glicoproteínas, teniendo algunas regiones con alta homología^(3,6,7), las cuales probablemente estén relacionadas en la interacción de cada una de las β con la α común. La cadena α tiene 10 residuos de cisteínas y la cadena β posee 12, que forman puentes disulfuros, cinco en la α y seis en la β , lo que contribuye a la estabilización de la estructura tridimensional de la proteína. Estas regiones de cisteínas están muy conservadas entre las diferentes β y entre las distintas especies, lo que sugiere una estructura tridimensional similar entre las hormonas. La subunidad α contiene la mayoría de los sitios de reconocimiento del receptor de la célula blanco, la β adquiere su conformación únicamente cuando está en combinación con la α .

Existen numerosos estudios sobre la secuencia de aminoácidos (aa) en diversas especies animales, incluyendo la humana, la cual tiene de 92 a 96 aa en la subunidad α con dos sitios de N-glicosilación localizados en la posición Asparagina (Asn) 52 (o 56) y Asn 78 (u 82), mientras que la subunidad β esta compuesta por 111-112 aa y tiene dos sitios de glicosilación en las posiciones Asn 6,7 o 13 y Asn 23,24 o 30^(3,4,5,8-10). En todos los oligosacáridos unidos a Asn, existe una estructura central común (N-acetilglucosamina)₂-(Manosa)₃₍₁₁₎ (Fig. 1). Las características químicas generales de la molécula de FSH incluyen además la localización de oligosacáridos en sitios específicos de ambas subunidades. Dichos oligosacáridos son: manosa, fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico (NANA). La estructura de los oligosacáridos en la FSH es altamente variable y estos juegan un papel importante para determinar las características y propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de la hormona que en última instancia constituyen la base de su heterogeneidad molecular^(12,13). El ácido siálico terminal protege a la molécula de la acción degradativa de las enzimas hepáticas, por esta razón, su presencia es de suma importancia en la regulación de la vida media de la hormona en la circulación⁽¹¹⁾. La

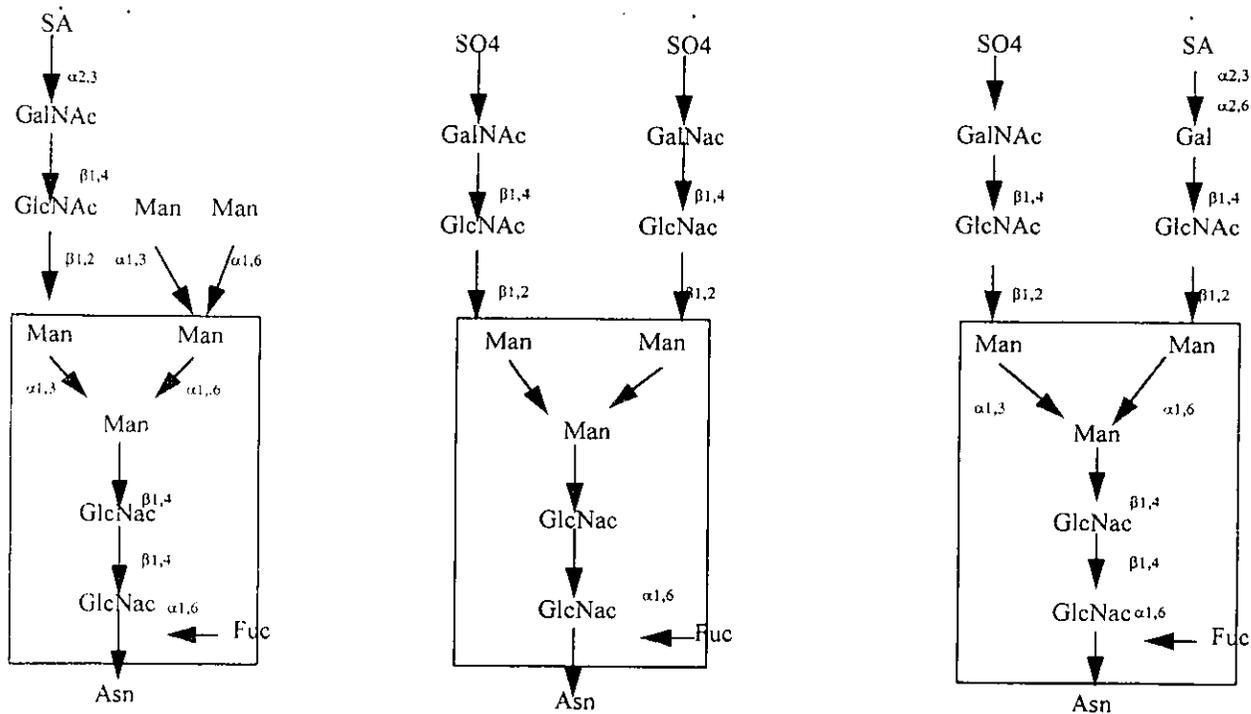


Fig. 1 Estructura de oligosacáridos unidos a Asn de las glicoproteínas.

∞



Estructura central común.

- Man Manosa
- GlcNAc N-acetil glucosamina
- GalNAc N-acetil galactosamina
- SA Acido siálico
- SO4 Grupo sulfato
- Asn Asparagina

remoción del ácido siálico de la FSH humana (hFSH) con tratamientos enzimáticos, disminuye la actividad biológica *in vivo* de la hormona, al reducir su vida media en el plasma⁽¹²⁻¹⁴⁾. La deglicosilación total de la FSH mediante tratamientos químicos, no altera la capacidad de la hormona para unirse a su receptor, sin embargo, reduce la estimulación de la producción de 3'-5' adenosín monofosfato cíclico (AMPC), y por lo tanto, disminuye sus efectos biológicos. Se ha observado que si la subunidad α es deglicosilada y la β se mantiene intacta, ocurre la producción de AMPC, lo que demuestra la importancia de los carbohidratos en la subunidad β para la inducción de la respuesta⁽¹⁵⁾.

SINTESIS DE LA FSH.

La FSH y la LH son sintetizadas y secretadas por la misma población de células de la adenohipófisis, conocidas como gonadotropos hipofisarios. Las subunidades que constituyen la FSH, se sintetizan independientemente una de la otra.

La biosíntesis de las subunidades de las gonadotropinas ocurre por el proceso usual de ensamblaje ribosomal de las cadenas peptídicas, seguido de modificaciones post-traduccionales de las cadenas sintetizadas, antes de su secreción. Las cadenas proteínicas recién sintetizadas representan formas inmaduras ya que no están glicosiladas y cuentan además con un pequeño fragmento peptídico líder o señal. El procesamiento de la forma inmadura de las subunidades a su estado maduro involucra rompimiento del péptido señal y la glicosilación. Ambos eventos requieren de la presencia de enzimas unidas a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y al aparato de Golgi (AG), y ocurren conforme se va formando la cadena polipeptídica

y es translocado al RER (cambios co-traduccionales) o conforme la hormona sigue la ruta de síntesis y secreción (cambios post-traduccionales)⁽¹⁶⁾.

Mientras que la cadena proteínica reside aún en los polisomas unidos a la membrana del RER, enzimas microsomales rompen la secuencia líder; esto permite que dicha cadena cruce la membrana hacia las cisternas del RER. Asimismo, se forman puentes disulfuro en el péptido. La transferencia de oligosacáridos a las Asn blanco (dicha Asn debe estar en la siguiente secuencia: Asn-X-Treonina ó Asn-X-Serina, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina), se lleva a cabo en el lumen del RER; la enzima que cataliza este evento es una proteína de membrana (oligosacariltransferasa), que tiene su sitio expuesto sobre la superficie luminal⁽¹¹⁾. Los azúcares son primero activados en el citosol por la formación de intermediarios azúcar-nucleótidos, los cuales donan sus carbohidratos (directa o indirectamente). El oligosacárido está preformado en su totalidad con 14 residuos de monosacáridos y está unido a un lípido (dolicol) que se encuentra en la membrana del RER, y éste lo une a las Asn blanco de la proteína en síntesis en un solo paso enzimático después de que el residuo pasa de la membrana del RER al lumen. La transferencia está acoplada a una reacción donde el rompimiento de pirofosfato libera la energía necesaria para que se lleve a cabo la unión. Inmediatamente después, tres residuos de glucosa y uno de manosa son removidos de la estructura central común recién adherida. Posteriormente se lleva a cabo el transporte vesicular de dicha glicoproteína desde el RER hasta el AG, en donde termina su maduración⁽¹⁶⁾.

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

Una vez terminado el procesamiento, las glicoproteínas se empaquetan en vesículas de secreción que las protegen de la proteólisis y se transportan hacia la periferia celular

mediante la intervención de proteínas motoras asociadas a los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Al llegar a la membrana plasmática se fijan a ella⁽¹⁷⁾. La secreción de FSH ocurre por estímulo de la GnRH hipotalámica. Cuando la GnRH se une a sus receptores específicos en el gonadotropo induce la exocitosis de FSH, lo cual se logra gracias a la fusión de la membrana celular con los gránulos secretores, permitiendo así la liberación de su contenido hacia el espacio perivascular.

La secreción de la FSH está regulada y modulada por la GnRH, quien a su vez está regulada mediante diferentes mecanismos como algunos factores gonadales de naturaleza esteroidea (estrógenos, progestágenos y andrógenos). Estos esteroides se unen a receptores intracelulares específicos en las células de la hipófisis e influyen directamente en la secreción de gonadotropinas⁽¹⁸⁾.

También se han relacionado con el control de la síntesis y secreción de la FSH a otras hormonas diferentes a los esteroides gonadales, estas incluyen a las proteínas ováricas como las inhibinas y la activina. La inhibina es un heterodímero formado por una cadena α y una β , unidas por puentes disulfuro, su función es la supresión selectiva de la secreción de la FSH; la activina está formada por dos cadenas β de inhibina, tiene el efecto opuesto a esta última, tanto en la secreción hipofisiaria de FSH como en la función del ovario^(19,20,21). Otro péptido gonadal supresor de la FSH que se ha aislado es la folistatina, la cual es una glicoproteína formada por una cadena única, que actúa como una proteína que se une a la activina, impidiendo su acción⁽²²⁾.

Los gonadotropos sintetizan una mayor cantidad de subunidad α en comparación con las concentraciones de la cadena β . Tanto en la hipófisis, como en la circulación, las concentraciones de la subunidad β son relativamente más bajas que la de la α , por lo tanto parece que la formación de las cadenas β podría ser un paso limitante en la biosíntesis de las hormonas glicoproteicas⁽¹⁸⁾. Por esta razón se asume que la influencia

de hormonas esteroideas y factores no esteroideos (inhibina y activina) sobre la producción de la FSH es a través de alteraciones en la síntesis de la subunidad β ₍₁₇₎.

FUNCIONES DE LA FSH.

De manera general, la función primaria de la FSH es la regulación del crecimiento y maduración folicular en la mujer y de la espermatogénesis en el hombre₍₁₁₎.

Función en el ovario.

La FSH es la hormona responsable de la regulación de aquellos procesos relacionados con el desarrollo de las células germinales en las gónadas; en el ovario está relacionada en varios procesos como la maduración folicular, prevención de la atresia folicular, la inducción de la aromatasa, la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa y la inducción de la formación de receptores para LH₍₂₃₎.

La principal acción de la FSH es promover la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa del folículo ovárico y la secreción de estrógenos. Aunado a esto incrementa la producción del líquido folicular, y aumenta el número de receptores para la LH. La LH es necesaria para el crecimiento final del folículo y para la ovulación, actuando específicamente sobre las células de la teca y la granulosa. Es además la responsable de la transformación del folículo en el cuerpo lúteo₍₁₈₎. En particular, la FSH acelera el desarrollo de un número indeterminado de folículos ováricos primordiales, lo cual implica la proliferación de las células de la granulosa y la formación de una capa llamada teca, alrededor de estos folículos, misma que posteriormente se divide en interna y externa. La FSH induce la expresión del gen que codifica para la enzima

P450_{AROM}, lo cual da como resultado la síntesis de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca interna, bajo el estímulo de la LH, por lo que, conforme el folículo madura, se produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos. La FSH y los estrógenos (principalmente el estradiol), ejercen una acción mitogénica, estimulan aún más la proliferación de las células de la granulosa e inducen la síntesis progresivamente mayor de receptores para FSH por célula, lo que aumenta la sensibilidad de éstas a la gonadotropina estimulando su proliferación acelerada⁽¹⁸⁾. Es necesaria la presencia de estradiol y de FSH para el crecimiento folicular, así como para la maduración del ovocito.

Posteriormente, hay un aumento de la producción de fluido folicular, que se acumula en los espacios intercelulares de las células de la granulosa, lo que da origen a la cavidad llamada antro. El folículo sigue gradualmente su transición al estado antral. Solamente un folículo llegará a ser preovulatorio, mientras que los demás sufrirán un proceso que se conoce como atresia^(18,23). El estradiol ejerce una influencia estimuladora en la acción de la FSH dentro del folículo maduro, y tiene un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotálamo-hipofisiario, lo que ocasiona el retiro del soporte de gonadotropinas en los otros folículos menos desarrollados. Sin embargo, el folículo dominante permanece dependiente de la FSH y debe completar su desarrollo previo a la ovulación, por lo que cuenta con un mayor contenido de receptores para FSH, manteniendo de esta manera el estímulo de la aromatización, y por consiguiente la síntesis de estrógenos. En esta etapa, la FSH induce la síntesis de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo antral. A la mitad del ciclo, se produce un pico de FSH y otro de LH de mayor intensidad, ambos esenciales para completar la maduración del ovocito e inducir la ruptura del folículo y la ovulación^(18,23,24). Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca, se diferencian en células luteinizadas, que forman el cuerpo lúteo o amarillo. Durante esta fase, las concentraciones de gonadotropinas son las más bajas de todo el ciclo, debido a la retroalimentación

negativa que ejercen tanto el estradiol como la progesterona. De no haber embarazo, se presenta la luteólisis unos días después y el ciclo se reanuda nuevamente.

Función en testículo.

En los testículos se lleva a cabo la síntesis de andrógenos y la producción de espermatozoides. Topológicamente ambas funciones se encuentran separadas en dos compartimentos, el intersticial que contiene a las células de Leydig y el tubular que contiene dos tipos celulares diferentes, las células de Sertoli y las células germinales en diferentes estadios de maduración. Las células de Leydig bajo la acción de la LH llevan a cabo la biosíntesis de andrógenos, principalmente testosterona. En los túbulos seminíferos las células de Sertoli actúan como células nutricias que aportan una gran variedad de factores necesarios para la adecuada maduración de los gametos^(25,26). La FSH actúa principalmente en la maduración de los túbulos seminíferos y en la iniciación y control de la espermatogénesis, ejerciendo sus funciones gonadotrópicas a través de las células de Sertoli, las cuales al ser estimuladas producen compuestos necesarios para la maduración espermática. La FSH es necesaria para iniciar la espermatogénesis, sin embargo, para la maduración total de los espermatozoides se requiere no sólo del efecto de la FSH, sino también el de la testosterona. Al unirse la FSH a los receptores específicos en las células de Sertoli, estimula la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP); que se une a la testosterona y provee una reserva alta de andrógenos intratubular, útil y necesaria para el desarrollo de las células germinales⁽¹⁸⁾.

También en testículo se sintetizan dos tipos de inhibina: A y B; ambas inhiben de modo selectivo la liberación de la FSH en la hipófisis, sin afectar la liberación de la LH. La FSH estimula de manera directa a las células de Sertoli para secretar inhibina, ésta junto con los esteroides gonadales, actúa como un regulador fisiológico de la secreción hipofisiaria de la FSH^(21,27).

MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH.

La FSH se sintetiza y secreta en múltiples formas moleculares o isoformas, las cuales se han identificado y aislado de hipófisis anterior, suero y orina de diversas especies animales, incluyendo la humana^(13,28-31).

Las variaciones en la estructura y distribución de los carbohidratos internos y terminales, así como de la cantidad de ácido siálico y de grupos sulfato, constituye la principal base química de las diferencias de las isoformas de la FSH y de la extensa heterogeneidad de carga que muestra esta gonadotropina hipofisiaria^(11,23,32,33).

La mayoría de las cadenas de oligosacáridos en la FSH son estructuras bifurcadas, ambos lados terminales pueden estar cargados negativamente (GalNacSO₄ o Gal-ácido siálico) o tener una rama que termina con carga negativa y otra con un grupo sin carga como manosa^(11,34,35). También existen en menor proporción diferentes grupos terminales y otro tipo de ramificaciones como estructuras ternarias. Los oligosacáridos sializados son estructuralmente heterogéneos; se encuentran como complejos birramificados con o sin una N-acetil-glucosamina bisectante unida a la estructura central común, así como complejos trirramificados. Sin embargo la heterogeneidad de la FSH no sólo se puede atribuir a la variabilidad de carbohidratos, ya que se han encontrado diferencias en la cadena peptídica para distintas especies de animales, para la cadena α en la región NH₂ terminal y para la β en ambas regiones (NH₂ y COOH terminal)^(36,37). Aún así, este punto no es muy claro ya que la heterogeneidad por la composición peptídica de la hormona podría deberse a los métodos de extracción y purificación.

Las isoformas de FSH, al tener diversidad de cargas, pueden separarse por sus puntos isoeléctricos (pI) o carga media, con técnicas de electroforesis (EF), isoelectroenfoque (IEF) y cromatoenfoque (CF). La mayor resolución para la separación de las mismas, en cuanto a número de isoformas recobradas, se obtiene mediante el IEF o el CF. Este

último método ofrece la ventaja adicional de que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo del pH empleado pueden ser fácilmente recuperadas, identificadas y nuevamente procesadas a través de un pH diferente, sin que exista pérdida significativa de la actividad. El número y abundancia relativa de cada isoforma, dependerá de la técnica específica empleada en su separación, del origen de la muestra biológica y del estado endócrino del donador^(38,39).

El espectro de isoformas de la FSH separadas por IEF o CF incluye aquellas con $pI \geq 7$ hasta un $pI=3$, pero la mayor proporción de isoformas tienen un pH menor de 5.5. Se ha demostrado que las isoformas de FSH migran principalmente hacia la porción ácida del gel (áreas de pH que corresponden a valores de 5.5 y 3.4), en contraste con lo que se ha descrito para las isoformas de LH. La naturaleza ácida de las isoformas de FSH, se debe principalmente a la presencia de un alto porcentaje de oligosacáridos (aproximadamente 83%) con residuos terminales de ácido siálico⁽²³⁾. La incubación de la FSH con la enzima neuraminidasa, disminuye progresivamente las formas más ácidas mientras que a la par incrementa la proporción de las menos ácidas, dando isoformas con un pH de elución de 6.4 o mayor^(12,28,40), con lo que se puede suponer que en gran medida la acidez de la molécula está dada por la cantidad de ácido siálico presente.

Como consecuencia de la diversidad estructural de las isoformas de FSH también encontramos distintos tipos de unión a los receptores celulares y vida media plasmática, Por lo tanto, la respuesta biológica final será diferente tanto *in vitro* como *in vivo*^(14,29).

Para el análisis de la potencia individual de las isoformas de la FSH en bioensayos *in vitro*, se considera habitualmente su actividad biológica, su capacidad de unión al receptor, y su inmunorreactividad, comparando estos parámetros se obtienen la relación de la actividad de unión al receptor (radioreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) o la relación bioactividad/inmunorreactividad (B/I):

Aunque es difícil obtener conclusiones definitivas con respecto a la actividad biológica de las isoformas de FSH, en términos generales, en condiciones *in vitro*, la bioactividad declina conforme el pI de la isohormona es más ácido. Estos hallazgos han sido consistentes en varias especies como roedores, monos y humanos^(29,41).

La rata y el hámster han sido los modelos experimentales más utilizados para la caracterización del pleomorfismo de la FSH. Por medio del IEF y del CF, varios grupos de investigadores han caracterizado, detalladamente, la distribución de las diversas isoformas de la FSH, tanto *in vitro* como *in vivo*, durante diversas condiciones fisiológicas y experimentales⁽⁴²⁾.

Estudios realizados en el humano han identificado algunas isoformas de la FSH^(43,44,45). La carga media de las isoformas de la FSH difiere entre sexos, y varía según la edad. Se ha encontrado que en los hombres y mujeres ancianos prevalecen las isohormonas más ácidas^(46,47). En mujeres jóvenes se encuentran formas menos ácidas que en los hombres de la misma edad⁽⁴⁴⁾.

Se ha demostrado que las mujeres con ciclos menstruales normales, liberan a la circulación casi todas las isoformas de FSH intradenohipofisarias; sin embargo, la proporción relativa de esas isoformas secretadas cambia en relación con la fase del ciclo menstrual en que se encuentren. Se ha demostrado que durante la fase folicular tardía y el medio ciclo, se asocia un incremento de las formas menos ácidas de la FSH^(43,45,48). Este incremento de las formas menos ácidas, podría ser el resultado del aumento en la concentración circulante de estradiol, de la exposición progresivamente mayor a la GnRH, o de la acción concertada de ambos factores, lo que podría tener impactos fisiológicos importantes al reducir la vida media circulante de las moléculas secretadas y proveer a la célula blanco de una señal gonadotrópica breve pero de alta potencia biológica, además de tener un tiempo de vida media menor que la secretada en la fase folicular temprana y media^(48, 49).

RECEPTOR DE LA FSH

Las gonadotropinas ejercen sus efectos en las células blanco a través de su unión con receptores específicos, estos receptores se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática en las células blanco. Los receptores son complejos glicoproteicos que interactúan específicamente con las hormonas correspondientes en el fluido extracelular. Esta unión es altamente específica y de alta afinidad con el objeto de captar las hormonas adecuadas presentes en concentraciones sumamente bajas.

Los receptores de las gonadotropinas (FSH, LH/CG y TSH), pertenecen a un subgrupo de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas que unen nucleótidos de guanina, también llamadas proteínas G. La proteína G es una molécula heterotrimérica formada por 3 subunidades: α , β y γ . En su forma no activa, la subunidad α está unida al difosfato de guanosina (GDP)⁽⁵⁰⁾. El cambio de GDP por una molécula de trifosfato de guanosina (GTP) promueve la disociación de la subunidad α del complejo β - γ . La subunidad α activa (unida al GTP), así como el complejo β - γ , son los responsables de la modulación de la actividad de distintos efectores intracelulares, como son la adenilato ciclasa⁽⁵¹⁾, y en el caso de la LH también activa la vía de la fosfolipasa C- β (PLC- β)^(50,52-55) y la fosfolipasa A₂⁽⁵⁶⁾, así como canales de diferentes iones. La hidrólisis del GTP por una GTPasa ocasiona la reasociación de la subunidad α con el complejo β - γ y la subsecuente inactivación de la proteína G₍₅₇₎.

Los receptores acoplados a proteínas G se caracterizan por tener una región extracelular NH₂ terminal, una región con 7 dominios transmembranales unidos por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares, y una parte intracelular COOH terminal (Fig. 2)

El receptor para FSH se expresa en células gonadales, en donde al unir a la FSH hipofisiaria se estimula la gametogénesis. Dicho receptor se ha localizado en las células

de Sertoli en el testículo y en células de la granulosa en el ovario. También se ha encontrado en bajas cantidades en otros tejidos que no son gonadales, pero el significado biológico de esta expresión es aún desconocida^(58,59).

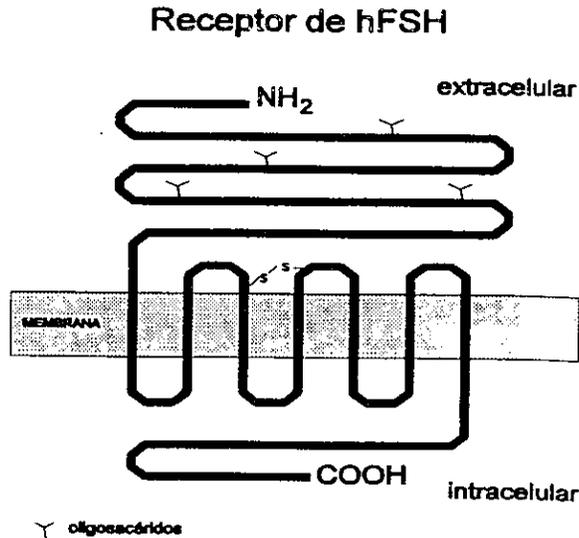


Fig. 2 Receptor de la hFSH

Estudios realizados por Haeckel y cols⁽⁶⁰⁾ demostraron que el gen del FSHR de rata está compuesto de 84 kilopares de bases (kpb) y el de humano de 54 kpb de largo y consta de 10 exones y 9 intrones. Los primeros nueve exones codifican para la región extracelular amino terminal del receptor. El largo de los exones 2 al 8 es muy similar, teniendo de 68 a 77 pb, mientras que el exon 1 y 9 son más largos. El exón 10 es el más

largo, posee 1200 bases. Este exon codifica los siete dominios transmembranales y la región COOH terminal. Este gen se encuentra en el cromosoma 2p21p16⁽⁶¹⁾.

El receptor de la FSH (FSHR) esta formado por 695 aa en el humano y 692 aa en la rata, incluyendo los primeros 17 aa, los cuales corresponden al péptido señal, así que la proteína madura está formada por 678 aa en el humano y 675 aa en la rata, con un peso molecular aproximado de 76.5 kDa. El dominio extracelular está formado por 348-349 aa, en la rata se han estudiado los diversos sitios de N-glicosilación de este dominio y se han identificado tres en las posiciones N-191, N-199 y N-293; mientras que en el humano existen cuatro sitios de N-glicosilación, los tres primeros en las mismas posiciones que en la rata y el último en la posición N-318⁽⁶²⁾. Esta región es la que proporciona la especificidad y la alta afinidad de unión con la hormona ⁽⁶³⁾; además posee porciones ricas en leucinas, así como en glutamato y aspartato, los cuales se cree que son importantes para la interacción hormona-receptor^(64,65). Este dominio está compuesto de 14 unidades repetidas de aproximadamente 24 aa cada uno. El grupo de cisteínas localizado en ambos extremos del dominio extracelular esta muy conservado entre los receptores de LH/CG y FSH, sugiriendo un posible papel conformacional. Algunos autores proponen que se pueden formar puentes disulfuro entre las cisteínas y las asas extracelulares del dominio transmembranal del receptor, que ayudan a mantener la estructura terciaria del receptor⁽⁶³⁾. La región NH₂ terminal del receptor podría funcionar como una antena que se une con la hormona, mientras que la activación del receptor y la generación de la señal intracelular dependerán de elementos estructurales presentes en los dominios transmembranales e intracelulares. La porción extracelular del receptor de la FSH está unido a la región que posee siete dominios transmembranales de aproximadamente 20-25 aa cada dominio, la región transmembranal está compuesto de 264 aa, estos dominios se conectan por 3 asas extracelulares y 3 asas citoplásmicas. Se ha propuesto que las asas citoplásmicas, en especial la tercera asa y la región COOH-terminal son las porciones responsables del

acoplamiento del receptor con las proteínas G asociadas a la membrana⁽⁶⁶⁾. El dominio intracelular del FSHR contiene 63-65 aa y es rico en residuos de serinas y treoninas, algunas de las cuales pueden ser sitios de fosforilación, esta región es la parte encargada de activar las vías de transducción de señal. La fosforilación de cinasas específicas podría jugar un papel muy importante en la desensibilización temprana y en la regulación decreciente del receptor⁽⁶⁷⁾. Específicamente para el receptor de la FSH se ha demostrado que segundos después de la estimulación hormonal, el receptor es fosforilado^(68,69).

Cuando se forma el complejo hormona-receptor, el receptor presenta un cambio conformacional que se traduce en la activación de la proteína Gs con la subsecuente activación de la adenilato ciclasa⁽⁷⁰⁾. Cada molécula de ciclasa, cataliza la conversión de un número elevado de moléculas de ATP en AMPc, el cual funciona como un efector alostérico que activa a las proteínas cinasas dependientes de AMPc. El aumento en la concentración de AMPc en el citoplasma está seguida por la unión de AMPc a la subunidad reguladora de la proteína cinasa⁽⁷¹⁾. El AMPc actúa como un segundo mensajero, ya que induce la activación de las cinasas, enzimas cuya función es la fosforilación de proteínas utilizando ATP como sustrato. El principal mecanismo de acción de las hormonas glicoproteicas es a través de la vía AMPc-PKA (cinasa de proteínas A)⁽⁶⁷⁾. Posteriormente, se presenta la disociación de la subunidad reguladora y consecuentemente la activación de la subunidad catalítica de la enzima; esta última, fosforila a las proteínas celulares responsables del efecto biológico del primer mensajero. En su forma fosforilada algunas enzimas son activas y otras inactivas, canalizando su efecto en diferentes rutas metabólicas. Las concentraciones intracelulares altas de AMPc persisten por poco tiempo, ya que la fosfodiesterasa transforma el AMPc en su forma inactiva 5'AMP.

Los receptores de las hormonas glicoproteicas también pueden estar acoplados a proteínas Gq/11 que activan a la PLC- β ₍₅₂₎, enzima que cataliza la hidrólisis de fosfoinosítoles a inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DA); estos son mensajeros intracelulares que inducen la activación de la PKC, la liberación de calcio intracelular y probablemente también la entrada del calcio extracelular, es lo que da la activación de proteínas cinasas dependientes de calcio. También el receptor puede regular directamente los canales de iones, modulando el tránsito de éstos a través de la membrana celular_(57,72).

A la fecha se ha clonado el receptor de la FSH de rata, a partir de DNA proveniente de testículo y el receptor de la FSH humano de DNA de ovario y de testículo₍₆₃₎.

Aparentemente los carbohidratos que se encuentran en el dominio extracelular del receptor de FSH no son necesarios para la unión de la hormona al receptor, aunque no se descarta que éstos puedan tener un papel importante en la correcta conformación de la proteína₍₆₂₎.

Se han encontrado distintos transcritos para el receptor de la FSH. Esto puede tener importantes implicaciones con respecto a la naturaleza de la interacción hormona-receptor y el subsecuente mecanismo de la transducción de señal. La diferencia en la afinidad por el receptor, puede ocasionar cambios en la cascada de señales y culminar en una respuesta celular diferente. La combinación de activación de diversos sistemas de mensajeros intracelulares dependerá de la interacción ligando-receptor, lo cual estará dado tanto por la naturaleza del receptor como por la de la isoforma de la hormona_(73,74).

ISOFORMAS DE FSH Y SU RECEPTOR.

Cuando la FSH totalmente deglicosilada se une al receptor actúa como un antagonista, ya que sólo ocupa el lugar de la hormona glicosilada y no activa a la adenilato ciclasa⁽⁷⁵⁾. Los hallazgos de la importancia que tienen los oligosacáridos en la unión al receptor se han obtenido de estudios con mutagénesis dirigida en las Asn correspondientes a los sitios de glicosilación⁽⁷⁶⁾. La ausencia de los oligosacáridos no impide la unión al receptor, sin embargo, de las 4 cadenas de oligosacáridos, aparentemente la que corresponde a la Asn 52 de la subunidad α , es la más importante para inducir la activación del receptor^(62,76).

En estudios recientes donde se utilizó mutagénesis dirigida⁽⁷⁷⁾ se encontró que tanto la unión al receptor como la transducción de señal, son funciones dissociables; cada una comprende diferentes sitios en la molécula de la FSH (un aminoácido específico β Arg35- para el sitio de unión del receptor y un oligosacárido específico α Asn52- para la transducción de señal). Esto no implica que las cadenas de los oligosacáridos de la subunidad β no sean importantes, de hecho existen estudios⁽⁷⁶⁾ en que se demuestra que la FSH sin el oligosacárido de la α Asn 52 tiene una biopotencia reducida. Estos investigadores también encontraron que cuando la FSH carecía de cualquiera de los oligosacáridos de la subunidad β , la producción de estradiol disminuía. Por lo tanto, la potencia de la hormona depende tanto de la estructura del ligando, como de los cambios en la afinidad resultante; la unión hormona-receptor puede producir un espectro de respuestas celulares a través de diversas vías de señales post-receptor.

OBJETIVO

Comparar la unión al receptor por competencia de las isoformas de la hFSH hipofisiaria en células de la granulosa de rata, membranas de testículo de rata y células 293 transfectadas permanentemente con el receptor recombinante para hFSH.

HIPOTESIS

La FSH intrahipofisiaria existe en múltiples formas moleculares. Dado que la principal diferencia estructural entre las isoformas es la cantidad de ácido siálico incorporado a cada una de ellas, entonces existirán diferentes grados de unión al receptor. Las isoformas menos ácidas presentarán una mayor unión al receptor con respecto a las formas más ácidas.

MATERIAL Y METODOS.

Extractos hipofisarios.

Se colectaron hipófisis humanas en autopsias de cadáveres de ambos sexos examinados antes de cumplir 72 horas de fallecimiento y que habían sido conservados a 8°C a partir de las 3-4 horas posteriores a la muerte. Las hipófisis se almacenaron a -70°C, hasta el momento de preparar los extractos de glicoproteínas totales por el método de Jones y cols⁽⁸⁰⁾ y su posterior uso en el Cromatoenfoque (CF).

Separación de las isoformas de hFSH de los extractos hipofisarios por cromatoenfoque.

El CF es un método que separa los diferentes isómeros de las proteínas mediante la interacción de la carga de superficie de la molécula con un soporte de carga inmovilizado. El CF es una cromatografía de intercambio iónico, en donde el amortiguador de corrimiento forma un gradiente de pH, de tal forma que las isoformas son recuperadas en el eluato cuando el pH del gradiente de elución iguala el punto isoelectrico (pI) de la proteína. El CF ofrece la ventaja adicional sobre los otros métodos de separación, de que las proteínas que se encuentran fuera del intervalo de pH empleado puedan recuperarse fácilmente, ser identificadas y reenocadas a través de gradientes diferentes de pH ⁽⁸¹⁾. En este estudio se utilizó un gradiente de pH de 7.5 a 4.0 (Fig. 3).

En el CF de extractos de glicoproteínas hipofisarias se utilizó como intercambiador iónico la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA) y el amortiguador de inicio fue imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4. Para poder incrementar la resolución de la separación de las isoformas, el tamaño de la columna fue de 90 X 1.5

cm, estas dimensiones son mayores a las previamente reportadas^(29,32,48). La muestra correspondiente a 15-25 mg de FSH inmunorreactiva, se depositó en la columna y una vez completada su incorporación se agregó el amortiguador de corrimiento Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals) con un pH de 4.0, diluido 1:8 con agua desionizada. Se colectaron entre 550 y 600 fracciones de 3 ml cada una a 4°C, con un colector RediRac a una velocidad de 0.25 ml/min. En el momento que alguna de las fracciones alcanzó un $\text{pH} \leq 4.0$, el amortiguador de corrimiento se sustituyó por una solución de NaCl 1M, para recuperar el material no eluido dentro del intervalo de pH 7.4-4.0. Hecho esto, se colectaron de 15 a 20 fracciones adicionales del mismo volumen que las anteriores, y se procedió a medir el pH de cada una de las fracciones colectadas a lo largo de todo el corrimiento. Las fracciones fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la determinación de su contenido de hFSH por el método de radioinmunoanálisis (RIA).

De acuerdo al perfil de distribución de FSH obtenido del CF, se procedió a formar grupos de las fracciones con mayor concentración de hFSH distribuidos por áreas de pH. Los grupos resultantes fueron transferidos por separado a bolsas de membrana para diálisis con un límite de permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA. EUA) y se dializaron durante 24 horas a 4°C contra agua bidestilada desionizada y posteriormente, bajo las mismas condiciones contra una solución de carbonato de amonio 0.01 M (Sigma Chemicals CO., St. Louis, MO, EUA), por 24 horas más. Cada uno de los grupos se congeló a -70°C para después ser liofilizados.

CROMATOENFOQUE DE hFSH

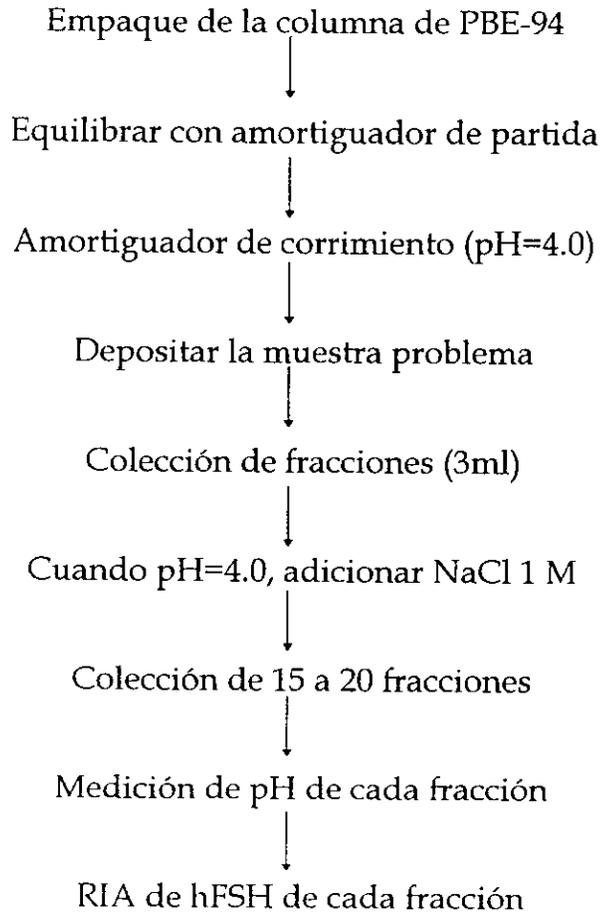


Fig. 3 Cromatoenfoco de extractos hipofisarios.

RIA de hFSH.

El RIA de FSH, se llevó a cabo empleando reactivos donados por NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, EUA), utilizando como estándar de FSH a la preparación LER-907 (NIADDK). El anticuerpo policlonal anti-hFSH-6 y como trazador se empleó el hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcado con NaI^{125} (Amersham International Limited, Amersham, Reino Unido) por el método de Cloramina $\text{T}_{(82)}$. El RIA se realizó agregando 100 μl de amortiguador PBS 0.05 M, gelatina 0.1%, pH=7.4 (PBS-Gel), 100 μl de la muestra problema o de la curva estándar, 100 μl de hFSH-I¹²⁵ a una concentración de 15,000 cuentas por minuto (cpm), 100 μl de anti-hFSH a una dilución de trabajo 1:50,000 (dilución final 1:200,000) preparado en PBS 0.05M, EDTA 0.05 M (PBS-EDTA) pH=7.4, suero normal de conejo (SNC) al 1%. Los tubos de reacción se incubaron a temperatura ambiente de 18 a 24 horas. Posteriormente se agregaron 200 μl del 2° anticuerpo (Suero de carnero inmunizado con γ -globulina de conejo) a una dilución de 1:10 con PBS 0.05 M + PEG al 8%, con la finalidad de precipitar los complejos inmunológicos, y se incubaron por otras 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 2 ml de agua fría y se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se decantaron los sobrenadantes y la pastilla se contó en un contador para radiaciones γ (Packard Instrument Company, EUA) (Fig. 4).

RADIOINMUNOALISIS DE hFSH

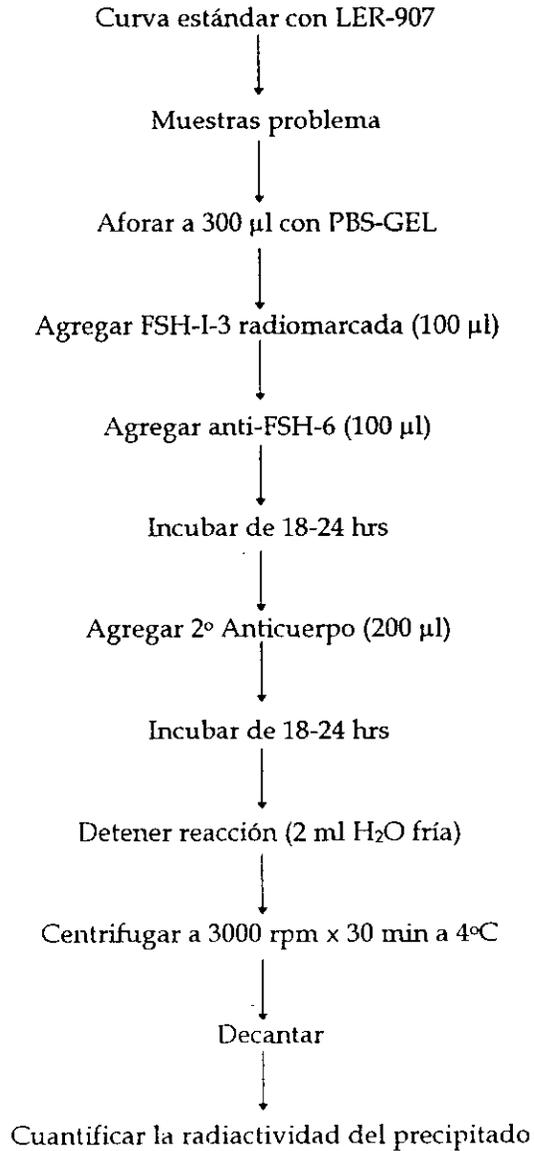


Fig. 4 Radioinmunoanálisis de hFSH.

Crecimiento de células de riñón fetal humano transfectadas con el receptor recombinante para hFSH.

La línea celular 293 transfectada con el receptor recombinante para hFSH (293-hFSHR) fue donada por el Dr. Aaron J.W. Hsueh, Standford University, CA. Las células se cultivaron en placas de polipropileno de 10mm (Gibco Laboratories) en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Gibco BRL, USA), suplementado con suero fetal de ternera al 5% (Gibco, BRL), glutamina (0.1 mM) (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA), penicilina (25,000 UI/ml), estreptomocina (100mg/ml), 500 µl de geneticina (100mg/ml) (Gibco, BRL) a un pH=7.2-7.3. Las células se mantuvieron en un incubador húmedo provisto de una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ a 37°C.

Obtención de células de la granulosa de rata.

Se utilizaron ratas hembras Wistar, de 21 a 22 días de edad, a las que se les implantó en el dorso una cápsula de silástico de 10 mm que contenía aproximadamente 10 mg de dietil-estil-bestrol (DES) (Sigma Chemicals Co), esto con el fin de aumentar la proliferación de las células de la granulosa. Tres días después, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Los se extrajeron los ovarios y los folículos se puncionaron para obtener las células de la granulosa, las cuales se centrifugaron y lavaron. Se realizó un conteo del número total de células, y se diluyeron a una concentración de 200,000 células en 100 µl de amortiguador de fosfatos 0.01 M con MgCl₂ 5mM, 100 mM de sacarosa y BSA al 0.1% pH=7.5 (amortiguador de ensayo de unión al receptor RRA). Las células se almacenaron a -70°C hasta que se utilizaron para el ensayo de unión al receptor.

Obtención de membranas de testículo.

Se utilizaron ratas macho Wistar de 28-30 días de edad, las cuales se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajeron los testículos para ser pesados y homogenizados con un pistilo de teflón (Polytron), el tejido obtenido se filtró a través de una malla doble.

Posteriormente se realizó la segunda homogenización; el homogenado resultante se filtró nuevamente. El tejido obtenido se resuspendió en amortiguador de RRA a una concentración de 1 ml por gramo de peso inicial de testículo.

Ensayo de unión al receptor.

Con el objeto de analizar la capacidad de unión de las diferentes isoformas hipofisiarias de hFSH al receptor, se realizó un ensayo de unión al receptor (RRA) por competencia, en el que se adicionó hormona radiomarcada, la cual compitió con hormona radioinerte (isoformas en diferentes diluciones) por la unión al receptor. Para el ensayo de unión al receptor se utilizó amortiguador de RRA, y como trazador 30,000 cpm de hFSH-I-3 (NIADDK) radiomarcada con NaI^{125} por el método de lactoperoxidasa⁽⁸³⁾. Se emplearon tres diferentes sistemas: células 293-hFSH, células de la granulosa de rata hembra inmadura pretratada con DES y membrana de testículo de rata macho adulta.

Para cualquiera de los tres modelos se utilizaron 100 μl de trazador, 200,000 células o membrana de testículo en 100 μl y 100 μl de muestra. La reacción se realizó en tubos de ensayo de 12 x 75 mm, se dejó incubando de 18 a 24 horas a temperatura ambiente con agitación constante. La reacción se detuvo con 2 ml de amortiguador de RRA frío. Se agitó cada tubo y se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C, se decantaron los sobrenadantes y la pastilla resultante se contó en un contador de radiaciones γ .

Como estándar se utilizó el preparado hFSH-I-SIAFP(1)-B (NIADDK), cada ensayo de unión incluyó de 6 a 8 dosis diferentes de cada grupo de isoformas. Las muestras desconocidas fueron analizadas por duplicado. La capacidad de unión al receptor se calculó utilizando 8 dosis en 3 o 4 radiorreceptores por separado y se expresó como la razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I). Para las uniones totales se agregaron 100 μl de amortiguador en lugar de muestra y para las uniones no específicas un excedente de hFSH. (Fig. 5).

ENSAYO DE UNION AL RECEPTOR

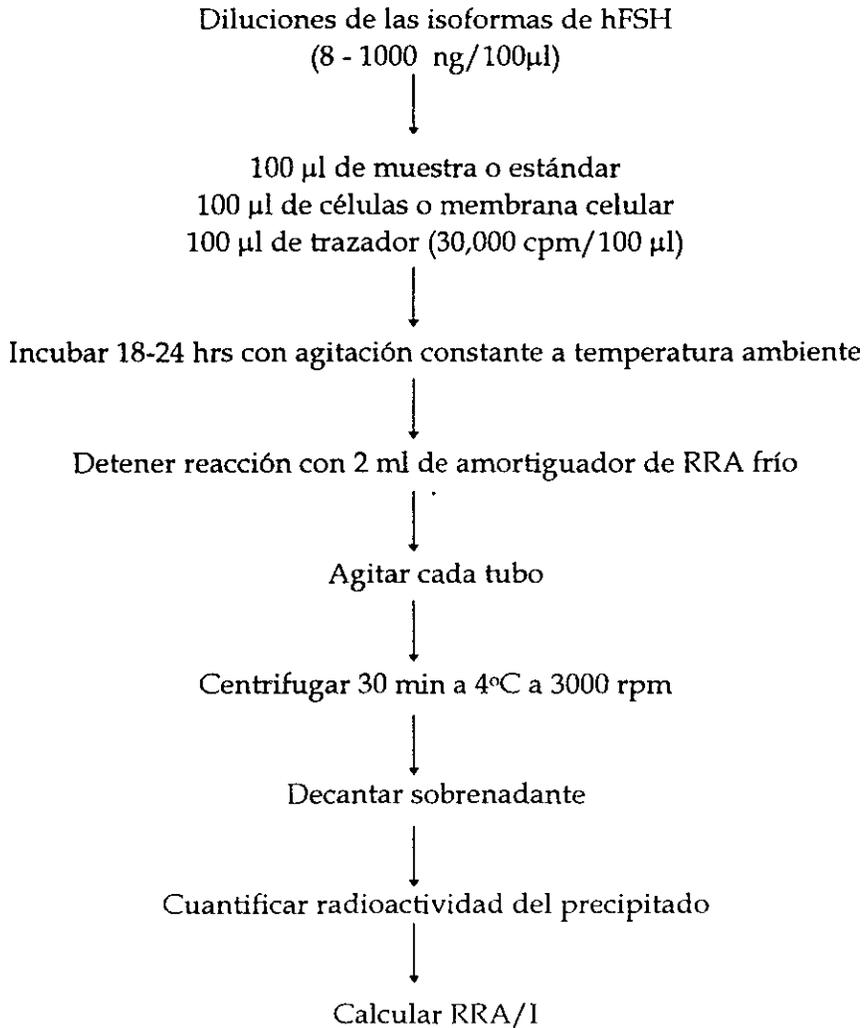


Fig. 5. Bioensayo de unión al receptor.

Estandarización de las técnicas de radiomarcaje de hFSH-I-3 con NaI¹²⁵.

Se realizó un estudio comparativo entre tres diferentes métodos de radiomarcaje (lactoperoxidasa, Iodogen y Cloramina T) para posteriormente utilizar el más adecuado en los ensayos de unión al receptor.

Radiomarcaje de hFSH por el método de lactoperoxidasa.

Se hidrató Sephadex G-100 (Sigma Chemicals Co) en PBS 0.01 M, se empacó en una columna de cromatografía de 10 x 1 cm, la cuál se equilibró con PBS-BSA al 0.5% y se lavó finalmente con PBS 0.01 M. A 25 µl de hFSH-I-3 (2.5 µg/25µl) (NIADDK) se le agregaron 25 µl de PB 0.5 M y 5 µl de NaI¹²⁵ (aproximadamente 0.5 mCi) (Amersham International), se cuantificó la radiactividad total agregada (Cuentas totales). La reacción inició con la adición de 10 µl de lactoperoxidasa (100µg/ml), 5 µl de glucosa oxidasa (1 µg/ml) y 10 µl de β-D-Glucosa (0.05 g/10 ml de H₂O), se agitó por 5-8 segundos y se detuvo la reacción adicionando 100 µl de azida de sodio. Posteriormente la mezcla se depositó en la superficie de la columna, lavando el vial con 100 µl de PB 0.5 M (2 veces), se contó la radiactividad del residuo, y se eluyó la columna con PBS 0.01 M, se colectaron 30 tubos a los que previamente se les agregó 200 µl de PBS 0.01 M-BSA 0.5%, con 10 gotas cada uno (0.5 ml). Se cuantificó la radiactividad de cada tubo para determinar la elución de hormona marcada y el NaI¹²⁵ libre. (Fig. 6).

Radiomarcaje de hFSH por el método de Cloramina T.

Se preparó la columna igual que para el radiomarcaje por el método de lactoperoxidasa. A 25 µg/25 µl de hFSH-I-3 (NIADDK) se le agregaron 25 µl de PB 0.5 M pH=7.4. Se le añadió 1mCi de NaI¹²⁵, 10 µl de cloramina T (N-Cloro-p-toluensulfonaminada) (0.25mg/ml) y se dejó reaccionar por 50 segundos. Al término de la reacción se añadió 50 µl de metabisulfito de sodio (1 mg/ml). Se purificó la hormona marcada en una columna de Sephadex G-100 y colectando 0.5 ml en tubos que contenían 200 µl de PBS 0.01M y BSA 0.1%. El amortiguador de elución fue PBS 0.01M pH=7.4. (Fig. 7).

RADIOMARCAJE POR EL METODO DE LACTOPEROXIDASA

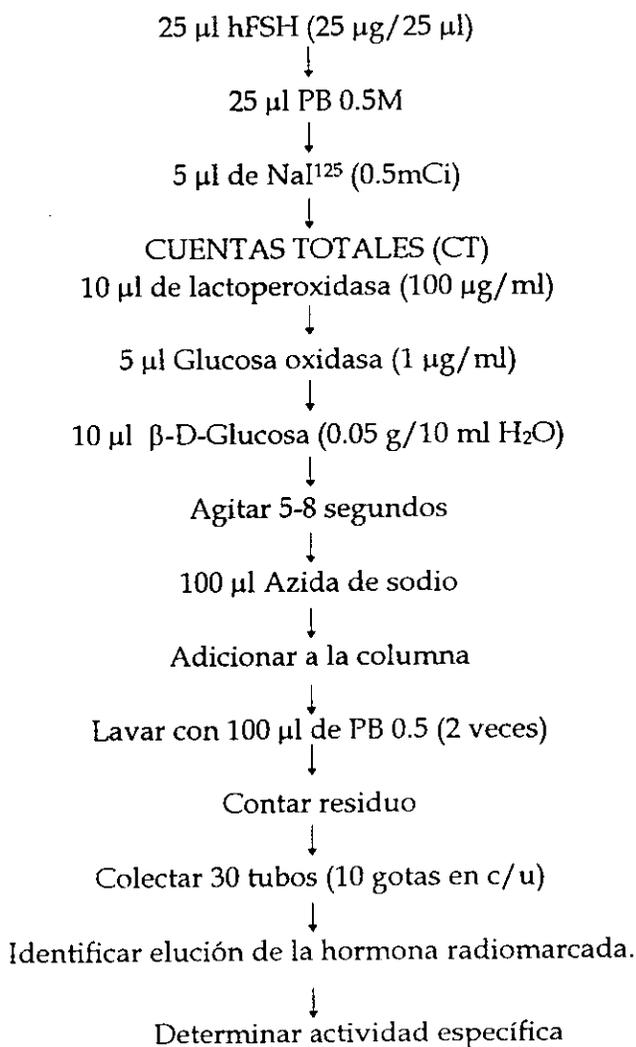


Fig. 6 Radiomarcaje por el método de lactoperoxidasa.

Radiomarcaje por el método de Iodogen.

Se preparó la columna igual que para los radiomarcajes antes mencionados. A 25 μ l de hFSH-I-3 (25 μ g/25 μ l) se le agregaron 2 μ g de Iodogen y 0.5 mCi de NaI¹²⁵. Se agitó por 10-15 segundos y se centrifugó por 3 minutos. Posteriormente se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, poco antes del término de la incubación se centrifugó varios segundos. Se añadió 75 μ l de amortiguador de KH₂PO₄ 0.1 M pH=7.4 y se agitó por 10 segundos. La mezcla se transfirió a un tubo con 200 μ l de amortiguador de KH₂PO₄ 0.05 M y BSA 5%, y posteriormente se depositó en la superficie de la columna, lavando el vial con 50 μ l de KI (2 veces), se contó el residuo y se eluyó la columna con KH₂PO₄ 0.05 M, se colectaron 30 tubos con 10 gotas cada uno (0.5 ml). Se cuantificó la radiactividad de cada tubo para determinar la elución de la hormona marcada y el NaI¹²⁵ libre. (Fig. 8).

Análisis estadístico.

Para calcular el paralelismo de las pendientes obtenidas por las diferentes isoformas de hFSH y de los estándares utilizados (hFSH-I-SIAFP(1)-B y LER-907), en los ensayos de unión al receptor e inmunoensayos (RIA de hFSH) se utilizó el método de De Lean *et al*⁽⁸⁴⁾.

Para establecer la asociación entre el pH de elución de las isoformas de FSH y la correspondiente razón RRA/L, se realizó la prueba de correlación de Spearman.

Para todas las pruebas estadísticas definidas se consideró el valor de $p < 0.05$ como límite para establecer la presencia de diferencias significativas.

RADIOMARCAJE DE FSH I-3 POR EL METODO DE CLORAMINA T

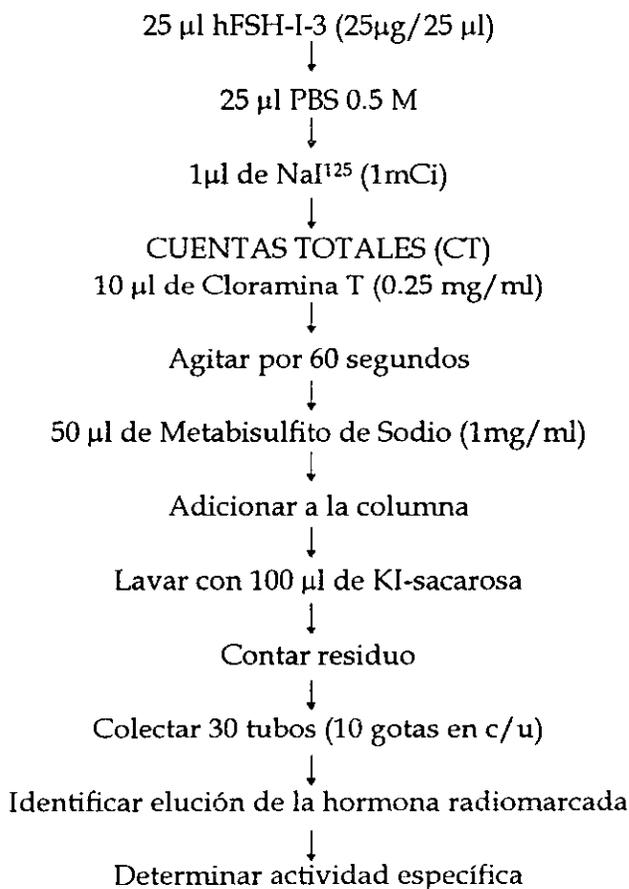


Fig. 7. Radiomarcaje por cloramina T.

RADIOMARCAJE POR EL METODO DE IODOGEN

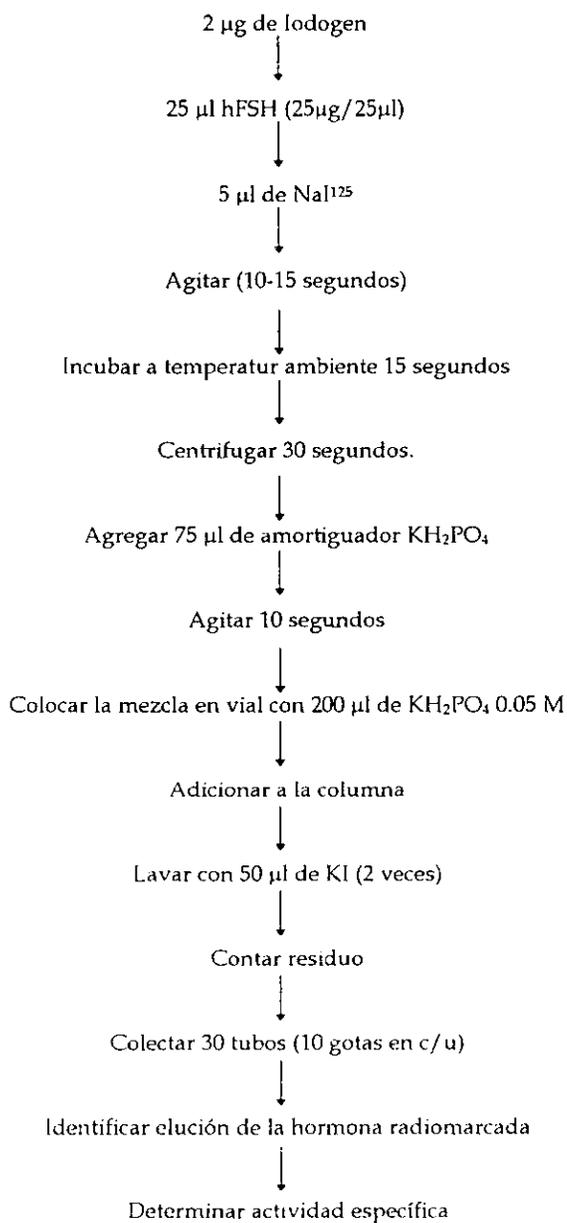


Fig. 8 Radiomarcaje por Iodogen.

RESULTADOS

Separación por CF de las isoformas de hFSH hipofisarias.

La separación de las isoformas de hFSH se realizó por el método del CF, con una columna de dimensiones mayores a lo previamente reportado^(31,33,43), por lo que se logró una excelente resolución y separación de las isoformas dentro de valores de pH desde >7.10 hasta <3.80 (Fig. 9). Se efectuaron un total de 3 CFs, las recuperaciones finales de hFSH fueron del $79 \pm 4.0\%$ de la concentración inicial depositada en las columnas. Se mezclaron las fracciones del CF con un contenido elevado de FSH en una misma región obteniendo 9 diferentes grupos de isoformas. La tabla 1 muestra los intervalos y las medianas de pH de las isoformas separadas por el CF.

Tabla 1. Intervalos y mediana de pH de cada grupo de isoforma hipofisaria de hFSH separadas por CF.

ISOFORMA	INTERVALO DE pH	MEDIANA pH
I	>7.10	7.30*
II	6.60-6.20	6.32
III	6.53-5.59	6.08
IV	6.14-5.53	5.71
V	5.47-5.10	5.26
VI	5.06-4.60	4.92
VII	4.76-4.12	4.43
VIII	4.05-3.82	3.93
IX	<3.80	3.00*

*Valores utilizados para el análisis estadístico.

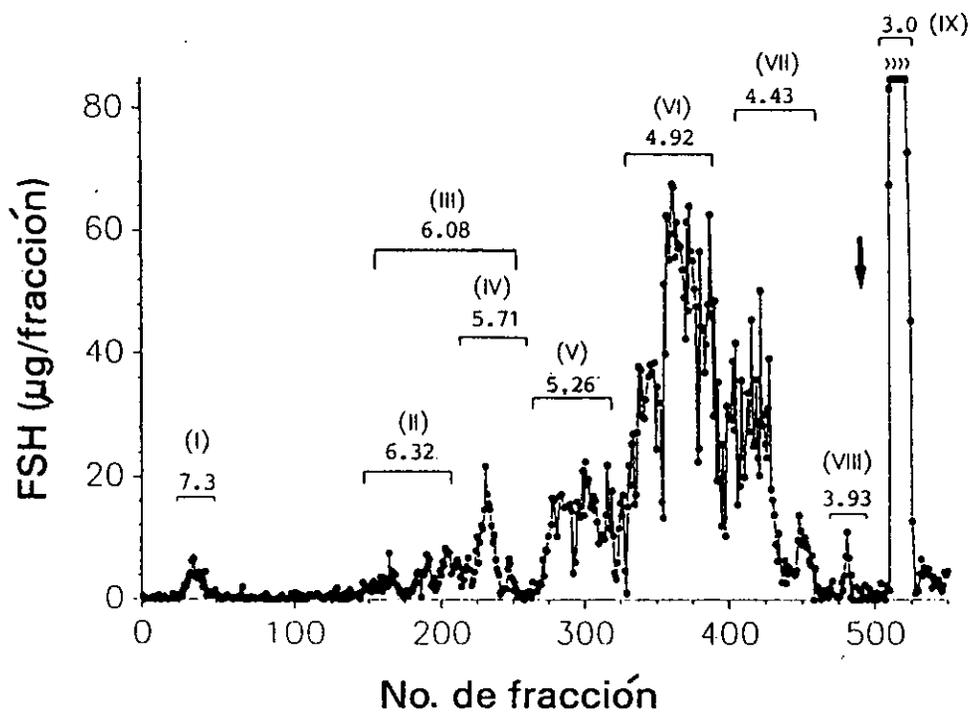


Fig. 12 Patrón de distribución por pH de la FSH intrahipofisiaria después de su separación por CF en columnas de 90 x 1.5 cm

Cuantificación inmunorreactiva de los concentrados hipofisarios de las isoformas de hFSH.

El contenido de hFSH inmunorreactiva de cada grupo de isoformas fue cuantificado y analizado en 8 dosis diferentes por RIA. La Fig. 10 muestra las curvas de paralelismo de las isoformas de hFSH hipofisarias y del estándar LER-907. Como se puede observar en la gráfica, todas las isoformas presentaron curvas dosis-respuesta paralelas entre si y con el estándar.

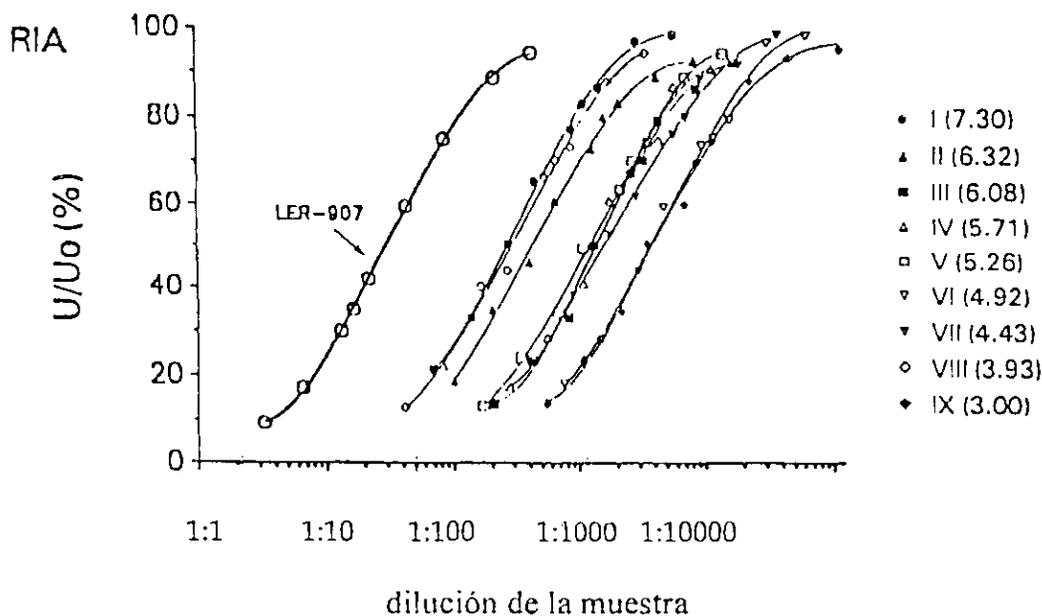


Fig. 10 Curvas de paralelismo de las diferentes isoformas de hFSH hipofisaria analizadas por RIA.

Ensayos de unión al receptor.

Estandarización de radiomarcaje de hFSH con NaI^{125} .

La hFSH que se utilizó en los ensayos de unión al receptor fue la radiomarcada por el método de lactoperoxidasa, esta presentó un mayor desplazamiento y unión en las curvas por competencia. La Fig. 11 es representativa de un total de 7 radiomarcajes diferentes. La actividad específica fue de $\approx 35.915 \pm 14.71 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$.

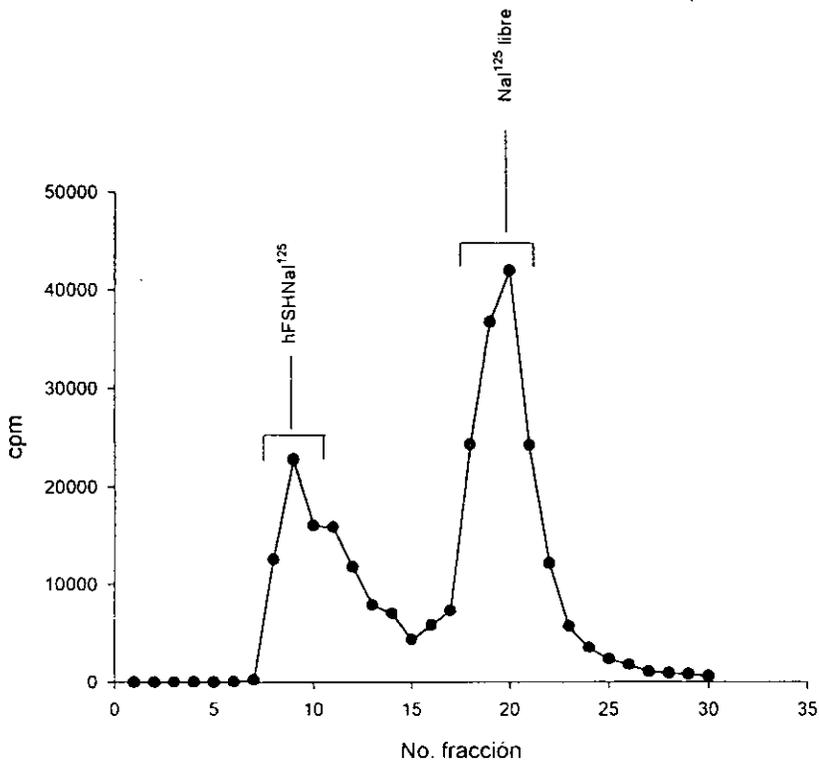


Fig. 11. Radiomarcaje por el método de lactoperoxidasa.

Curvas de competencia y desplazamiento y comparación de unión entre las isoformas.

En los ensayos de unión al receptor por competencia con hFSH-I¹²⁵ se observó que todas las isoformas presentaron curvas dosis-respuesta paralelas con la curva estándar en células de la granulosa (Fig. 12). Los resultados obtenidos fueron de 4 diferentes ensayos de unión al receptor.

Para determinar las diferencias de unión al receptor que presentan las isoformas, se seleccionaron tres grupos con pI diferentes: III (pH=6.08), V (pH=5.26) y IX (pH=3.00). Los resultados obtenidos de estos ensayos demostraron que las isoformas más ácidas como la IX presentaron menor unión al receptor que las isoformas menos ácidas como la III. (Fig. 12a).

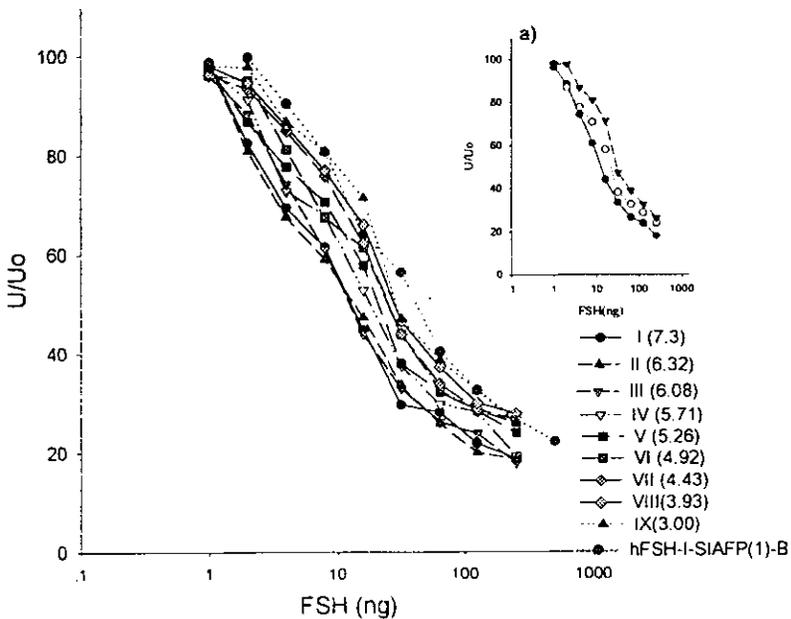


Fig. 12 Curva de desplazamiento por competencia de las isoformas de hFSH en células de la granulosa de rata. a) Curvas de las isoformas • III, ° V y ♥ IX.

Como se puede observar en la Fig. 13, también en membranas de testículo de rata macho, todas las isoformas presentaron curvas dosis-respuesta paralelas con la curva estándar, así como una menor unión de las isoformas más ácidas en comparación con las isoformas menos ácidas (Fig. 13a).

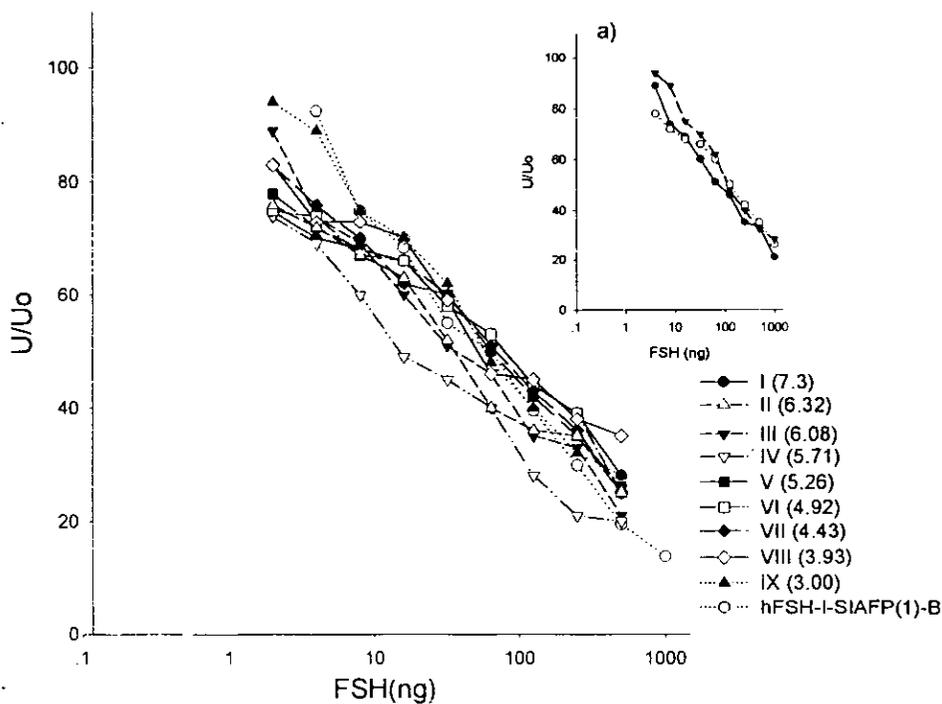


Fig. 13. Curvas de desplazamiento por competencia de las isoformas de hFSH en membranas de testículo de rata. a) Curvas de desplazamiento para las isoformas • III, ° V y ▼ IX.

Tanto en las células 293-hFSHR como en las células de la granulosa de rata y en membranas de testículo de rata macho, las isoformas de hFSH presentaron curvas dosis-respuesta paralelas con la curva estándar (Fig. 14). Sin embargo en la línea celular 293 no se encontraron diferencias en el desplazamiento por competencia entre las diferentes isoformas (Fig.14a).

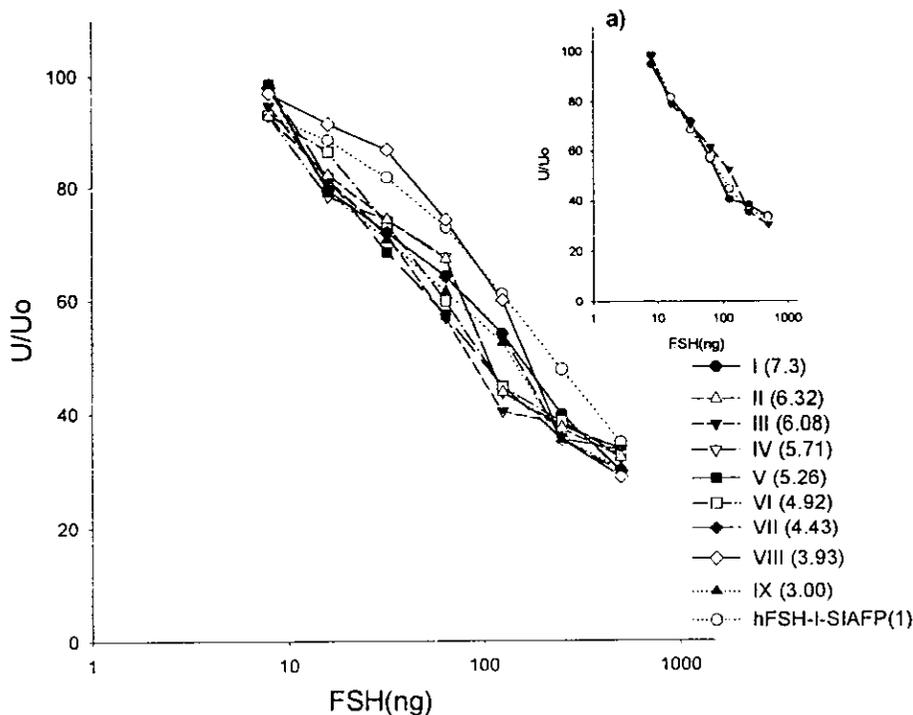


Fig. 14. Curvas de desplazamiento por competencia de las isoformas de hFSH en células 293-hFSHR. a) Curvas de desplazamiento para las isoformas • III, ° V y ▼ IX

Relación RRA/I en los diferentes tipos celulares.

Se calculó la relación RRA/I para los tres tipos celulares, utilizando diferentes dosis de cada isoforma de hFSH. Debido a que la isoforma I ($\text{pH} > 7.1$) presenta un comportamiento muy distinto con respecto a las demás isoformas fue excluida en el análisis de dichos resultados. En la siguiente gráfica se observa la relación RRA/I en células de la granulosa de rata, en la cual se observa que la correlación entre el pH de elución y el cociente RRA/I fue de $r=0.905$ ($p=0.02$)

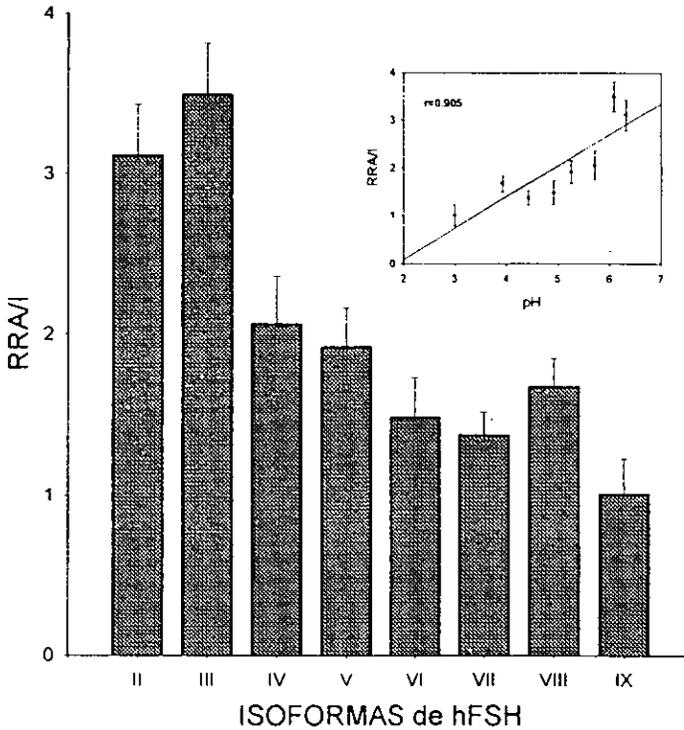


Fig. 15 Razón radioreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisaria en las células de la granulosa de rata y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I ($r=0.905$).

En cuanto a las membranas de testículo de rata se encontró que existe una correlación entre el pH de elución de las isoformas y la relación RRA/I muy cercano a uno $r=0.81$ ($p=0.01$).

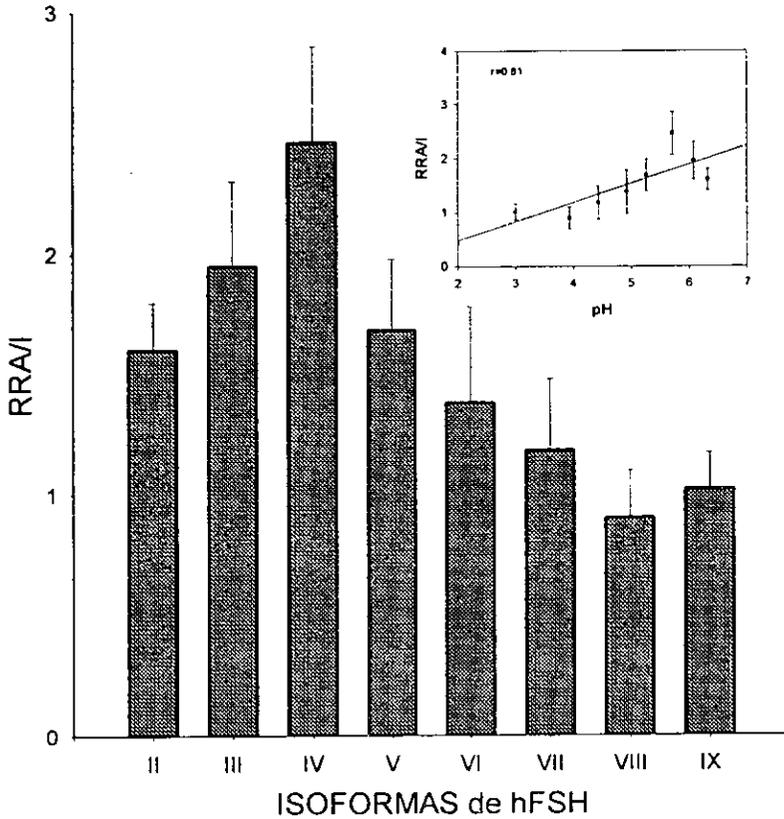


Fig. 16. Razón radioreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisiaria en membranas de testículo de rata y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I ($r=0.81$).

Sin embargo, en las células 293-hFSHR, no se encontró una correlación entre el pH de elución de las isoformas de hFSH y la relación RRA/I, el valor calculado fue de $r=0.491$ ($p=0.182$). (Fig. 17).

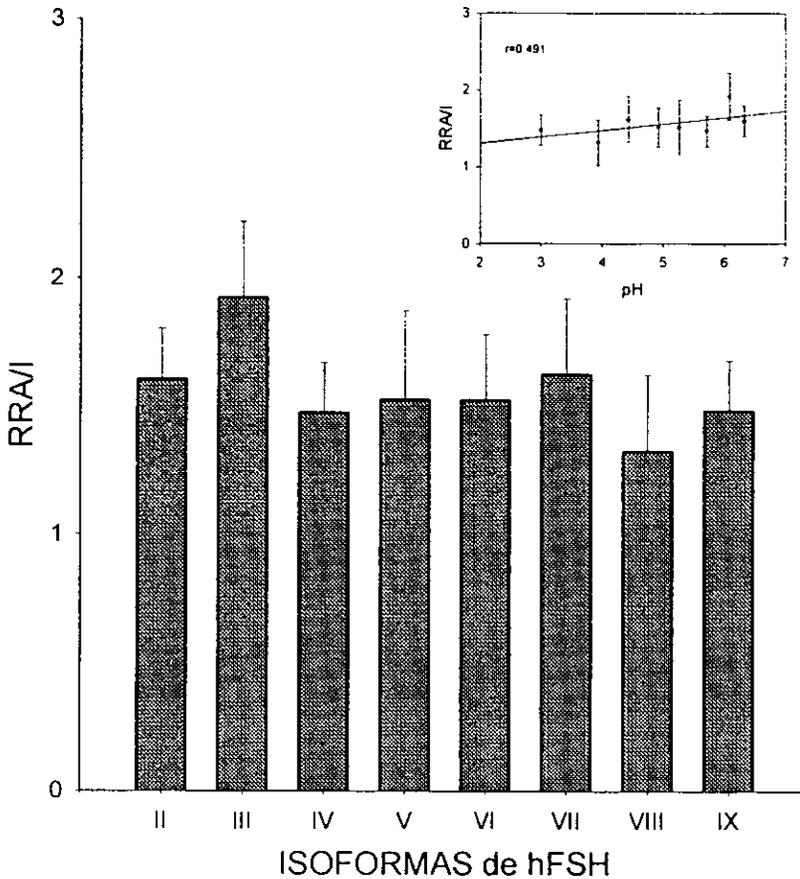


Fig. 17. Razón radiorreceptor/inmunorreactividad (RRA/I) de las isoformas de hFSH hipofisiaria en las células 293-hFSHR y correlación entre el pH de las isoformas y el valor de RRA/I ($r=0.491$).

Tomando en cuenta al grupo de isoformas I ($\text{pH} > 7.1$) en el cálculo de la correlación entre el pH de elución y RRA/I se obtuvieron los siguientes resultados:

En células de la granulosa de rata $r=0.851$ ($p=0.02$), para membranas de testículo de rata macho $r=0.617$ ($p=0.067$) y para las células 293-hFSHR $r=0.343$ ($p=0.331$).

Como se puede observar en las células de la granulosa sí se obtuvo un valor cercano a uno, no así para las membranas de testículo y células 293-hFSHR.

DISCUSION

En la presente tesis se analizó las diferencias entre las isoformas hipofisiarias de la FSH con respecto a su unión al receptor en tres diferentes tipos celulares.

Los tres sistemas empleados fueron células de la granulosa de ratas inmaduras pretratadas con DES, membranas de testículo de rata macho adulta y células 293-hFSHR. En todos los ensayos se utilizó FSH humana hipofisiaria, por lo que en el caso de los radiorreceptores realizados con células de rata, el sistema fue heterólogo, mientras que cuando se utilizaron las células humanas transfectadas con el receptor recombinante para la FSH (células 293-hFSHR) el sistema fue homólogo.

Los resultados mostraron que todas las isoformas de los extractos hipofisarios obtenidas mediante el CF, tuvieron curvas de desplazamiento de unión similar a la mostrada por el estándar, esto concuerda con los resultados de estudios previos en los cuales se realizaron ensayos de unión al receptor con isoformas de extractos hipofisarios humanos⁽³¹⁾ e isoformas recombinantes⁽⁴⁵⁾.

El grado de acidez y la carga neta de las isoformas de hFSH están estrechamente relacionadas con la cantidad de ácido siálico terminal en los oligosacáridos unidos a la molécula. En términos generales, a mayor contenido de ácido siálico menor $pI_{(12,13)}$. En trabajos anteriores se ha demostrado que la actividad de unión al receptor de las isoformas de hFSH hipofisiaria tanto de roedores como de primates, disminuye paralelamente con el valor de su pI . Las isoformas con valores más elevados de pI y por lo tanto con una concentración menor de ácido siálico, exhibieron un mayor grado de unión al receptor que aquellas isoformas con pI menores y mayor contenido de ácido siálico^(12,14,28,30).

En la presente tesis también se encontró una correlación entre el pH de elución de las isoformas hipofisiarias de FSH y la relación RRA/I para los ensayos realizados con las

células de la granulosa y con las membranas de testículo, ambos provenientes de rata, en donde la mayor relación RRA/I la presentaron las formas menos ácidas y la menor las más ácidas; sin embargo no se obtuvieron los mismos resultados con los ensayos realizados con las células 293-hFSHR en donde la unión al receptor fue similar para todas las isoformas por lo que no se encontró una correlación entre el pH de las isoformas y el cociente RRA/I ($r=0.491$). Estos resultados sugieren que para la unión al receptor interviene tanto la naturaleza y la estructura química del receptor como el tipo de isoforma de FSH, en donde probablemente jueguen un papel relevante la composición de carbohidratos unidos a la molécula y la estructura peptídica. Si bien no se han detectado aún diferentes isoformas del receptor para la FSH en la rata ni en el humano, sí se ha reportado en la literatura la existencia de distintos transcritos del receptor, y éstos parecen variar en su concentración dependiendo del estado fisiológico del donador. Por ejemplo, estos transcritos varían a lo largo del ciclo estral dependiendo de la fase en que se encuentre el animal⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾, así como a lo largo del ciclo menstrual en la mujer⁽⁸⁹⁾. Los resultados sugieren que probablemente exista una población heterogénea de receptores con diferente afinidad para las distintas isoformas de FSH. Es probable que la ausencia de correlación entre el pH de la isoforma y la relación RRA/I en las células 293-hFSHR se deba a que en estas células únicamente existe una población homogénea de receptores, los cuales al parecer tienen igual afinidad por las distintas isoformas de FSH, independientemente de que cada una de ellas desencadene respuestas celulares de magnitud variable⁽⁹⁰⁾.

Las formas moleculares de hFSH difieren entre sí no sólo en su contenido de ácido siálico, sino también en la composición y arreglo de otros carbohidratos internos y que están unidos a la cadena polipeptídica; dichos carbohidratos son esenciales para la unión de esta gonadotropina a su receptor lo que determina la respuesta biológica final a nivel de la célula blanco.

Debido a que el grupo de isoformas I ($\text{pH}>7.1$) presentó un comportamiento muy distinto con respecto a las demás isoformas se excluyó en el análisis de los resultados

obtenidos, estas isoformas que son pobremente sialiladas, tienen una estructura de oligosacáridos marcadamente diferente a las formas más ácidas⁽³⁰⁾, por lo que la variación en la composición de carbohidratos puede ocasionar diferencias en la unión de las isoformas por los distintos tipos de receptores (granulosa y membranas de testículo de rata) o conferirle ciertas particularidades en su capacidad para activar diversas vías de transducción de señales^(62,76,91).

Algunos investigadores afirman que los diferentes grados de sialilación y sulfatación de los oligosacáridos unidos a las subunidades de la FSH, influyen sólo en la carga neta molecular y en la actividad biológica *in vivo* de la hormona, mientras que no tienen efecto alguno en la unión al receptor y la actividad biológica *in vitro*⁽¹¹⁾. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que existe una estrecha relación entre la unión al receptor y la acidez de la molécula para las células de la granulosa y membranas de testículo de rata.

Las subunidades de la FSH separadas no poseen ninguna actividad biológica, la asociación quizás es un prerrequisito para la expresión de la actividad hormonal. Varios dominios de ambas subunidades son importantes para la unión al receptor y su subsecuente activación^(5,17,18).

La regulación de las isoformas de FSH circulante depende del ambiente endócrino por lo que podemos deducir que seguramente este pleiomorfismo tiene una importancia tanto fisiológica como clínica.

La hipófisis anterior tiene la capacidad de modificar tanto la cantidad como la calidad de la FSH secretada, estos cambios son regulados a través de la interacción concertada entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada. El nivel más importante del control parece ser a nivel hipofisiario en donde dependiendo del estado endócrino, la hipófisis preferencialmente produce y secreta diferentes tipos de FSH. Desde esta perspectiva, la heterogeneidad de la FSH serviría como un mecanismo muy fino de regulación adicional para el control de la función gonadal, en las diferentes condiciones fisiológicas. La distribución final de las gonadotropinas en la circulación es el resultado

de la acción de varios factores de origen hipotalámico y gonadal, por lo que su regulación es multifactorial y compleja. Si la heterogeneidad es importante biológicamente para la regulación de diversos procesos, es posible que las isoformas de FSH tengan diferentes funciones, por ejemplo, las isoformas de menor biopotencia, pero mayor vida media podrían estar más relacionadas en el crecimiento y mantenimiento de los órganos reproductores⁽⁹²⁾; mientras que las isoformas de mayor potencia y menor vida media podrían estar implicadas en eventos agudos, como el inicio de la pubertad y la ovulación.

Aparentemente la heterogeneidad de la FSH juega un papel crucial en los mecanismos reguladores de la función reproductiva. Solamente cuando se defina la importancia funcional de la variabilidad en la estructura de las diversas isoformas de FSH será posible entender con mayor precisión los mecanismos de regulación de diversos procesos fisiológicos en los cuales participan.

CONCLUSIONES

- Las hFSH hipofisiaria es secretada en diferentes formas moleculares.
- Las isoformas de hFSH menos ácidas presentaron una mayor unión al receptor con respecto a las más ácidas en los ensayos de radiorreceptores realizados con células de la granulosa y membranas de testículo de rata.
- Las distintas isoformas hipofisiarias de hFSH presentaron igual unión al receptor en las células 293-hFSHR.

REFERENCIAS.

1. Marshall LA, Monroe SE, Jaffe RB. Physiologic and therapeutic aspects of GnRH and its analogs. In: Martin L, Ganong WF, (Eds). *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press 1988, 239-278.
2. Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 1978, 102: 1325-1338.
3. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50:465-495.
4. Fiddes JC, Goodman HM. Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature (London)*, 1979, 281:351-356.
5. Gharib SD, Wierman ME, Shypnik MA. Molecular biology of the pituitary gonadotropins, 1990, *Endocr Rev*, 11:177-199.
6. Combarrous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev*, 1992,13:670-691.
7. Lustbader JW, Yarmush DL, Birken S. The application of chemical studies of human chorionic gonadotropin to visualize its three dimensional structure. *Endocr Rev*, 1993, 14:291-311.
8. Esch PS, Mason AJ, Cooksey K et al. Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta chain of bovine follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1979, 83:6618-6621.
9. Hard Y, Mekking A, Damm JB et al. Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary rats. *Eur J Biochem*, 1990, 193:263-271.
10. Smith IM, Bishop LA, DeKroon R, et al. Purification and characterization of recombinant human FSH. In: Hunzicker-Dunn M, Schwartz NB (eds) *Follicle Stimulating Hormone*.

Regulation of Secretion and Molecular Mechanisms of Action. Serono Symposia USA, Proceedings. Springer-Verlag, New York, 1992, pp 335-338.

11. Baezinger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988,947:287-306.
12. Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, et al. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod*, 1984, 30:382-387.
13. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, et al. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*, 1988, 38:70-78.
14. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, et al. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod*, 1988, 3:491-501.
15. Hsueh AJW, Bicsak TA, Jia XC, et al. Granulosa cell as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Recent Prog Horm Res*, 1989, 45:209-277.
16. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the cell*. 1994. Garland Publishing, Inc. New York, NY USA, 1294 pp.
17. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endo Rev*, 1983, 4:179-211.
18. Yen SC, Jaffe R. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. W.B. Saunders Co. 3a de USA., 1991, pp 75-108, 115-133, 140-150, 273-308.
19. Findlay JK. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*, 1993, 48:15-23.
20. Rabinovici J, Spencer SJ, Doidi N, et al. Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest* 1992, 89:1528-1536.

21. Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol*, 1994, 100:81-85.
22. Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzma G. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology*, 1993, 132:431-443.
23. Ulloa-Aguirre A, Rees Midgley A, Beitinz IZ et al. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*, 1995, 16:765-787.
24. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, et al. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev*, 1984, 5:76-126.
25. Jia XC, Hsueh AJW. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 1986, 119:1570-1577.
26. Spratt DI, O'dea LSL, Schoenfeld D, et al. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH and testosterone. *Am J Physiol*, 1988, 254:E658-E666.
27. Robertson DM, Cahir N, Findaly JK, et al. The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997,82:889-896.
28. Chappel SC, Bethea CL, Spies HG. Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomologus* monkeys. *Endocrinology*, 1984, 115:452-461.
29. Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P et al. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod*, 1992, 7:23-30.
30. Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Domínguez R, et al. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol*, 1986, 110:539-549.
31. Stanton PG, Robertson DM, Burgon PG et al. Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology*, 1992, 130:2820-2832.

32. Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura M, Jimenez M et al. Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum Reprod*, 1992, 7:1371-1378.
33. Wide L. Evidence for diverse structural variations of the forms of human FSH within and between pituitaries. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1987, 115:7-15.
34. Stockell Hartree A, Renwich GCA. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J*, 1992, 287:665-679.
35. Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*, 1988, 263:36-44.
36. Shome B, Parlow AF, Liu WK, et al. A reevaluation of the amino acid sequence of human follitropin beta-subunit. *J Protein Chem*, 1988, 7:325-339.
37. Sugino H, Takio K, Ward DN. Reevaluation of the amino acid sequence of porcine follitropin. *J Protein Chem*, 8:197-219.
38. Wide L. Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol*, 1989, 123:519-529.
39. 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)* 1986, 112:336-344.
40. 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*, 1990, 127:93-100.
41. Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, et al. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology*, 1993, 132:351-356.
42. Ulloa-Aguirre A, Zambrano E, Méndez JP, et al. On the nature of the follicle-stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch Med Res* 1995, 26:219-230.

43. Padmanabhan V, Lang LL, Sostein J et al. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 67:465-473.
44. Wide L, Albertsson-Wikland K. Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 70:271-276.
45. Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76:885-893.
46. Simoni M, Jockenhovel F, Nieschlag E. Biological and immunological properties of the international standard for FSH 83/575: isoelectrofocusing profile and comparison with other FSH preparations. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1993, 128:281-288.
47. Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, et al. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology*, 1991, 129:1805-1813.
48. Zambrano E, Olivares A, Mendez JP et al. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995,80:1647-1656.
49. Booth RA, Weltman JY, Yankov VI et al. Characterization of FSH secretory burst activity in normal women during the menstrual cycle. Program of the 76th Annual Meeting of The Endocrine Society, Anaheim, CA, 1994, p 405 (Abstract 819).
50. Gudermann T, Nürnberg B, Schultz G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*, 1995, 73:51-63.
51. López BA, Bellinger J, Marshall JM, et al. G protein expression and second messenger formation in human granulosa cells. *J Reprod and Fert*, 1995, 104:77-83.
52. Gudermann T, Nicols C, Levy Fo, et al. Ca⁺⁺ mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate

formation:evidence for parallel activation of two signaling pathways. *Mol Endocrinol*, 1992,6:272-278.

53. Davis JS. Modulation of luteinizing hormone-stimulated inositol phosphate accumulation by phorbol esters in bovine luteal cells. *Endocrinology*, 1992, 131:749-757.
54. Gudermann T, Bimbaumer M, Bimbaumer L. Evidence for dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylate cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca⁺⁺ mobilization. *J Biol Chem*, 1992, 267:4479-4488.
55. Clayton RN. Gonadotrophin receptors. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1996, 10:1-8.
56. Abayasekara DRE, Band AM, Cooke BA. Evidence for the involvement of phospholipase A₂ in the regulation of luteinizing hormone-stimulated steroidogenesis in rat testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1990,70:147-153.
57. Leung PCK, Stell GL. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev*, 1992,13:476-498.
58. Shi QJ, Lei ZM, Rao ChV, et al. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, 1993, 132:1387-1395.
59. Lei ZM, Rao ChV, Kornyei JL, et al. Novel expression of human chorionic gonadotropin-luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology*, 1993,132:2262-2270.
60. Heckert L, Daley IJ, Griswold MD. Structural organization of theFollicle-Stimulating Hormone receptor gene. *Mol Endocrinol*, 1992.6:70-80).
61. Misrahi M, Vu Hai MT, Ghinea N, et al. Molecular and cellular biology of gonadotropin receptors. *The Ovary*. Raven Press Ltd, NY, 57-92.
62. Davis D, Lui X, Segaloff D. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol*, 1995, 9:150-170.
63. Sprengel R, Braun T, Nikolics K, et al. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol*, 1990, 4:525-530.
64. Braun T, Schofield PR, Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J*, 1991, 10:1885-1890.

65. Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeats: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19:415-421.
66. Roth KE, Dias JA. Follitropin conformational stability mediated by loop 2 beta effects follitropin-receptor interaction. *Biochemistry*, 1996, 35:7928-7935.
67. Monaco L, Adamo S, Conti M. Follicle-stimulating hormone modulation of phosphoinositide turnover in the immature rat Sertoli cell in culture. *Endocrinology*, 1988, 123:2032-2039.
68. Hipkin RW, Sánchez-Yagüe J, Ascoli M. Agonist induced phosphorylation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor expressed in a stable transfected cell line. *Mol Endocrinol*, 1993, 7:823-832.
69. Quintana J, Hipkin RW, Sánchez-Yagüe J, et al. Follitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *Biol Chem*, 1994, 269:8772-8779.
70. Bourne HR, Styer L. *Nature*, 1992, 358:541-543.
71. Reichert LE, Dattatreya Murty B. The follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in testis: interaction with FSH, mechanism of signal transduction and properties of the purified receptor. *Biol Reprod*, 1989, 40:13-26.
72. Kusaka M, Tohse N, Nakaya K, et al. Membrane currents of porcine granulosa cells in primary culture: characterization and effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 1993, 49:95-103.
73. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, et al. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 175:1125-1130.
74. Sairam MR, Jiang LG, Yarney TA, et al. Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of receptor which inhibits hormone action. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226:717-722.
75. Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, et al. Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature Sertoli cell. *Mol Cell Endocrinol*, 1991, 79:119-128.

76. Bishop LA, Robertson DM, Cahir N, et al. Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle-stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol Endocrinol*, 8:722-731.
77. Valove FM, Finch C, Anasti JN, et al. Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 1994, 135:2657-2661.
78. Gromoll J, Dankbar B, Sharma RS, et al. Molecular cloning of the testicular follicle-stimulating hormone receptor of the non human primate *Macaca fascicularis* and identification of multiple transcripts in the testis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196:1066-1072.
79. Kelton CA, Cheng SVY, 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*, 1992, 89:141-151.
80. Jones LR, Benker G, Salaciniski PR. Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. 1970. *J Endocrinol*, 82:77-86.
81. Chromatofocusing with polybuffer and PBE, technical booklet series. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia. 38 pp. 1980.
82. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. 1963. *Biochem J*, 89:114-123.
83. Bex FJ, Corbin A. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology*, 1981, 108:273-280.
84. DeLean AP, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 1978, 235:E97-E102.
85. Camp TA, Rahal Jo, Mayor KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endo*, 1991, 5:1405-1417.

86. Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, et al. Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry*, 1996, 35:1358-1366.
87. O'Shaughnessy, McLelland D, McBride MW. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biol Reprod*, 1997, 57:602-608.
88. Maguire SM, Tribley WA, Griswold MD. Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod*, 1997, 56:1106-1111.
89. Tilly J, 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*, 1992, 131:799-806.
90. Zambrano GE. Estudio *in vitro* de la actividad biológica de las isoformas de la hormona estimulante del foliculo humana. TESIS Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM, 1998.
91. Sairam MR, Bhargavi GN. A role for glycosylation of the alpha subunit in transduction of biological signal in glycoprotein hormones. *Science*, 1985, 229:65-67.
92. LaPolt PS, Nishimori K, Fares FA, et al. Enhanced stimulation of follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 79:119-128.