

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

304406

3

2ej

ESCUELA DE BIOLOGIA

Incorporada a la
Universidad Nacional Autónoma de México

"CARACTERIZACION BIOLOGICA DE LAS DIFERENTES
FORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE HUMANA INTRAHIPOFISIARIA
MEDIANTE UN BIOENSAYO IN VITRO"

T E S I S

que para obtener el título de

B I O L O G O

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presenta el alumno:

Manuel Santiago Jiménez Arenas



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Dedicatoria	2
Agradecimientos	4
Introducción	5
Hormona Folículo Estimulante	7
Biosíntesis y Secreción	11
Mecanismo de Acción Hormonal	13
Función	14
Secreción de FSH a lo largo de la vida humana	18
Heterogeneidad molecular de la FSH	20
Antecedentes	24
Bioensayos para FSH	25
Bioensayo por aromatización en células de la granulosa ..	27
Justificación	29
Objetivos	31
Hipótesis	33
Metodología	34
Resultados	41
Discusión	47
Conclusión	51
Apéndices	54
Bibliografía	61

DEDICATORIA

Este trabajo representa el fruto de muchas horas de esfuerzo y dedicación, de muchas penas y alegrías, pero lo verdaderamente gratificante de todo esto es que siempre he tenido la oportunidad de compartirlo con otros, mis padres, mi familia, mis amigos, mis maestros y compañeros; y con todos aquellos que han caminado junto conmigo, vayan pues para todos ustedes los sentires que me llenan en estos momentos en que alcanzo uno de mis más profundos anhelos, quiero que sepan que siempre estarán presentes a donde vaya y formarán parte de lo más profundo de mí.

Porque comparto con ustedes mi alegría quiero dedicarles a todos este trabajo.

A mis padres: porque los amo, porque son mi punto de partida en todo y porque gracias a su amor tengo, no sólo la vida, sino la oportunidad de maravillarme de ella.

A mi hermano: porque comparto contigo René la admiración por lo que nos rodea y por tu apoyo, que aunque callado siempre he tenido presente.

A mis abuelos: Manuel, Concepción, Santiago (q.e.p.d.) y Luisa, por sus sabias enseñanzas y por el orgullo de tener unos abuelos tan maravillosos como ustedes.

A mis familiares: tíos, primos y sobrinas, porque siempre están cerca.

A mis amigos: porque hemos compartido sueños e ilusiones, y porque juntos hemos tratado de hacerlos realidad.

A mis maestros: porque han sido una plataforma para alcanzar un ideal, por su esfuerzo, paciencia, dedicación y confianza.

A mis compañeros: Alma, Beatriz, Cecilia, Franz, Karina, Lorenza, Ma. Eugenia, Nuria, Sebastián y Verónica; porque el haber compartido con ustedes la Biología ha sido de lo mejor que me pudo haber pasado.

A Claudia: porque tú haces que la vida sea completa para mí, porque te amo y te amaré siempre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente, y en todo lo que vale, a quienes hicieron posible la realización de esta tesis profesional.

Al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, mi maestro, bajo cuya dirección se realizó este trabajo, por abrirme al panorama de la investigación en la Biología de la Reproducción, por su confianza, sus enseñanzas y sus regaños siempre tendientes a la superación profesional y académica. Porque me congratulo de formar parte de su equipo de trabajo.

A los compañeros de trabajo del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición, por su apoyo y asesoría constantes. En especial a los Biólogos Ricardo Espinoza, Pablo Damián y Aideé Cravioto, la Q.F.B. Elena Zambrano y la Dra. Laura Díaz, del laboratorio "Mecanismo de Acción Hormonal II", con quienes he tenido la oportunidad de compartir trabajo y amistad. Asimismo, agradezco a las Biólogas Aleida Olivares y Jorgelina Barrios, así como a la Dra. Raquel Faradji por su apoyo y buena disposición.

A la Bióloga Pilar Santos, por asesorar este trabajo con sus valiosos consejos, por su confianza y por haber creído en mí.

A mis maestros en la Escuela de Biología de la Universidad Simón Bolívar, por todas sus enseñanzas y su apoyo, por abrirme las puertas del gran mundo de la Biología.

Al Honorable Jurado, con todo respeto.

A Dios por la oportunidad de llegar a este momento en mi vida, por lo maravilloso y perfecto de Su Creación, y por permitirnos no sólo asombrarnos y gozar de ella, sino por darnos la capacidad de estudiarla para conocerla mejor. Gracias Señor.

I N T R O D U C C I O N

Una de las cualidades específicas de los seres vivos es la capacidad que tienen de reproducirse. En los mamíferos la reproducción involucra una serie de mecanismos sumamente complejos que implican la secreción de una serie de mensajeros químicos conocidos con el nombre de hormonas.

La hipófisis es una glándula de secreción endócrina que se encuentra situada por debajo de la base del encéfalo, y tiene como función la producción y liberación de una serie de hormonas que regulan diversas actividades corporales; éstas van desde el crecimiento hasta la reproducción, función en donde juega un papel fundamental (23, 30, 51). De acuerdo con su origen embrionario, se pueden distinguir en la hipófisis una porción anterior o adenohipófisis, y una posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis está formada de, al menos, seis tipos celulares diferentes (30, 32); éstos se definen en base a sus secreciones particulares, que comprenden las siguientes hormonas:

- somatotropina u hormona del crecimiento (GH)
- prolactina u hormona lactogénica (PRL)
- tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH)
- hormona folículo estimulante (FSH)
- hormona luteinizante (LH)
- hormona adenocorticotrópica (ACTH)
- hormona estimulante de los melanocitos (MSH).

De éstas, FSH y LH son sintetizadas en un mismo tipo celular y son conocidas con el nombre genérico de gonadotropinas, ya que a través de los vasos sanguíneos llegan hasta las gónadas (ovarios y testículos), sus órganos blanco, es decir, los sitios hacia donde dirigen su mensaje con el fin de desencadenar una respuesta biológica específica.

La liberación de las hormonas de la adenohipófisis no es independiente, sino que está vinculada a la regulación que sobre ella ejercen ciertos núcleos del hipotálamo, órgano nervioso localizado en la base del cerebro anterior, a través de la secreción de factores reguladores específicos de naturaleza peptídica, que llegan a la adenohipófisis por medio de una complicada red de vasos sanguíneos. El factor hipotalámico que

controla la liberación de las gonadotropinas se conoce con el nombre de Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH), hasta la fecha no se ha podido disociar a la GnRH de la secreción de ambas gonadotropinas (FSH y LH), por lo que se considera como el único control hipotalámico sobre ellas (86).

De cualquier forma, el control global de la secreción gonadotrópica depende de la interrelación compleja y coordinada entre la GnRH hipotalámica, las propias gonadotropinas adenohipofisiarias y los esteroides sexuales que se producen en las gónadas, mediante una serie de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.

HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE

Los primeros datos que se tienen corresponden a Zondek y Aschein (1925) así como Smith (1926) quienes encontraron, de manera independiente, que la implantación de adenohipófisis frescas en animales previamente hipofisectomizados inducía un crecimiento inmediato y notable en las gónadas. Posteriormente Fevold, Hisaw y Leonard (1931) detectaron dos hormonas estimuladoras de las gónadas en muestras de hipófisis humanas (FSH y LH) (35).

La FSH es una glicoproteína heterodimérica compuesta de dos subunidades designadas como α y β , unidas por una asociación no covalente de alta afinidad que estabiliza la estructura de la molécula. La estructura de la subunidad α es común con aquélla de las hormonas hipofisiarias LH y TSH, así como de la gonadotropina coriónica humana (hCG) que se produce en placenta; mientras que las subunidades β son específicas para cada una de estas hormonas y les confieren especificidad biológica e inmunológica, es decir, dictan la actividad hormonal específica a ser expresada (86). Se pueden visualizar dos funciones principales para la subunidad α después de combinarse con la β ; una es que la subunidad α contiene todos o

parte de los sitios de reconocimiento necesarios para la unión con el receptor en la célula blanco, la otra es que la conformación activa de la subunidad β se logra únicamente después de su combinación con la α (9).

En la actualidad se conocen las secuencias aminoácidas para cada subunidad en diferentes especies animales, incluyendo la humana (35), que tiene 92 aminoácidos en la subunidad α y 118 en la β (9); estas secuencias se consideran importantes para la combinación de ambas cadenas y la unión de la hormona a su receptor. Por otra parte, cada subunidad mantiene estable su estructura tridimensional mediante puentes disulfuro cruzados entre residuos de cisteína (cinco en la subunidad α y seis en la subunidad β), aunque no existen puentes disulfuro intercatenarios. De cualquier manera, la unión entre ambas subunidades es tan estable, que aún cuando FSH está formada propiamente por dos subunidades diferentes, se le considera como una molécula bien definida debido a su especificidad biológica, inmunológica y de unión al receptor en sus células blanco.

Las características químicas generales de la molécula de FSH incluyen además la localización de residuos de oligosacáridos en sitios específicos de ambas subunidades. La FSH humana (hFSH) posee cuatro cadenas laterales de carbohidratos que están unidos a residuos de asparagina (Asn); éstos se encuentran en las posiciones 52 y 78 de la subunidad α así como en las 13 y 30 de la β . Los monosacáridos que constituyen la FSH son: manosa, fructosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y ácido siálico o neuramínico. Cada oligosacárido está ramificado y es aparentemente heterogéneo en su periferia, con bifurcaciones que terminan principalmente en ácido siálico así como en fructosa y probablemente galactosa (2).

El peso molecular de hFSH es de aproximadamente 30,000 daltones (9). La falta de exactitud en este dato resulta, en gran medida, de la heterogeneidad en los grupos de oligosacáridos.

Estructura de los oligosacáridos unidos a Asn.

a) Oligosacáridos sulfatados:

En todos los oligosacáridos unidos a Asn, existe una estructura central común $(\text{Manosa})_3-(\text{N-acetil-glucosamina})_2$. Los oligosacáridos sulfatados son heterogéneos con respecto al número de radicales sulfato y la estructura oligosacárida; de hecho, se ha encontrado que el sulfato está presente invariablemente dentro de la secuencia periférica:

Sulfato-4 N-acetil-galactosamina β 1-4 N-glucosamina β 1-2 Manosa
Los oligosacáridos sulfatados que se han localizado en hFSH, contienen únicamente un residuo de sulfato, y pueden o no llevar dos residuos periféricos unidos a manosa de la estructura central común (2).

Existen radicales de oligosacáridos que contienen un residuo de sulfato y otro de ácido siálico; éstos llevan el sulfato exclusivamente en la rama que surge de una manosa unida al resto de la cadena central común; por su parte, el ácido siálico se encuentra en la rama que nace de otra manosa que también está unida a la cadena central.

b) Oligosacáridos sializados:

hFSH no contiene concentraciones significativas de sulfato y N-acetil-galactosamina, sino en que su lugar posee concentraciones proporcionalmente mayores de ácido siálico y galactosa. Los oligosacáridos sializados son estructuralmente heterogéneos; se encuentran como complejos biramificados con o sin una N-acetil-glucosamina bisectante unida a la estructura central común, así como complejos triramificados.

DISTRIBUCION RELATIVA DE LOS DIFERENTES RESIDUOS DE
OLIGOSACARIDOS UNIDOS A Asn EN hFSH

Residuos de oligosacáridos	% de oligosacáridos totales
Neutrales	10 %
Monosulfatado	2 %
Con un sulfato y un ácido siálico	5 %
Con un ácido siálico	19 %
Con dos ácidos siálicos	39 %
Con tres ácidos siálicos	25 %

(Modificado de Baenziger & Green (2))

Funciones potenciales de los oligosacáridos unidos a Asn

El ácido siálico terminal, protege a las moléculas que lo contienen de la acción degradante de las enzimas hepáticas que se unen a la galactosa presente en las glicoproteínas que carecen de ácido siálico; por esta razón su presencia es de suma importancia para prolongar la vida media de la molécula en el plasma sanguíneo (2).

La remoción de ácido siálico de la molécula de hFSH mediante el tratamiento con la enzima neuraminidasa disminuye la actividad biológica *in vivo* de la hormona debido a su rápida depuración plasmática en comparación con la forma intacta. Por otra parte, la desialización parece no afectar la unión de la hormona a su receptor ni la producción de 3' - 5' adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Aunque existe cierta controversia al respecto ya que las formas moleculares de FSH con menor cantidad de residuos de ácido siálico presentan disminución en su actividad de unión al receptor y potencia biológica en sistemas *in vitro* (68). De cualquier forma, los mecanismos bioquímicos involucrados en la interacción de las gonadotropinas con sus receptores en las glándulas blanco aún no son entendidos del todo, dado que se ha propuesto que además de

la incorporación de ácido siálico, las variaciones en el contenido y/o arreglo espacial de los residuos de carbohidratos interno al ácido siálico juegan también un papel crítico en esta interacción (66, 68, 69).

La deglicosilación completa de FSH mediante tratamientos químicos no altera su capacidad normal de unión al receptor, aunque su capacidad para estimular la producción de AMPc disminuye considerablemente y por ello no induce efectos biológicos. Esto se debe primariamente a la ausencia de oligosacáridos en la subunidad α , dado que los dímeros que consisten de subunidades α deglicosiladas y subunidades β intactas sí inducen la producción de AMPc (2).

BIOSINTESIS Y SECRECIÓN

La FSH es sintetizada y secretada por las células gonadotrópicas de la adenohipófisis. Las subunidades que constituyen la FSH (α y β) se sintetizan independientemente una de la otra, mediante el control genómico de las interacciones entre ARN mensajeros (ARNm) específicos y ARN de transferencia (ARNt) en los ribosomas. Las cadenas proteínicas recién sintetizadas representan formas inmaduras ya que no están glicosiladas y cuentan además con un pequeño fragmento peptídico líder o de señal.

El procesamiento de la forma inmadura de las subunidades a su estado maduro involucra rompimiento del péptido de señal y glicosilación. Ambos eventos requieren la presencia de enzimas microsomales unidas a las membranas del retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi, y ocurren conforme se va formando la cadena peptídica en los polisomas (cambios co-traduccionales) o conforme la hormona se transporta dentro de la célula (cambios post-traduccionales).

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 y también, que sufre un doblamiento

apropiado que le permita adquirir su estructura terciaria. Asimismo, se forman los p-entes disulfuro de la cadena, aunque no son necesarios para el plegamiento específico de la molécula. Simultáneamente, las enzimas que se encuentran en las membranas microsomales transfieren de un dolicol complejos oligosacáridos: (Glucosa)₃- (Manosa)₉- (N-acetil-glucosamina)₂ a residuos específicos de Asn dentro de la cadena polipeptídica. A partir de este momento comienza un procesamiento extensivo de estos oligosacáridos, que continúa cuando la glicoproteína se transporta al aparato de Golgi. La asociación no covalente de las subunidades α y β para formar heterodímeros también tiene lugar en el retículo endoplásmico, después del procesamiento de los oligosacáridos recién unidos.

En el aparato de Golgi se remueven residuos de manosa a través de la acción de la manosidasa, enzima presente en la membrana de este organelo celular. Antes de la secreción se unen los azúcares terminales, que son ácido siálico, fructosa, N-acetil-glucosamina y manosa. Esta glicosilación requiere de las glicosil-transferasas, enzimas que transfieren los carbohidratos de un intermediario nucleótido-azúcar a la proteína. Las variaciones en el contenido de estos azúcares terminales son responsables de la microheterogeneidad de FSH, y parecen estar reguladas a través del control genómico de la expresión de estas enzimas.

Posteriormente, una vez terminado el procesamiento de los oligosacáridos, las glicoproteínas se empaquetan en gránulos de secreción que protegen a las subunidades de la proteólisis y se transportan hacia la periferia celular mediante la intervención de los microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Una vez que han llegado hasta la membrana plasmática se fijan en ella.

La secreción de FSH ocurre por estímulo de la GnRH hipotalámica; la GnRH tiene una vida media de unos cuantos minutos, por lo que se libera intermitentemente en forma de pulsos, los cuales se reflejan en la secreción pulsátil de FSH y LH. Cuando la GnRH se une a sus receptores específicos en el gonadotropo induce la exocitosis de FSH, esto 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.

Se ha demostrado que los gonadotropos contienen una sobreabundancia de subunidades α en comparación con los niveles de la subunidad β ; esto ha llevado a sugerir que la producción de subunidad β limita el proceso de secreción. Por esta razón se asume que la influencia de hormonas (estrógenos y andrógenos) y factores no esteroideos (inhibina) sobre la producción de FSH sea a través de alteraciones en la síntesis de subunidad β (9).

MECANISMO DE ACCION HORMONAL

Las gonadotropinas ejercen sus efectos en las células blanco a través de la unión con receptores específicos; de esta forma se genera una señal bioquímica como respuesta a la formación del complejo hormona-receptor, lo que finalmente se traduce en la producción de AMPc en el interior de la célula. El AMPc induce, mediante una serie de eventos, la respuesta biológica al estímulo gonadotrópico.

Estos receptores cubren, en número de cientos o miles, gran parte de la superficie externa de la membrana plasmática en las células blanco. Los receptores son en sí complejos lipoproteínicos que interactúan con las hormonas correspondientes en el fluido extracelular, uniéndose finalmente a ellas. Esta unión es sumamente específica y de alta afinidad con el objeto de captar las hormonas adecuadas presentes en concentraciones sumamente bajas.

Cuando se forma el complejo hormona-receptor, el receptor presenta un cambio conformacional que se traduce en la activación de un sistema efector asociado a la membrana, éste a su vez desencadena la respuesta celular específica a la estimulación hormonal. Los efectores más importantes para la acción de las gonadotropinas son por una parte, una secuencia enzimática aún no definida del todo, responsable del flujo del calcio a través de la membrana celular y, por otra la enzima adenilato-ciclasa, que conduce a la formación de AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP) (44).

Se considera que la adenilato-ciclasa está compuesta de dos unidades proteínicas; una reguladora y otra catalítica. El receptor y la unidad reguladora están unidos estructuralmente, pero son inactivos hasta el momento que la hormona se une al receptor. Cuando esto sucede, el complejo hormona-receptor-unidad reguladora capta GTP y se acopla posteriormente con la unidad catalítica, formando así una enzima intacta completa. La actividad enzimática se puede regular por la hidrólisis de GTP en GDP, lo que hace que la enzima regrese a su estado inactivo. No es del todo claro si el receptor se asocia solamente con una unidad reguladora de la adenilato-ciclasa, o si varios receptores diferentes se encadenan a una sola unidad enzimática.

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. Las cinasas se encuentran de manera inactiva en forma de tetrameros con dos subunidades reguladoras y dos catalíticas; la unión de AMPc a las subunidades reguladoras hace que se desprendan las catalíticas, con el fin de fosforilar diferentes proteínas y enzimas. En su forma fosforilada algunas enzimas son activadas y otras desactivadas, 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.

FUNCION

La FSH ejerce un control predominante sobre la función de las gónadas, con el fin de regular y mantener la gametogénesis, esteroidogénesis y ovulación, procesos esenciales para la reproducción.

FSH es la responsable primaria de regular los procesos concernientes al desarrollo de las células germinales en las gónadas. Concretamente, estimula el desarrollo de los folículos ováricos en la mujer y de los túbulos seminíferos en el varón, a

través de su acción sobre las células de la granulosa en el ovario y de Sertoli en el testículo, siendo éstas las únicas células blanco que se han encontrado para esta hormona (23).

a) Acción en ovario:

Cuando se inicia un ciclo menstrual un cierto número de folículos ováricos primordiales (aquéllos formados de un ovocito primario rodeado por una capa sencilla de células de la granulosa) comienza a desarrollarse gracias al estímulo de la FSH; esto 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.

Conforme el folículo va madurando, produce una cantidad cada vez mayor de estrógenos por estímulo de la FSH; ésta activa un sistema enzimático a nivel de la mitocondria conocido como aromatasas, y que tiene como función la aromatización de los andrógenos (producidos en las células de la teca interna por estímulo de LH) en estrógenos, principalmente estradiol (hipótesis "dos células - dos gonadotropinas" de Short, 1962). Juntos, FSH y estradiol (E_2), ejercen una acción mitogénica para estimular aún más la proliferación de las células de la granulosa y promover también un aumento en la concentración de receptores de FSH por célula (59, 86).

Bajo la influencia sinérgica de E_2 y FSH hay un aumento en la producción de fluido folicular, que se acumula en los espacios intercelulares de las células de la granulosa; esta acumulación eventualmente da origen a una cavidad llamada antro, y así el folículo hace gradualmente su transición al estado antral; la presencia de E_2 y FSH en el fluido antral es esencial para la acumulación sostenida de células de la granulosa y continuar con el crecimiento folicular, así como la maduración del ovocito. No se sabe aún la razón por la cual entre el grupo de folículos primordiales humanos que comenzaron a desarrollarse, solamente uno de ellos llegará a ser ovulatorio. Se piensa que esto se debe a la creación de un ambiente estrogénico propicio para su crecimiento;

aquellos folículos cuya capacidad de aromatización sea limitada sufrirán un proceso degenerativo que se conoce como atresia (34, 59, 86).

Mientras que el E_2 ejerce una influencia positiva en la acción de FSH dentro del folículo maduro, su efecto de retroalimentación negativa hacia la FSH a nivel hipotálamo-hipofisiario retira el 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, haciendo frente a la disminución en los niveles plasmáticos de FSH inducida por su propia producción acelerada de E_2 . Para ello cuenta con un mayor contenido de receptores para FSH, manteniendo de esta manera el estímulo de la aromatización. En esta etapa, la FSH induce el desarrollo de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo antral. Posteriormente, la concentración de LH se eleva iniciando la luteinización de las células de la granulosa, lo que resulta en la producción de progesterona; conforme esta se eleva y el nivel de E_2 comienza a disminuir, se produce un pico de FSH a la mitad del ciclo, junto con otro de LH de mayor intensidad (retroalimentación positiva), ambos esenciales para completar la maduración del ovocito e inducir la ruptura del folículo y la ovulación (34, 59, 86). El pico preovulatorio de FSH parece ser necesario para la producción de activador de plasminógeno, mismo que se requiere para la conversión de plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica involucrada en la ruptura de la pared folicular (34, 35).

Después de la ovulación, las células de la granulosa de la teca se diferencian en las células luteinizadas que forman el cuerpo lúteo, durante esta fase los niveles de gonadotropinas son los más bajos de todo el ciclo debido a la retroalimentación negativa que ejercen tanto E_2 como progesterona. De no ocurrir el embarazo se presenta la luteólisis unos días después y el ciclo se reanuda nuevamente (59, 86).

b) Acción en testículo.

Los testículos tienen bajo su cargo la síntesis de andrógenos y la producción de espermatozoides. Estructuralmente ambas funciones se encuentran bien separadas, ya que corresponde a las células de Leydig la biosíntesis de andrógenos (principalmente testosterona) y a los túbulos seminíferos la producción de espermatozoides. La adenohipófisis participa en el control de ambas funciones a través de la secreción de FSH y LH, necesarias para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis respectivamente, aunque es la testosterona producida por estímulo de la LH, y no esta última, la que mantiene la espermatogénesis (86).

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

La acción de FSH y testosterona en la espermatogénesis es indirecta a través de las células de Sertoli, las cuales son estimuladas para producir compuestos necesarios para la maduración espermática. Tal es el caso de la proteína fijadora de andrógeno (ABP), que se une a la testosterona con el fin de proveer una reserva de andrógeno útil para el desarrollo de las células germinales. Por otra parte, FSH ejerce un efecto directo sobre las células de Sertoli estimulando la conversión de andrógenos por inducción de la actividad de aromatasa (23).

SECRECIÓN DE FSH A LO LARGO DE LA VIDA HUMANA

La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada comienza a desarrollarse a partir de la etapa fetal. Se ha demostrado la existencia de gonadotropinas en las hipófisis de fetos humanos durante el primer trimestre de gestación (30) y su contenido aumenta progresivamente hasta alcanzar una meseta en la fase media del embarazo, disminuyendo de manera progresiva hasta el momento del parto; los fetos femeninos tienen mayores concentraciones de gonadotropinas que los masculinos. Al término del embarazo las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas han quedado suprimidas por el efecto de retroalimentación negativa que ejercen los esteroides sexuales sintetizados en placenta; después del nacimiento, al eliminarse esta inhibición, las concentraciones de FSH y LH aumentan sus niveles máximos algunos meses después, pero descienden nuevamente en la niñez.

Se han aportado numerosas pruebas que sugieren que el sistema hipotálamo-hipofisiario es tan sensible a la retroalimentación negativa, que aún los bajos niveles de esteroides gonadales a lo largo de la infancia, inhiben la secreción de gonadotropinas hasta el momento de la pubertad (25). Por otra parte se cree que existe un mecanismo neurológico central, independiente de la actividad gonadal, que limita la síntesis y secreción de GnRH durante la niñez (30). Desafortunadamente se desconoce aún como interactúan estos dos mecanismos inhibidores, que parecen ser más fuertes durante la infancia media; sin embargo deben ser suprimidos en algún momento para que al llegar la pubertad, ocurran por una parte la secreción de GnRH hipotalámica y por otra, el aumento en la sensibilidad de los gonadotropos de la hipófisis a ésta, lo que conducirá a un incremento en la secreción de gonadotropinas y, finalmente, a una mayor liberación de esteroides sexuales en las gónadas.

Al inicio de la pubertad aumenta la secreción de gonadotropinas, que se presenta por primera vez durante el sueño de una manera pulsátil. Durante las fases tempranas de la pubertad en las mujeres, las concentraciones de FSH son mayores que las de LH,

pero esta relación se invierte más tarde; en los varones las concentraciones de FSH en plasma aumentan progresivamente, en tanto que las de LH aumentan primero en forma brusca y luego lo hacen más lentamente. Conforme evoluciona la pubertad, los máximos de LH y FSH se alcanzan durante las horas de vigilia y por último, los máximos se presentan en todo momento.

En las mujeres se empieza a desarrollar un patrón cíclico en la liberación de gonadotropinas que permitirá se presente la menarquía, es decir,, la primera menstruación; esta secreción cíclica de gonadotropinas se mantendrá a lo largo de toda la vida reproductiva de la mujer. A diferencia de las mujeres en los varones no existe ciclicidad en la liberación de gonadotropinas, sino que sus concentraciones permanecen constantes, aunque pulsátiles, a lo largo de la vida reproductiva normal. En ambos casos la secreción de FSH y LH ocurre de manera episódica, por efecto de la secreción de GnRH. La pulsatilidad de gonadotropinas es variante a lo largo del ciclo menstrual de la mujer (9).

En el ciclo menstrual normal las concentraciones en suero de LH y FSH comienzan a incrementarse unos días antes de la menstruación; durante los primeros días del ciclo menstrual las concentraciones de FSH aumentan con mayor rapidez que las de LH, alcanzando un máximo en la fase folicular media. Posteriormente FSH disminuye a lo largo de la fase folicular tardía como consecuencia de la retroalimentación negativa que ejercen las concentraciones crecientes de estrógenos producidos por los folículos en desarrollo. De hecho, si sobrepasan un cierto umbral y mantienen sus altos niveles por algunas horas, inducen por retroalimentación positiva el pico preovulatorio de FSH. Los niveles de FSH descienden posteriormente hasta alcanzar en la fase lútea tardía los valores más bajos de todo el ciclo.

Con la edad las funciones gonadales declinan en el ser humano; en la mujer el final de la etapa reproductiva es mucho más marcado que en el varón. Al ocurrir el último periodo menstrual o menopausia, la capacidad de respuesta del ovario a las gonadotropinas está muy disminuida, y por tanto pierden la capacidad para producir estrógenos. Al no haber entonces

retroalimentación negativa, la hipófisis secreta concentraciones muy altas de gonadotropinas, particularmente de FSH. Por su parte, en los varones también aumentan los niveles de FSH debido a la disminución en la producción de testosterona testicular (61).

HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA FSH

La FSH intrahipofisiaria (así como la presente en suero y orina) de varias especies animales, incluyendo la humana, exhiben heterogeneidad por carga y por consiguiente, existen como una serie de formas moleculares o isohormonas que pueden ser separadas por su punto isoeléctrico (pI) mediante técnicas como el isoelectroenfoque (IEF) y cromatoenfoque (CF). Utilizando cualquiera de estas dos técnicas, se han identificado de seis a siete isoformas de FSH en adenohipófisis humanas con valores de pI que van de 7.3 a 3.8 (6, 10, 57, 69); cuando se emplea el CF, se puede detectar un componente adicional ("pico de sal") añadiendo una solución 1 M de NaCl a la columna después de que se han eluido las isohormonas con pI de 4.0 (11, 53).

Estas isoformas de FSH difieren entre sí no solamente en su pI sino también en su abundancia relativa, actividad de unión al receptor y potencia biológica *in vitro*. En general, los componentes de FSH con pIs mayores de 5.5 son menos abundantes pero exhiben potencias biológicas *in vitro* más elevadas que las formas más ácidas (10, 11, 48, 67).

Desde un punto de vista fisiológico, tanto la presencia como la abundancia relativa de estas isoformas dependerá del estado endócrino específico del donador al momento de obtención de la muestra. En la rata, la maduración sexual femenina está acompañada de una producción elevada de isoformas con pIs superiores a 5.0, que tienen mayor actividad biológica *in vitro*, pero menor vida media en la circulación en comparación con las formas más ácidas (6, 10, 48). En cambio, en la maduración sexual masculina se observa la situación opuesta, ya que ocurre un cambio hacia la acidez (a partir de pIs de 4.9 a 4.5, hasta de 4.4 a 4.0),

alrededor del momento de iniciar la espermatogénesis (67). Los extractos hipofisarios provenientes de ratas sacrificadas durante la mañana del proestro, estro y metaestro contienen la producción más elevada de FSH inactiva enfocada dentro de un rango de pH de 7.5 - 5.0. Las hipófisis de machos adultos normales y hembras adultas androgenizadas en el periodo neonatal, contienen predominantemente formas ácidas con pIs menores de 5.0.

En los roedores se puede alterar el perfil de distribución de isoformas de FSH presente en un momento determinado, por medio de manipulaciones farmacológicas específicas (27). Las hipófisis obtenidas de hámsters ovariectomizadas después de administrarles E_2 , contienen las formas de FSH identificadas por CF. Sin embargo, la abundancia relativa de las formas más o menos ácidas, cambia dependiendo del tiempo de exposición a este esteroide. La exposición a corto plazo (20 hrs) se relacione con la presencia de proporciones mayores de las formas más ácidas de FSH en comparación con los controles ovariectomizados; la exposición a E_2 por diez horas más, ocasiona un aumento en la abundancia relativa de las isohormonas menos ácidas. Dado que este cambio hacia las isoformas más básicas se puede prevenir por la administración de fenobarbital (que evita la descarga de GnRH inducida por E_2), se ha sugerido que la producción de isohormonas de FSH, está regulada a través de un sistema sofisticado mediado por los factores de las gónadas e hipotálamo.

Esta hipótesis ha sido apoyada por los estudios en los que se emplearon ratas intactas de ambos sexos, así como hembras androgenizadas en el periodo neonatal (70).

Los datos disponibles sugieren que, al menos en roedores, un patrón cíclico o "femenino" de secreción hipotalámica y gonadal, ocasiona que la hipófisis produzca isohormonas de FSH menos ácidas, mientras que un tipo de secreción tónico o "androgénico", conduce más hacia la producción de formas de FSH fuertemente ácidas. Por lo tanto, existe una dicotomía sexual, en términos del tipo de FSH sintetizadas por la adenohipófisis.

Las diferencias en la heterogeneidad por carga de la FSH intrahipofisaria dependientes del sexo y la edad, también se han

detectado en los humanos (78, 79, 81). Las isohormonas ácidas prevalecen en los individuos de edad avanzada, tanto en varones como en mujeres, pero las formas más ácidas se encuentran en las glándulas obtenidas de mujeres ancianas (78, 79, 81, 83). En concordancia con los estudios llevados a cabo en roedores, la carga media de FSH es más básica en las mujeres jóvenes que en los varones jóvenes (79); en los varones la carga media de la FSH es más básica en las edades de 0.2 a 9 años, y es menor que en los varones de 17 a 42 años. Asimismo, tanto la actividad biológica *in vitro* (11, 43, 84), como la depuración plasmática (80) de las formas de FSH intrahipofisiaria en monos y humanos, aumenta conforme el pI o carga media de la isoforma se torne menos ácida.

Wide (77) y Padmanabhan y cols. (53) han demostrado la heterogeneidad de la FSH circulante en humanos, usando como técnicas de separación, respectivamente la electroforesis de zona y el CF. La FSH proveniente del suero de mujeres premenopáusicas fue menos ácida que aquella de mujeres postmenopáusicas, varones normales, varones castrados y pacientes con disgenesia gonadal (77, 82). La FSH circulante de todos estos sujetos está más negativamente cargada que la FSH intrahipofisiaria (78). En un estudio reciente, subsecuentemente a la administración de GnRH a pacientes con disgenesia gonadal, aparecieron en suero formas de FSH menos cargadas negativamente, con una correlación altamente significativa entre el incremento relativo en los niveles de FSH en suero después del tratamiento con GnRH y la disminución en la movilidad electroforética relativa (82). Esta observación sugiere que la prevalencia de las formas fuertemente ácidas de FSH en suero, detectadas bajo condiciones basales, se puede deber a una sobrevivencia selectiva de las diferentes isoformas liberadas por la hipófisis en la circulación.

Padmanabhan y cols. (53) cromatoenfocaron el suero de mujeres con ciclos ovulatorios normales, demostrando que el patrón de distribución de isoformas de FSH cambió dependiendo de la fase específica del ciclo. El suero de mujeres en la fase ovulatoria contuvo mayor FSH inmunoactiva en el rango de pH de 6.0 a 4.81, en comparación a las muestras de la fase lútea y folicular, en las

cuales la mayor parte de las isoformas se detectaron dentro de un rango de pH menor a 4.81. Por otro lado, la administración del estrógeno sintético dietil-estil-bestrol a una paciente con disgenesia gonadal, indujo un cambio en las isoformas de FSH en suero a un rango básico de pH (53). Wide (77) detectó cambios cualitativos similares en la distribución de isoformas de FSH presentes en las muestras de suero de varones con cáncer prostático tratados con estrógenos. Todas estas observaciones apoyan fuertemente el concepto de que existe una dicotomía sexual con respecto al tipo de FSH producida, y de que esta dicotomía, es altamente dependiente de los esteroides sexuales.

Los estudios tanto en roedores como en primates, indican claramente que los esteroides gonadales y GnRH, actúan en concierto a nivel del hipotálamo e hipófisis regulando las características fisicoquímicas y biológicas de la molécula de FSH a ser liberada de la adenohipófisis en un momento dado.

La significancia fisiológica de la heterogeneidad de FSH aún no está del todo definida; los estudios anteriores indican que la hipófisis tiene la capacidad de regular no solamente la cantidad sino también la calidad de la señal gonadotrópica que produce y libera en un momento dado para llevar a cabo acciones específicas sobre la maduración y función de las gónadas. Por tal motivo la existencia de la heterogeneidad de FSH representaría un mecanismo muy fino que controla la función gonadal.

21

A N T E C E D E N T E S

BIOENSAYOS PARA FSH

Desde que se detectó la FSH por primera vez (Fevold et al., 1931) surgió en los investigadores la necesidad de analizar sus características. Evans y cols. (1939) compararon los efectos biológicos de diferentes preparaciones de gonadotropinas, con base en la estimulación del crecimiento de folículos ováricos en ratas hipofisectomizadas.

En 1953, Steelman y Pohley (60) desarrollaron un bioensayo *in vivo* que se basa en el aumento del peso ovárico, inducido por FSH, en ratas inmaduras pretratadas con hCG; a la fecha es el método clásico para medir la actividad biológica de la FSH presente en preparaciones comerciales de extractos hipofisarios y orina. Subsecuentemente Brown y Well (1965) usaron la respuesta en el peso ovárico de ratones, mientras que otros se valieron de los cambios en el peso uterino de ratas (Brown, 1955) y ratones (Igarashi y Mac Cann, 1966). Siegal y Siegal (1964) aportaron el uso de cambios en la morfología testicular de pollos intactos. De entre todas estas pruebas, el método de Steelman y Pohley (60) es el que se ha usado con mayor frecuencia; se ha demostrado que es una prueba específica y que muestra una relación lineal entre la concentración de FSH y el peso del ovario (Christiansen, 1972), además de que no es una prueba específica de la especie (Parlow y Reichert, 1963).

Los bioensayos *in vitro* para FSH se iniciaron a principios de los años 70 como un esfuerzo de diferentes investigadores para mejorar la sensibilidad de los ensayos, además de desarrollar pruebas que fueran fáciles de llevar a cabo, con mayor reproducibilidad y en menor tiempo que los bioensayos *in vivo*. Los ensayos *in vitro* se basan en los diferentes efectos biológicos de la actividad de FSH sobre las células aisladas de sus tejidos blanco (35).

En comparación con los bioensayos *in vivo*, aquéllos realizados *in vitro* presentan mayor sensibilidad y precisión, reducen la cantidad de hormona necesaria, requieren de un menor número de animales de laboratorio, no son específicos de la especie y, además constituyen una alternativa como métodos analíticos en el estudio

de la actividad biológica de FSH tanto de manera cuantitativa como cualitativa. Los métodos tradicionales para cuantificar FSH se basan en su reactividad inmunológica, como es el caso del radioinmunoanálisis (RIA); sin embargo se ha podido comprobar que la inmuoactividad de FSH no refleja necesariamente los niveles de FSH bioactiva (35) y por esta razón, los bioensayos permiten cuantificar de una manera más clara la actividad biológica de la molécula de FSH.

De cualquier manera, los bioensayos *in vitro* presentan una desventaja con respecto a los estudios *in vivo*, y es que estos últimos consideran la depuración metabólica de la hormona en la circulación.

Los diferentes bioensayos *in vitro* para FSH valoran la incorporación de timidina tritiada en ovarios de ratón (Ryle, 1971; Boggis y Ryle, 1972), la glucosamina tritiada a proteoglicanos en células de la granulosa porcina (Ax y Ryan, 1979), la producción de AMPc en túbulos seminíferos de rata (Rao y Ranachandran, 1975), la producción de activador de plasminógeno en células de la granulosa de rata (Beers y Strickland, 1978) y por último, la estimulación de la actividad de aromatasa tanto en células de Sertoli (Van Damme et al., 1979) como en células de la granulosa (Jia y Hsueh, 1985) de rata. Estos dos últimos, son los ensayos *in vitro* mejor caracterizados y más utilizados para valorar la bioactividad de FSH. Se basan en la capacidad que tiene la hormona para estimular la actividad de aromatasa tanto en células de Sertoli de ratas macho (71) como en las células de la granulosa de ratas hembra (38); en ambas técnicas se ha mejorado mucho la sensibilidad permitiendo el estudio de concentraciones hormonales muy reducidas (39, 52, 74).

Bioensayo por aromatización en células de la granulosa (GAB)

Descrito por Jia y Hsueh (38), el GAB es un bioensayo *in vitro* altamente sensible y específico para FSH que utiliza como tejido blanco las células de la granulosa provenientes de los folículos ováricos preantrales de ratas inmaduras, y como parámetro de respuesta su capacidad de aromatización inducida por el estímulo con FSH. Las células de la granulosa son pretratadas con un estrógeno sintético, el dietil-estil-bestrol (DES), con el fin de estimular la proliferación de estas células. Los cultivos se llevan a cabo en la presencia de androstendiona, DES, insulina, metil-isobutil-xantina (MIX) y hCG; la acción combinada de estas hormonas y factores sirve como base para este bioensayo, ya que resulta en un incremento sinérgico en la respuesta de las células de la granulosa, permitiendo además una sensibilidad 40,000 veces mayor que el bioensayo de Steelman y Pohley y una disminución de 16 veces en la dosis mínima efectiva (38).

El GAB es sumamente específico para la FSH, el tratamiento con GH, PRL, TSH y ACTH no estimula la producción de estrógenos en el bioensayo (39), aunque sin embargo múltiples hormonas y fármacos pueden afectar directamente las funciones de las células de la granulosa, lo que ocasionaría mediciones erróneas de la bioactividad de FSH (estrógenos, andrógenos reducidos, GnRH o proteínas fijadoras de esteroides); la interferencia de LH, hCG, estrógenos y andrógenos está regulada a través de la inclusión de concentraciones saturantes de estas hormonas al bioensayo (35).

Asimismo, el GAB es tan sensible a FSH que permite detectarla en bajas concentraciones sin importar el origen de la hormona, ya que las preparaciones de FSH provenientes tanto de hipófisis como de suero u orina, estimulan a las células de la granulosa. Incluso la respuesta del bioensayo no es específica de la especie animal de la que proviene la FSH (33). Sin embargo es un método que no considera los cambios potenciales en el metabolismo *in vivo* de FSH, aunque sí ha demostrado ser preciso a través del análisis estadístico (35).

Por todas estas razones el GAB se ha constituido en una herramienta de trabajo muy útil para múltiples investigadores en diferentes partes del mundo. Aún cuando se le han hecho algunas modificaciones de acuerdo a necesidades y objetivos específicos, numerosos estudios descriptivos y experimentales se han valido del GAB para determinar la bioactividad de FSH durante los ciclos reproductivos de diferentes especies, sobre todo la humana (7, 15, 17, 25, 39, 40, 61), así como bajo condiciones farmacológicas y patofisiológicas (14, 26, 28, 36, 37, 42, 47, 50, 54, 73, 75), también para medir las concentraciones de FSH en especies animales que carecen de inmunoensayos específicos (15, 49, 72), así como de moléculas recombinantes de FSH (29). De tal manera que el GAB es ya un método de análisis no solamente cuantitativo sino también cualitativo para la FSH, aportando así información sumamente valiosa para el estudio de la endocrinología reproductiva.

JUSTIFICACION

El estudio de las características biológicas de las diferentes isoformas de FSH humana permitirá ampliar el conocimiento acerca de su papel dentro de la regulación endócrina del eje hipotálamo - hipófisis - gónada y sus complejas relaciones; sobre todo contribuirá al avance en el entendimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos que controlan la maduración folicular y la ovulación. Aunque ya hay información disponible al respecto, estos datos son sumamente limitados.

Considerando la estrecha relación que existe entre las propiedades fisicoquímicas de las isoformas gonadotrópicas y sus atributos biológicos, parece claro que las diferencias en la carga y el pI entre las diversas isoformas pueden por sí mismas tener implicaciones clínicas. De particular interés sería la calidad del estímulo gonadotrópico recibido por el ovario durante la inducción exógena del desarrollo folicular, el tratamiento convencional consiste en la administración de FSH urinaria que aunque es útil y efectiva para la inducción de la maduración folicular, se encuentra lejos de imitar el tipo cambiante de la señal hipofisiaria que ocurre hacia la gónada.

Aún cuando se requieren estudios adicionales para definir con mayor precisión la estructura química de las diferentes isoformas, así como para elucidar los mecanismos que controlan su biosíntesis y acción, 'al igual que los cambios diarios en su secreción; solamente a través de los conocimientos que se plantean en trabajos como éste será posible diseñar nuevas estrategias terapéuticas que permitan solucionar los problemas a los que se enfrentan los especialistas en infertilidad.

OBJETIVOS

A. GENERAL:

Caracterizar la potencia biológica *in vitro* de las diferentes isoformas de FSH humana intrahipofisiaria.

B. ESPECIFICOS:

- Determinar el patrón de heterogeneidad por carga eléctrica de la FSH presente en extractos de hipófisis humanas mediante separación por cromatoenfoque.

- Estudiar la actividad biológica *in vitro* de las isoformas de FSH presentes en extractos de hipófisis humanas, utilizando como parámetro de respuesta la aromatización en células de la granulosa de rata.

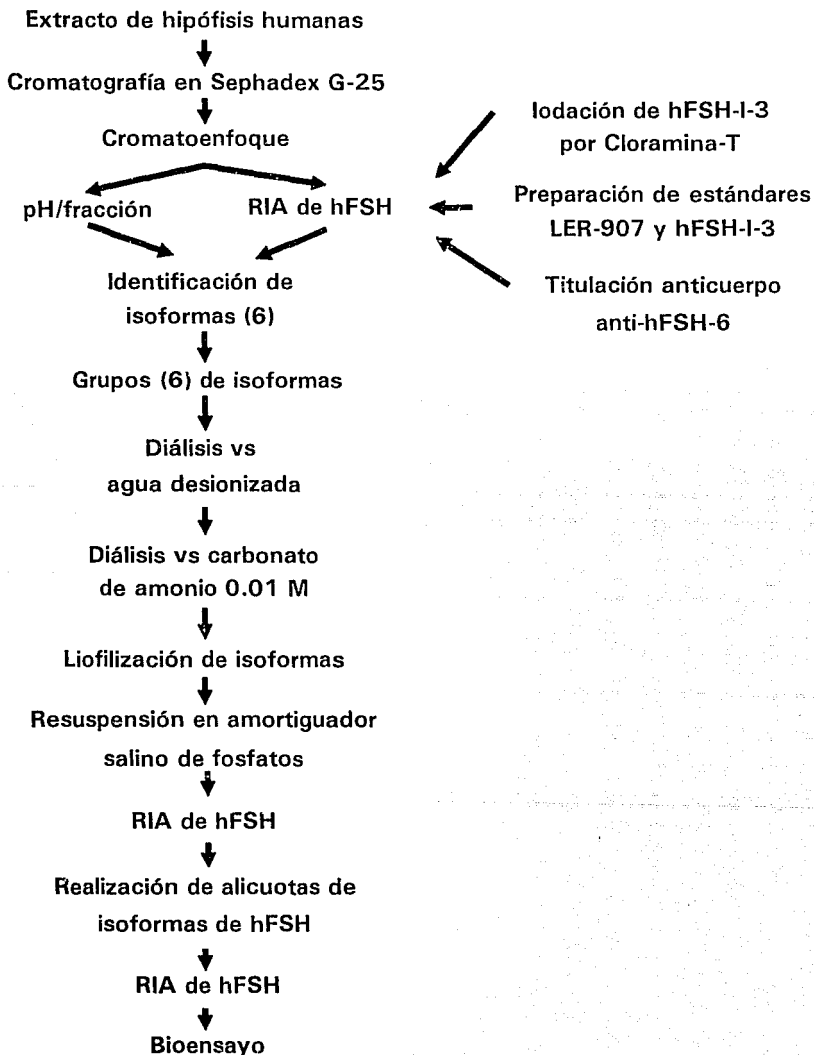
- Comparar las características biológicas de las diferentes isoformas de hFSH intrahipofisiaria.

H I P O T E S I S

La FSH humana es producida y secretada por la adenohipófisis en diferentes formas moleculares, la actividad biológica *in vitro* de cada isohormona variará dependiendo de sus características fisicoquímicas.

M E T O D O L O G I A

OBTENCION DE ISOFORMAS DE hFSH PARA BIOENSAYO



Extractos hipofisiarios

Se colectaron durante autopsia las hipófisis humanas de cuerpos examinados antes de cumplir 72 horas del fallecimiento, y conservados a 8°C a partir de las 3 - 4 horas posteriores a la muerte. Las hipófisis se almacenaron a -20°C hasta el momento de preparar los extractos de glicoproteínas totales en adenohipófisis, mismos que se obtuvieron siguiendo el método de Jones y cols. (41) y se conservaron a -70°C.

Cromatoenfoque

(Apéndice # 1)

Las muestras de extractos hipofisiarios, conteniendo aproximadamente 5.6 mg. de hFSH inmunoreactiva, se equilibraron con el buffer eluente Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, E.U.A.) diluidon 1:8 en agua deionizada, pH 4.0, a través de cromatografía por filtración en gel, usando Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) en microcolumnas de 6.7 X 0.6 cm. (Pharmacia Fine Chemicals).

Posteriormente, se llevaron a cabo los cromatoenfoques empleando como intercambiador iónico la resina PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals) en columnas de 30 X 1 cm. (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, E.U.A.) equilibradas con 15 volúmenes del buffer de partida imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4. Antes de colocar las muestras se corrieron 5 ml. del buffer eluente con el fin de evitar la exposición de la muestra a valores extremos de pH. A una temperatura de 4°C se colectaron, con el auxilio de un colector RediRac (LKB-Produkter AB, Bromma, Suecia), entre 110 y 130 fracciones de 2 ml. cada una manteniendo un flujo de 0.25 ml. por minuto. En el momento que alguna de las fracciones alcanzaba un valor de pH \leq 4.0 el buffer eluente se cambiaba por una solución de NaCl 1 M, para recuperar cualquier material que no hubiera eluido dentro del rango de pH 8.0 a 4.0. Hecho esto, se colectaban 15 o 20 fracciones adicionales del mismo volumen que las anteriores, y se procedía a medir el pH de cada una de las fracciones colectadas a lo largo de todo el corrimiento, utilizando para ello un

potenciómetro Φ I 31 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, E.U.A.). Por último, se congelaron y almacenaron a -20°C hasta el momento de ser cuantificadas por RIA de hFSH. Las recuperaciones de hFSH obtenidas por este método fueron de 79 ± 4 % de la concentración total aplicada a cada columna.

RIA de hFSH

(Apéndice # 2)

Primeramente se procedió a radiomarcarse hFSH-I-3 del NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, E.U.A.) con NaI^{125} (Amersham International Limited, Amersham, Reino Unido), por el método de Cloramina-T descrito por Greenwood y cols. (31) (Apéndice # 3); posteriormente la hormona radiomarcada y el I^{125} libre se separaron por cromatografía de exclusión en una columna de Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, E.U.A.).

Los RIAs para hFSH se llevaron a cabo haciendo uso de los estuches provistos por NIADDK, utilizando las preparaciones de referencia LER-907 o hFSH-I-3 para construir la curva estándar y anti-hFSH-6 como reactivo de unión inmunológica. El contenido de hFSH en cada una de las fracciones obtenidas después de siete corridas diferentes de cromatoenfoco, se expresó en términos del estándar LER-907; estas determinaciones permitieron la identificación de las isohormonas separadas en cada cromatoenfoco.

Hecho esto se procedió a formar pozas de las fracciones con mayor contenido de cada isohormona; cada grupo o poza fue transferido por separado a bolsas de membrana para diálisis con un límite permisible de permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, E.U.A.) y dializados durante 24 horas a 4°C contra agua deionizada y posteriormente, bajo las mismas condiciones contra una solución de carbonato de amonio 0.01 M (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, E.U.A.), pH 7.4. Posteriormente, cada uno de los grupos se secó en frío (-70°C) mediante una liofilizadora (Labconco Corp., Kansas City, MO,

E.U.A.) para ser resuspendidos en 1/10 - 1/20 del volumen original con buffer salino de fosfatos (PBS) al 0.01 M, pH 7.4. Los concentrados fueron cuantificados nuevamente por RIA de hFSH tanto en términos de LER-907 como de hFSH-I-3 y almacenados a -20°C en alícuotas de 10 a 25 μ l. hasta el momento de determinar su actividad biológica *in vitro*.

Bioensayo por aromatización en células de la granulosa de rata
(Apéndice # 4)

La actividad biológica *in vitro* de los concentrados correspondientes a cada una de las isoformas de hFSH se determinó empleando el bioensayo por aromatización en células de la granulosa de rata (GAB) descrito por Jia y Hsueh (38) con algunas modificaciones mínimas.

Las ratas hembra intactas (Wistar) de 21 a 22 días recibieron un implante de cápsulas silásticas de 10 mm. (Dow Corning, Midland, MI, E.U.A.) conteniendo aproximadamente 10 mg. de dietil-estilbestrol (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, E.U.A.). Cuatro días después, los animales se sacrificaban por dislocación cervical, los ovarios se disectaban y descapsulaban, y por último los folículos eran puncionados con agujas hipodérmicas de 27 X 13 mm. y las células de la granulosa lavadas y centrifugadas. Las células se diluían en el volumen final que correspondiera a 80,000 células totales por 50 μ l. de suspensión, previo conteo en hemocitómetro.

El medio de bioensayo se preparó con el medio 5A de Mac Coy sin suero (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, E.U.A.), al que se añadieron varios reactivos. En base al uso de 400 μ l. de este medio para un volumen final de incubación de 500 μ l. de medio por pozo de cultivo (debido a que se añaden 50 μ l. de muestra y 50 μ l. de la suspensión de células) en placas con 24 pozos de 16 mm. (Gibco Laboratories), las concentraciones finales de los diferentes reactivos utilizados fueron las siguientes: 100 U/ml. de penicilina G sódica, 100 μ g/ml. de sulfato de estreptomycin (Laboratorios Pisa S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México), L-glutamina 2 mM, androstendiona 10 μ M, DES 10^{-7} M, MIX 0.125 μ M

(Sigma Chemicals Co.), 1 $\mu\text{g/ml}$. de insulina bovina (Eli Lilly y Cía de México, México, D.F.) y 30 ng/ml. de hCG (Pregnyl, N. V. Organon, Oss, Holanda). Como estándar se utilizó hFSH-I-3 (NIADDK).

Los andrógenos actúan como sustrato de las aromatasas, y como parte del mecanismo por el cual FSH aumenta la actividad de esta enzima (20). Los estrógenos aumentan la estimulación de FSH sobre las aromatasas, de tal manera que sirven como un producto final, y amplificador de su propia producción (1). Por otra parte, se ha demostrado que dosis altas de insulina incrementan la estimulación de FSH sobre la producción de estrógenos en las células de la granulosa (21); a su vez, MIX inhibe la acción de la fosfodiesterasa, enzima que hidroliza el AMPc bloqueando su mensaje, en las células de la granulosa incrementa los niveles de AMPc y se eleva la síntesis de estrógenos (76). Por último, la concentración saturante de hCG que se incluye en el bioensayo minimiza los efectos de la LH que pudiera estar presente en las muestras problema, ya que bloquea los receptores para LH/hCG (35).

La bioactividad *in vitro* de cada uno de los concentrados de las isoformas de hFSH se estimó usando cuatro o seis diluciones diferentes, en incubaciones por triplicado. Los cultivos se llevaron a cabo durante 72 horas a 37°C en un incubador húmedo provisto de una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Posteriormente, los medios de cultivo fueron centrifugados y almacenados a -20°C hasta el momento de cuantificar por RIA los estrógenos producidos *in vitro*. Para ello se usó un anticuerpo contra estrona, provisto amablemente por el Dr. George Flikinger de la Universidad de Pennsylvania, E.U.A.; que dada su reactividad cruzada con 17- β -estradiol (22%), los resultados fueron expresados en términos de ng. de estrógenos totales producidos por pozo de cultivo.

La actividad biológica aparente de cada uno de los concentrados de isoformas de hFSH se expresó como la relación entre las actividades biológica e inmunológica (B/I), es decir, la actividad observada en el bioensayo *in vitro* relativa a la actividad en el RIA. Los coeficientes de variación fueron menores del 10 y 20%, respectivamente.

Las diferencias entre grupos fueron analizadas por análisis de varianza de una vía, seguido por pruebas de T. Valores < 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

R E S U L T A D O S

La separación de las glicoproteínas presentes en extractos hipofisarios mediante cromatoenfoque demostró la presencia de diferentes picos de hFSH inmunoactiva dentro de un rango de pH de 7.6 - 3.8, así como en aquellas fracciones recuperadas después de la adición de una solución 1 M de NaCl, y designadas como "pico de sal" (Figura 1). Como puede observarse, la mayor parte de la hFSH aplicada a los cromatoenfoques fue recuperada en los valores de pI menores de 4.5 y dentro del pico de sal ($75.3 \pm 3.0\%$ de la inmunoactividad total). Las fracciones que contenían las concentraciones más elevadas de hFSH dentro de un mismo pico o de los picos menores adyacentes, se mezclaron y agruparon separadamente en cinco pozas diferentes y otra más correspondiente al pico de sal, de acuerdo a la siguiente Tabla:

Grupo	pI	% de recuperación total
I	7.6 - 7.1	1.5 \pm 0.13 %
II	5.9 - 5.3	8.9 \pm 1.60 %
III	5.0 - 4.7	14.4 \pm 1.40 %
IV	4.5 - 4.1	54.8 \pm 4.90 %
V	3.9 - 3.8	3.67 \pm 0.90 %
VI	pico de sal	16.8 \pm 4.80 %

Los seis grupos fueron concentrados como se describió en "Metodología", y utilizados más tarde para los estudios de actividad tanto inmunológica como biológica *in vitro*.

Cuando se analizaron por RIA, todos estos concentrados desplazaron la hFSH marcada con I^{125} del anticuerpo de manera paralela a los estándares de hFSH (LER-907 y hFSH-I-3) (Figura 2).

En cuanto a su actividad biológica *in vitro*, todos los concentrados de las isoformas de hFSH fueron capaces de inducir la producción de estrógenos por las células de la granulosa en cultivo de manera dosis - dependiente (Figura 3). De acuerdo con los resultados obtenidos, la actividad biológica *in vitro*, expresada

como la relación de actividades biológica e inmunológica (B/I), varió de acuerdo con el valor de pI específico para cada uno de los concentrados de hFSH examinados tal y como se indica en la siguiente Tabla, en donde los valores de pI se expresaron en unidades de pH y los de B/I como la media \pm la desviación estándar correspondiente a tres o cuatro observaciones por grupo.

Concentrado	pI	Relación B/I
I	7.6 - 7.1	1.65 \pm 0.20
II	5.9 - 5.3	2.77 \pm 0.11
III	5.0 - 4.7	2.01 \pm 0.13
IV	4.5 - 4.1	1.55 \pm 0.13
V	3.9 - 3.8	0.83 \pm 0.20
VI	pico de sal	1.21 \pm 0.32

Como se puede apreciar en la Tabla anterior, los concentrados de las isoformas de hFSH con valor de pI de 5.9 - 4.7 exhibieron actividades biológicas mayores en comparación con los componentes más ácidos (pI menor o igual a 4.5) ($p < 0.05$). Y por otra parte, la hFSH (pI 7.6 - 7.1) presentó una relación B/I similar a aquella de las isoformas de hFSH con pI de 5.0 - 4.1 y el pico de sal, en tanto que el concentrado de isoformas con valor de pI de 3.9 - 3.8 mostró la relación más baja ($p < 0.05$ vs. isohormonas con pIs 7.6 - 4.1 y menor a 3.8).

Figura 1. Perfil representativo de distribución por pH de la hFSH inmunoactiva presente en extractos hipofisarios después de su cromatoenfoque. Las fracciones agrupadas para obtener los concentrados de las isoformas I a VI están señaladas por las líneas horizontales superiores. La flecha indica la adición de NaCl 1 M a la columna de CF.

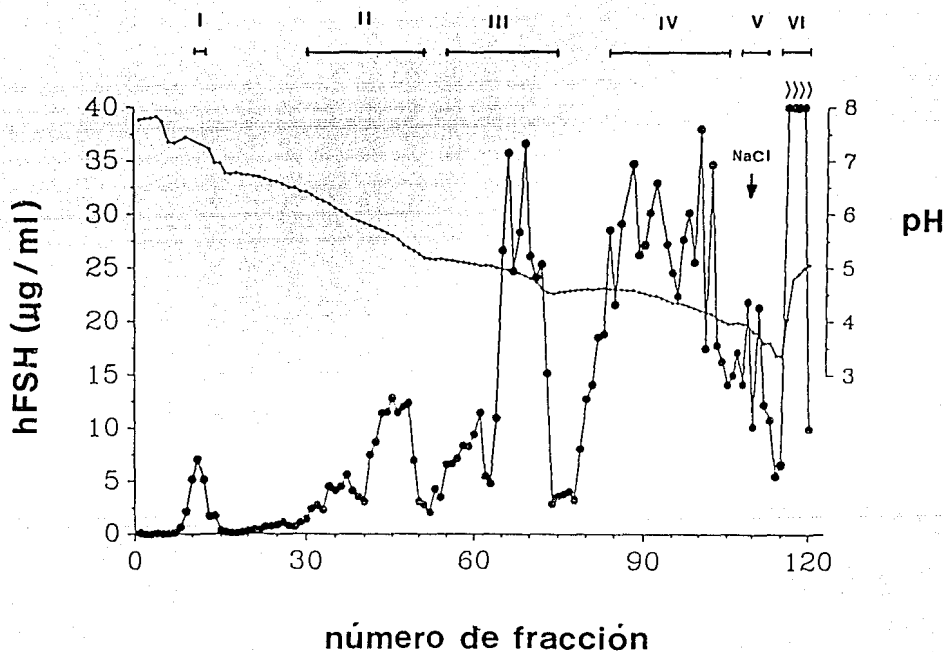


Figura 2. Capacidad de cada concentrado de las isoformas de hFSH para desplazar la hFSH-I-3 marcada con I_{125} del anticuerpo en el sistema de RIA utilizado en este estudio. Las muestras de cada concentrado fueron diluidas de tal forma que la mayoría de las dosis incluídas fueron detectadas en la porción lineal de la curva estándar.

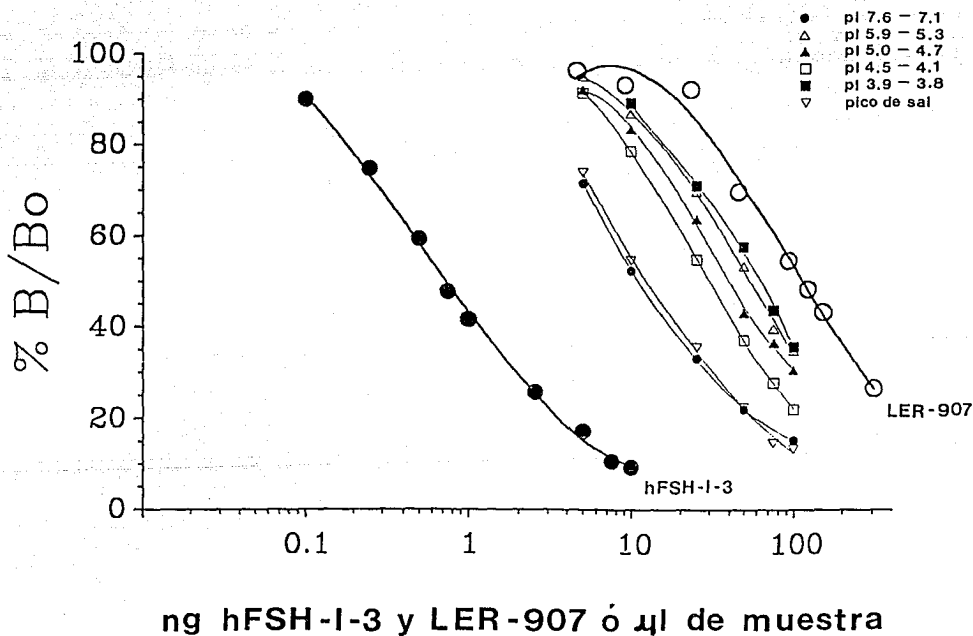
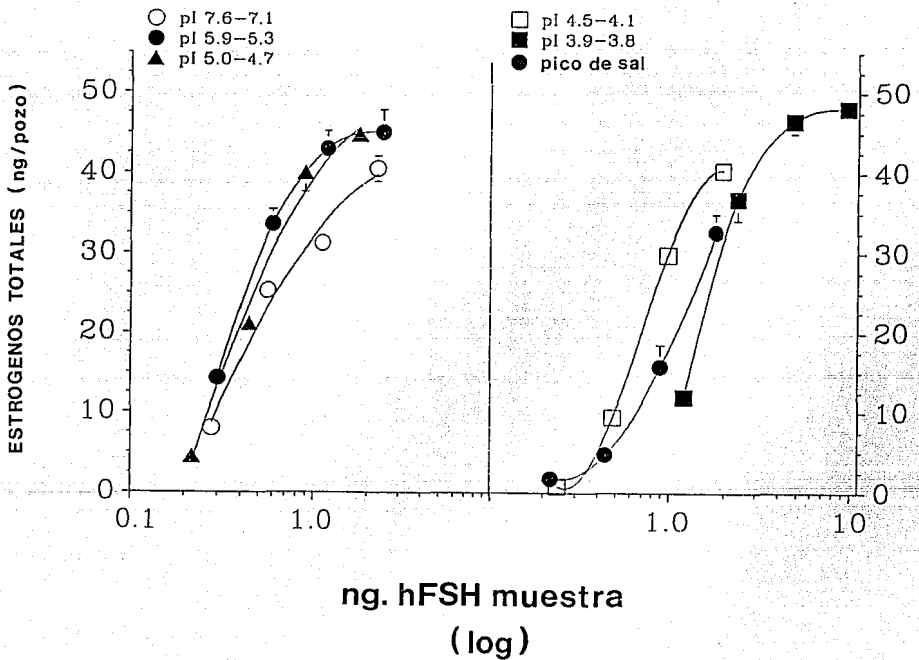


Figura 3. Capacidad de las isoformas de hFSH para inducir la producción in vitro de estrógenos en células de la granulosa de rata. Cada dosis está expresada en términos del estándar hFSH-I-3 (NIADDK) determinada por RIA, asumiendo que la potencia inmunológica es la misma para todos los concentrados.



D I S C U S S I O N

Es evidente que la FSH es heterogénea y existe en múltiples formas moleculares dentro de la hipófisis de numerosas especies, incluyendo la humana (55, 78, 79, 83). La base para esta heterogeneidad parece ser el grado de incorporación de residuos de ácido siálico a la molécula de FSH, mismo que afecta las propiedades fisicoquímicas y biológicas de sus isoformas (68). El fraccionamiento de la FSH humana es posible tomando como base las diferentes cargas eléctricas de sus isoformas. El perfil de distribución por pH de las isoformas aisladas en el presente estudio, concuerdan con informes previos para FSH humana separadas por isoelectroenfoque (12, 87), electroforesis de zona en suspensión de agarosa (78, 79), así como cromatoenfoque (16, 53). Asimismo el perfil por cromatoenfoque encontrado para la FSH presente en extractos de hipófisis humanas, resultó ser similar a aquéllos informados por Chappel y cols. (12), en cuanto a que la mayor parte de la hFSH hipofisiaria se recuperó dentro de valores de pI menores a 5.2.

De igual forma, este perfil de cromatoenfoque fue también muy similar a los detectados por Chappel y cols. (11) en extractos hipofisiarios obtenidos de hembras ovariectomizadas del mono *Cynomolgus* (Macaca fascicularis), pero discretamente diferentes a los reportados por Khan y cols. (43) para preparaciones de hipófisis del mandril (Papio hamadryas), donde la mayor parte de la FSH se enfocó en valores de pI mayores de 5.0 usando el isoelectroenfoque como método de separación. Estas diferencias se pueden deber, ya sea a variaciones en el contenido y/o distribución de carbohidratos entre las moléculas de FSH de las hipófisis del mandril (P. hamadryas) y aquéllas presentes en las hipófisis humanas y del *Cynomolgus* (M. fascicularis), o bien, a la diferente resolución de las técnicas de separación empleadas en cada estudio.

Como ya se describió en la sección de "Resultados", las isoformas de hFSH con valores de pI de 5.9 a 4.7 exhibieron las actividades biológicas *in vitro* más altas, en comparación con aquellas isoformas con valores inferiores de pI, de acuerdo al bioensayo de aromatización en células de la granulosa de rata. Estos resultados concuerdan ampliamente con el estudio realizado

por Padmanabhan y cols. (53), quienes mediante el bioensayo por aromatización en células de Sertoli de rata, analizaron la potencia biológica *in vitro* de la hFSH extraída de un tumor hipofisiario, obteniendo la mayor bioactividad para las isoformas con un rango de pI de 6.0 a 4.8; aunque cabe aclarar que los valores obtenidos en este trabajo corresponden a los de extractos de hipófisis provenientes de individuos normales, y que se usaron diferentes metodologías de bioensayo. Sin embargo, nuestros resultados contrastaron con los informes sobre preparaciones hipofisiarias de hámster (48) y mandril (43), en los que las especies de FSH con valores de pI mayores a 6.0 exhibieron las biopotencias más elevadas. Las causas de esta discordancia podrían ser las siguientes:

- 1) La presencia de curvas dosis - respuesta no paralelas entre las isoformas de FSH y las preparaciones de referencia en los bioensayos que llevaron y cabo Miller y cols. (48) así como Khan y cols. (43).
- 2) El uso de sistemas heterólogos de inmunoensayo, como los que utilizaron ambos grupos de investigadores.
- 3) La existencia de diferencias interespecies en la estructura de los oligosacáridos de la molécula de FSH.

De hecho, incluso la concentración de la hormona es importante, ya que Blum y cols. (5) encontraron que las isoformas ácidas de la FSH proveniente de la hipófisis de rata, exhibieron una relación B/I menor de 1 a bajas concentraciones, mientras que la misma relación alcanzó valores cercanos a 3 con concentraciones mayores de FSH.

Estudios previos han demostrado que la actividad de unión al receptor de las isoformas de FSH hipofisiaria presentes en roedores y primates disminuye paralelamente con el valor de su pI (10, 11, 64, 66, 67, 68). En estos estudios se encontró una estrecha correlación entre el valor de pI de cada isoforma, su actividad de unión al receptor y su contenido de ácido siálico; las isoformas con valores más elevados de pI y por lo mismo 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 (66, 69). Estos investigadores utilizaron el ensayo por radiorreceptor (RRA) descrito por Bhalla y Reichert (4) con las modificaciones hechas por Ulloa-Aguirre y Chappel (64), para determinar la actividad de unión al receptor y con ello estudiaron la actividad biológica de las isoformas de FSH separadas por isoelectroenfoque. Es en el presente trabajo que se emplea por primera vez el bioensayo *in vitro* por aromatización en células de la granulosa (GAB) para determinar la bioactividad de las isoformas de FSH presentes en extractos de hipófisis humanas. De cualquier forma, y de acuerdo con los datos anteriores, podríamos inferir que las isoformas de hFSH con pI de 5.9 a 4.7, es decir, aquéllas que presentaron los valores más elevados de pI en este estudio, sean las isoformas con mayor actividad de unión a los receptores en las células de la granulosa de rata.

Con respecto a lo anterior fue interesante el haber encontrado una bioactividad *in vitro* similar entre la hFSH neutral (pI 7.6 - 7.1), de bajo contenido de ácido siálico, y aquellas isoformas ricas en este carbohidrato. Esta observación se puede explicar en base a que las diferentes formas moleculares de la FSH difieren entre sí no únicamente en su contenido de ácido siálico, sino también en la composición y arreglo de otros carbohidratos internos a este azúcar terminal y que están unidos a la cadena polipeptídica; dichos carbohidratos son esenciales para la unión de las gonadotropinas a su receptor (8, 22, 68), lo que en consecuencia les permitiría determinar la conducta biológica final de la molécula de hFSH a nivel de la célula blanco.

De cualquier forma, en este trabajo se ha podido demostrar que cada una de las isoformas de hFSH intrahipofisaria exhibe una potencia biológica *in vitro* particular, y que ésta guarda una estrecha relación con su pI

C O N C L U S I O N

Se ha podido establecer que el entorno endócrino que rodea a la hipófisis determina no solamente la cantidad sino la calidad del estímulo dirigido hacia las gónadas. La FSH es una hormona gonadotrópica de estructura glicoprotéica que presenta una heterogeneidad molecular basada, al parecer, en su contenido de carbohidratos, sobre todo de ácido siálico. Esto le confiere a la molécula de FSH una heterogeneidad por carga y son precisamente estas diferencias por carga en las isoformas las que permiten su separación.

Dentro del estudio del polimorfismo gonadotrópico, sobre todo con respecto a la FSH, hay varios aspectos que vale la pena destacar y que es muy importante tomar en cuenta; estos son la especie animal y el estado endocrinológico de los individuos en estudio, la fuente de la que se obtiene la hormona, el método de separación empleado y por último el método de valoración a utilizar para determinar su actividad inmunológica y/o biológica. De acuerdo con los puntos anteriores tenemos que en este trabajo hemos estudiado a la FSH humana, cuya fuente de obtención han sido los extractos hipofisarios de individuos normales y el método de separación ha sido el cromatoenfoque; con esto como base, se determinó la actividad biológica de las isoformas que fueron detectadas empleando para ello el bioensayo por aromatización en células de la granulosa (GAB). Por lo que este trabajo vendría a constituirse como el primer reporte de que se tiene conocimiento, en el uso del GAB para determinar la bioactividad de las isoformas de hFSH en extractos hipofisarios de individuos normales.

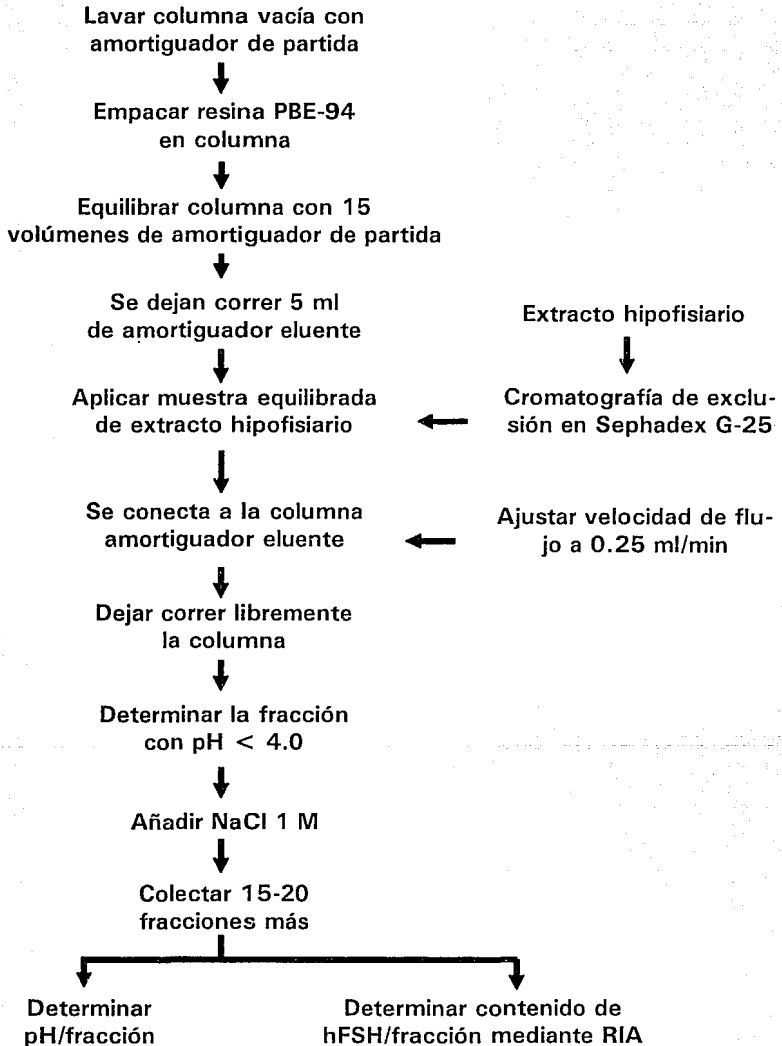
Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la adenohipófisis humana contiene un número significativo de isoformas de FSH que pueden ser separadas de acuerdo a sus cargas eléctricas. Para la mayor parte de las diferentes formas moleculares de la hFSH intrahipofisaria separadas por cromatoenfoque, existe una estrecha relación entre sus propiedades fisicoquímicas (pI) y su actividad biológica *in vitro*.

Aunque el significado biológico de la heterogeneidad de las hormonas gonadotrópicas permanece aún desconocido, el estudio de las propiedades biológicas características de cada isoforma podría contribuir al mejor entendimiento de los cambios que ocurren en la distribución relativa de estas isohormonas y de la intensidad del estímulo gonadotrópico durante diversas condiciones fisiológicas, tales como la maduración sexual y el ciclo menstrual.

A P E N D I C E S

APENDICE # 1

CROMATOENFOQUE



ANEXO AL APENDICE #1

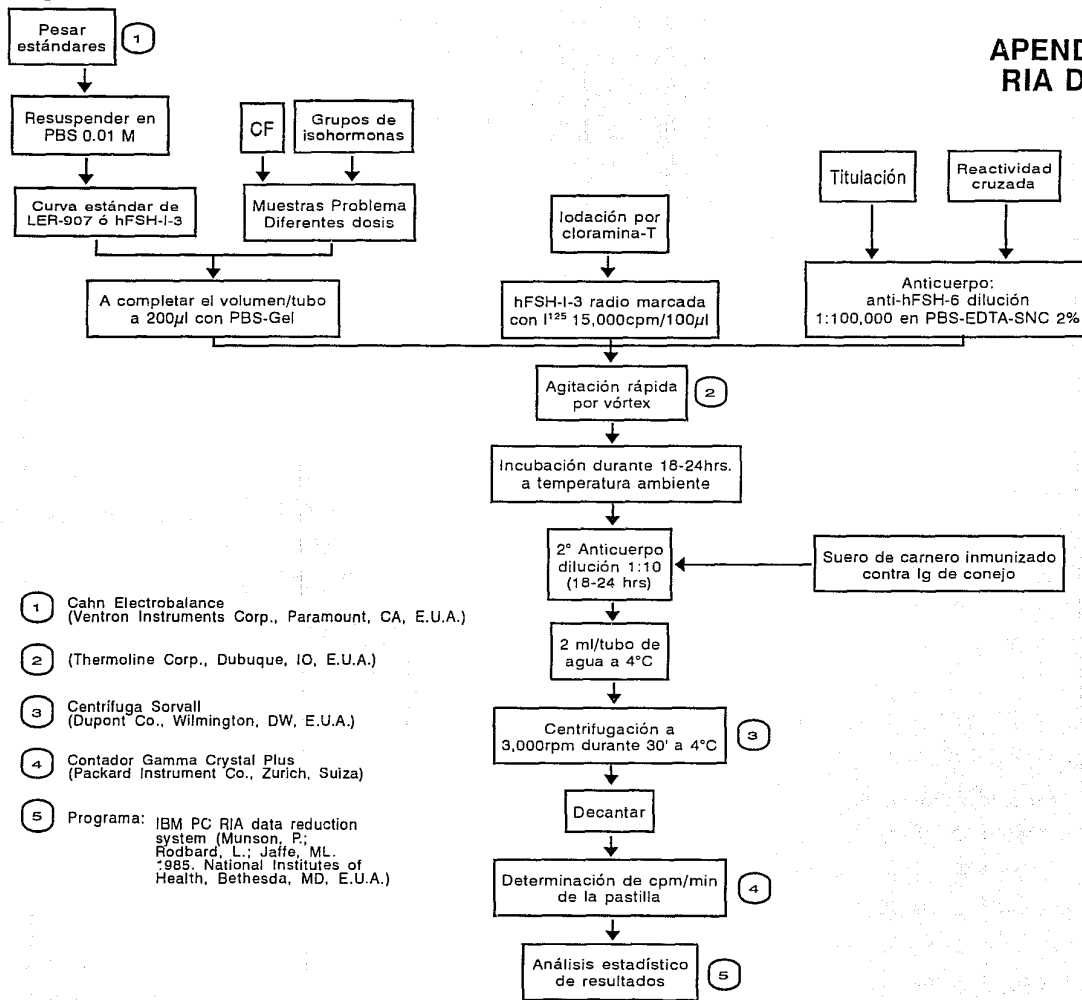
Soluciones para cromatoenfoco:

- 1.- Amortiguador de partida (imidazol 0.025 M/HCl, pH=7.4
1.7 g imidazol (1,3-diazo-2,4-ciclopentadieno)
2 ml de ácido clorhídrico concentrado
950 ml de agua deionizada

- 2.- Amortiguador eluente (Polybuffer 74 1:8), pH=4.0
30 ml Polybuffer 74
210 ml de agua deionizada

- 3.- Cloruro de sodio 1 M

APENDICE # 2 RIA DE hFSH



1 Cahn Electrobalance (Ventron Instruments Corp., Paramount, CA, E.U.A.)

2 (Thermoline Corp., Dubuque, IO, E.U.A.)

3 Centrífuga Sorvall (Dupont Co., Wilmington, DW, E.U.A.)

4 Contador Gamma Crystal Plus (Packard Instrument Co., Zurich, Suiza)

5 Programa: IBM PC RIA data reduction system (Munson, P.; Rodbard, L.; Jaffe, ML. 1985. National Institutes of Health, Bethesda, MD, E.U.A.)

ANEXO AL APENDICE #2

BUFFERS PARA RIA DE hFSH

FOSFATO DIBASICO DE SODIO (ANHIDRO) 0.5 M
17.74 g Na_2HPO_4 - 250 ml. agua deionizada

Fosfato monobásico de sodio (hidratado) 0.05 M
17.25 g NaH_2PO_4 - 250 ml agua deionizada

Buffer salino de fosfatos (PBS) 0.01 M (pH=7.4)
0.08 g NaH_2PO_4
0.625 g Na_2HPO_4
4.5 g NaCl
500 ml de agua deionizada

Buffer salino de fosfatos (PBS) 0.05 M (pH=7.4)
14.3 g NaCl
26 ml Na_2HPO_4 0.05 M
13 ml NaH_2PO_4 0.5 M
1750 ml agua deionizada

PBS 0.05 M + gelatina 0.1% (PBS-gel) (pH=7.4)
1 g gelatina
1000 ml PBS 0.05 M

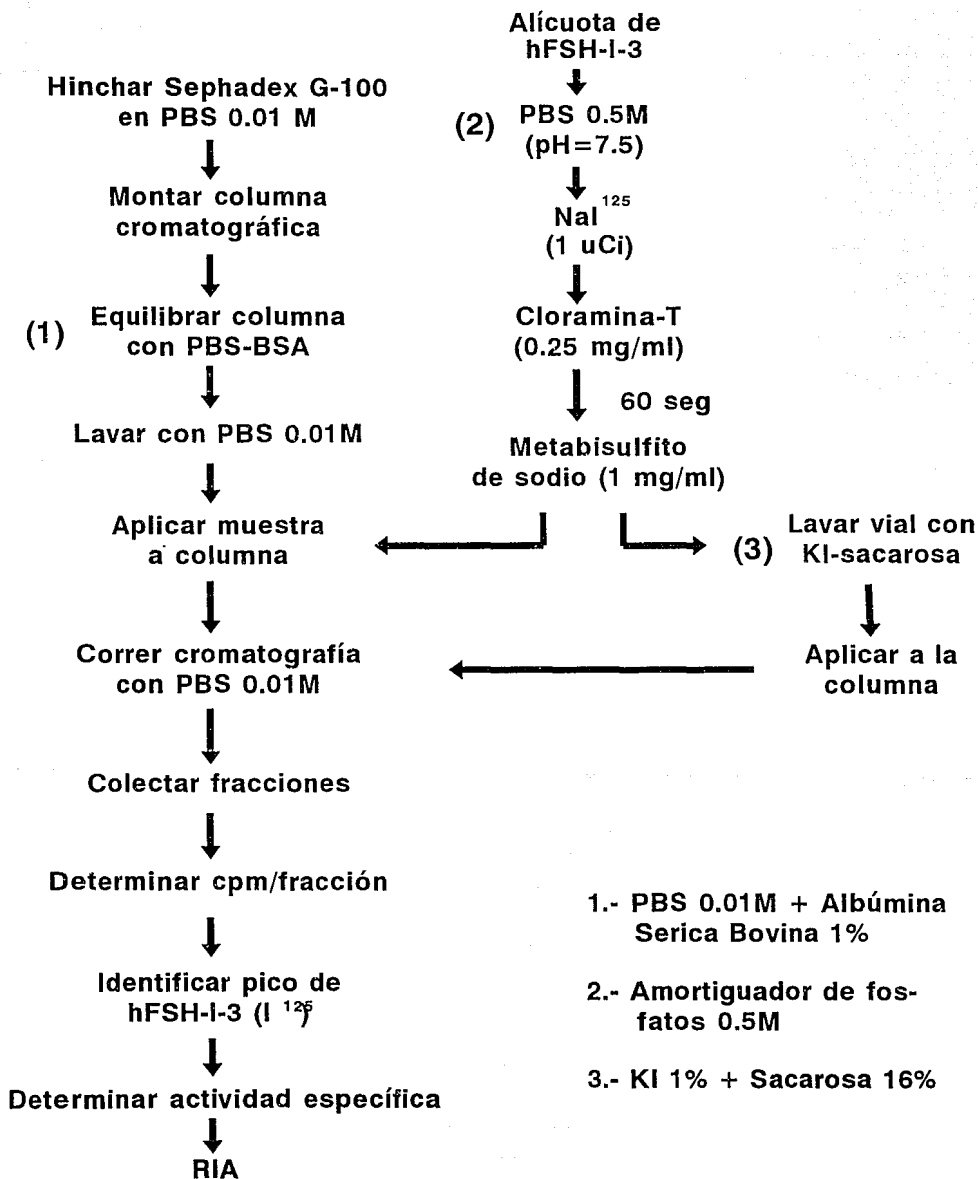
PBS 0.05 M + EDTA 0.05 M (PBS-EDTA) (pH=7.4)
9.3 g de EDTA
500 ml PBS 0.05 M

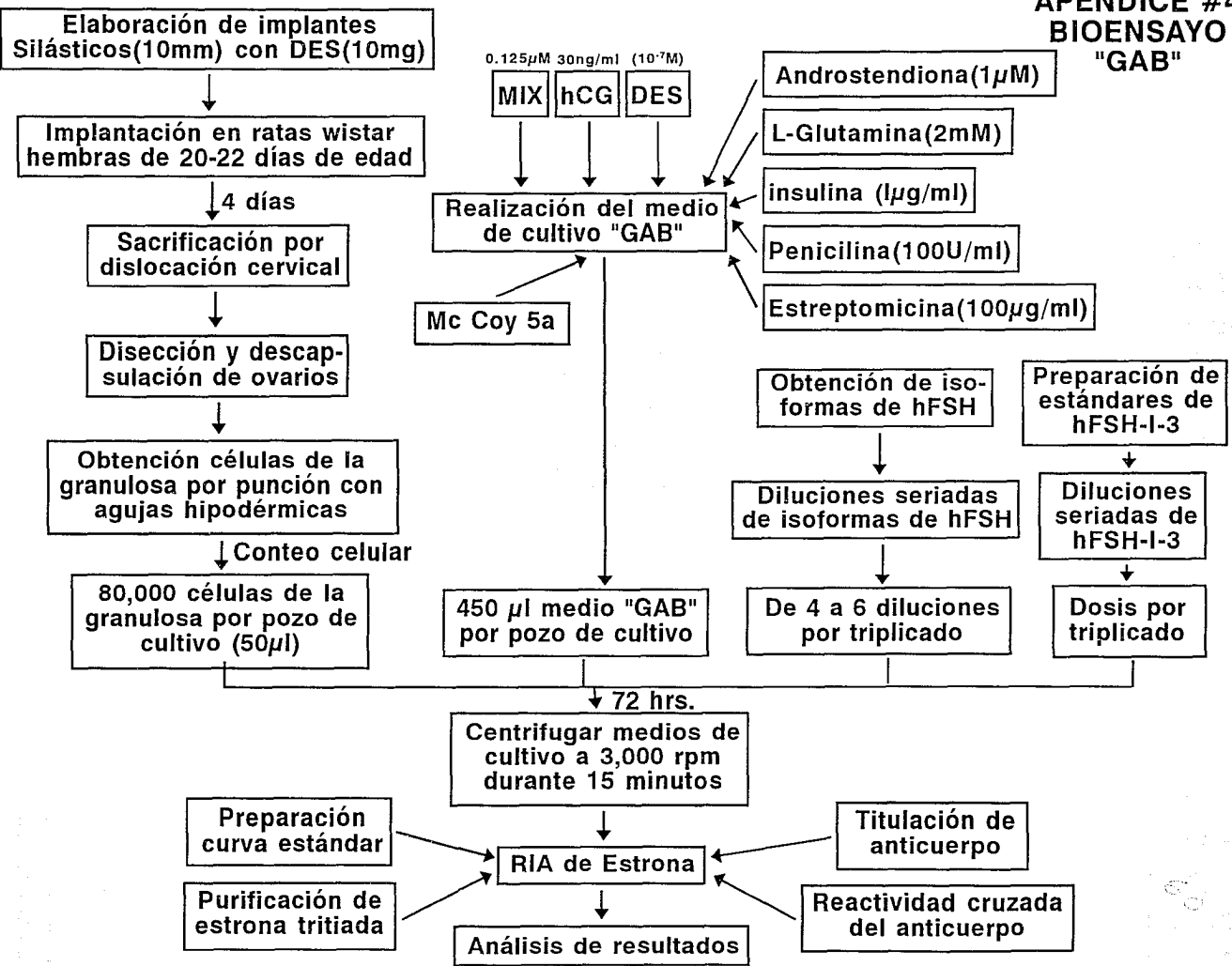
PBS-EDTA + SNC 2%
100 ml PBS-EDTA
2 ml Suero normal de conejo (SNC)

Fosfato dibásico de sodio: J.T. Baker, S.A. de C.V., Méx.
Fosfato monobásico de sodio: J.T. Baker, S.A. de C.V. Méx.
Cloruro de sodio: J.T. Baker, S.A. de C.V. Méx.
Gelatina: Programa de reactivos, Méx, OMS.
EDTA: Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, EUA.

APENDICE # 3

IODACION DE hFSH-I-3





BIBLIOGRAFIA

1. Adashi, E. Y. & Hsueh, A. J. W. Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity in cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 257: 6077-6083. 1982.
2. Baenziger, J. U. & Green, E. D. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. et. Biophys. Acta.* 947: 287-306. 1988.
3. Beers, W. H. & Strickland, S. A cell culture assay for follicle stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 253: 3877-3881. 1978.
4. Bhalla, B. K. & Reichert, L. E. Properties of follicle-stimulating hormone-receptor interactions. Specific binding of human follicle-stimulating hormone to rat testes. *J. Biol. Chem.* 249: 43-51. 1974.
5. Blum, W.; Riegelbour, G. & Gupta, D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on in vitro bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J. Endocrinol.* 105: 17-27. 1985.
6. Blum, W. & Gupta, D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *J. Endocrinol.* 105: 29-37. 1985.
7. Brown, J. L.; Schoenemann, H. M.; Chakraborty, P. K.; Stuart, L. D. & Dahl, K. D. Increased bioactivity of serum FSH, but not luteinizing hormone, following hemicastration in ram lambs. *Biol. Reprod.* 43: 548-553. 1990.

8. Channing, C. P.; Sakai, C. N. & Bahl, O. P. Role of carbohydrate residues of human chorionic gonadotropin in binding and stimulation of adenosine 3'-5' monophosphate accumulation by porcine granulosa cells. *Endocrinology* 103: 341-348. 1978.
9. Chappel, S. C.; Ulloa-Aguirre, A. & Coutifaris, C. Biosynthesis and secretion of follicle stimulating hormone. *Endocr. Rev.* 4: 179-211. 1983.
10. Chappel, S. C.; Ulloa-Aguirre, A. & Ramaley, J. Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 28: 196-205. 1983.
11. Chappel, S. C.; Bethea, C. L. & Spies, H. G. Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology* 115: 452-461. 1984.
12. Chappel, S. C.; Bashey, H. M. & Snyder, P. J. Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol.* 113: 311-316. 1986.
13. Chromatofocusing with polybuffer and PBE, technical booklet series. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia. 38 pp. 1980.
14. Dahl, K. D.; Pavlou, S. N.; Kovacs, W. J. & Hsueh, A. J. W. The changing ratio of serum bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men following treatment with a potent gonadotropin-releasing-hormone antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 792-794. 1986.

15. Dahl, K. D.; Czekala, N. M.; Lim, P. & Hsueh, A. J. W. Monitoring the menstrual cycle of human and lowland gorillas based on urinary profiles of bioactive follicle-stimulating hormone and steroids metabolites. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 486-493. 1987.
16. Dahl, K. D.; Bicsak, T. A. & Hsueh, A. J. W. Naturally occurring antihormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science* 239: 72-74. 1988.
17. Dahl, K. D.; Jia, X. C. & Hsueh, A. J. W. Bioactive follicle-stimulating hormone levels in serum and urine of male and female rats from birth to prepubertal period. *Biol. Reprod.* 39: 32-38. 1988.
18. Dahl, K. D.; Jia, X. & Hsueh, A. J. W. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone, en Hormone action: neuroendocrine peptides. Academic Press. *Methods in Enzymology*. Vol. 168. U.S.A. 414-422 pp. 1989.
19. Dahl, K. D.; Papkoff, H. & Hsueh, A. J. W. Effects of diverse mammalian and non mammalian gonadotropins in a rat granulosa cell bioassay for follicle-stimulating hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 368-373. 1989.
20. Daniel, S. A. J. & Armstrong, D. T. Enhancement of follicle-stimulating hormone-induced activity by androgens in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 107: 1027-1033. 1980.
21. Davoren, J. B. & Hsueh, A. J. W. Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 35: 97-105. 1984.

22. Dufau, M. L.; Catt, K. J. & Tsuruhara, T. Retention of in vitro biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44: 1022-1029. 1971.
23. Findlay, A. L. R. *La reproducción y el feto*. Ed. El Manual Moderno. Serie: Principios fisiológicos en medicina. México. 239 pp. 1987.
24. FPLC Ion exchange and chromatofocusing: principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals, Laboratory Separation Division. Uppsala, Suecia. 171 pp. 1985.
25. Fauser, B. C. J. M.; Soto, D.; Czekala, N. M. & Hsueh, A. J. W. Granulosa cell aromatase bioassay: changes of bioactive FSH levels in the female. *J. Steroid. Biochem.* 33: 721-726. 1989.
26. Fauser, B. C. J. M.; Bogers, J. W.; Hop, W. C. J. & De Jong, F. H. Bioactive and immunoreactive FSH in serum of normal and oligospermic men. *Clin. Endocrinol.* 32: 433-442. 1990.
27. Galle, P. C.; Ulloa-Aguirre, A. & Chappel, S. C. Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J. Endocrinol.* 99: 31-39. 1983.
28. Galway, A. B.; Hsueh, A. J. W.; Daneshdoot, L.; Zhou, M. H.; Pavlou, S. N. & Snyder, P. J. Gonadotroph adenomas in men produce biologically active follicle-stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 907-912. 1990.

29. Galway, A. B.; Hsueh, A. J. W.; Keene, J. L.; Yamoto, M.; Fauser, B. C. J. M. & Boime, I. In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* 127: 93-100. 1990.
30. Greenspan, F. S. & Forsham, P. H. *Endocrinología básica y clínica*. Ed. El Manual Moderno. México. p. 386, 414, 415, 452, 458. 1988.
31. Greenwood, F. C.; Hunter, W. M.; Glover, J. S. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123. 1963.
32. Ham, A. W. & Cormack, D. H. *Tratado de Histología*. Nva. Ed. Interamericana. 8a. ed. México. p. 880-900, 939-956. 1986.
33. Hsueh, A. J. W.; Erickson, G. F.; Papkoff, H. Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 505-511. 1983.
34. Hsueh, A. J. W.; Adashi, E. Y.; Jones, P. B. C. & Welsh, T. H., Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5: 76-126. 1984.
35. Hsueh, A. J. W.; Bicsak, T. A.; Jia, X. C.; Dahl, K. D.; Fauser, B. C. J. M.; Galway, A. B.; Czekala, N.; Pavlou, S. N.; Papkoff, H.; Keene, J. & Boime, I. Granulosa cell as hormone targets: the role of biologically active follicle-stimulating hormone in reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.* 45: 209-277. 1989.

36. Huhtaniemi, I. T.; Dahl, K. D.; Ranniko, S. & Hsueh, A. J. W. Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone in prostatic cancer patients during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment and after orchidectomy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 308-313. 1988.
37. Jaakkola, T.; Ding, Y. Q.; Kellokumpu-Lehtinen, J.; Valavaara, R.; Martikaenen, H.; Tapanainen, J.; Rönberg, L. & Huhtaniemi, I. The ratios of serum bioactive/immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in various clinical conditions with increased and decreased gonadotropin secretion: reevaluation by highly sensitive immunometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 1496-1505. 1990.
38. Jia, X. C. & Hsueh, A. J. W. Sensitive in vitro assay for measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinology* 41: 445-448. 1985.
39. Jia, X. C. & Hsueh, A. J. W. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology* 119: 1570-1577. 1986.
40. Jia, X. C.; Kessel, B.; Yen, S. S. C.; Tucker, E. M. & Hsueh, A. J. W. Serum bioactive follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle and in hyper- and hypo-gonadotropic states: application of a sensitive granulosa cell aromatase bioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62: 1243-1249. 1986.
41. Jones, L. R.; Benker, G.; Salacinski, P. R.; Lloyd, T. J. & Lowry, P. J. Large-scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J. Endocrinol.* 82: 77-86.

42. Kessel, B.; Dahl, K. D.; Kazer, R. R.; Lui, C. H.; Rivier, J.; Vale, W.; Hsueh, A. J. W. & Yen, S. S. C. The dependency of bioactive follicle-stimulating hormone secretion on gonadotropin-releasing hormone in hypogonadal and cyclic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 361-366. 1988.
43. Khan, S. A.; Katziya, G.; Fröysa, B. & Diczfalusy, E. Characterization of various molecular species of follicle stimulating hormone in Baboon pituitary preparations. *J. Med. Primatol.* 13: 295-304. 1984.
44. Larrea, F.; Oliart, R. M.; Escorza, A.; Valencia, X. & Ulloa-Aguirre, A. Mecanismo de acción de las gonadotropinas hipofisarias y regulación hormonal de la esteroidogénesis. *La Rev. Invest. Clín. (Méx)* 40: 33-45. 1988.
45. Lehninger, A. *Bioquímica*. Ed. Omega. 2a. ed. España. p. 817-838. 1985.
46. Manual del laboratorio de hormonas. Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción. México, D.F. 65 pp. 1983.
47. Matzkin, H.; Homonnai, Z. T.; Galiani, D.; Paz, G. & Dekel, N. Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone in oligospermic and azoospermic men: application of a modified granulosa cell bioassay. *Fertil. Steril.* 53: 709-714. 1990.
48. Miller, C.; Ulloa-Aguirre, A.; Hyland, L. & Chappel, S. Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity assesment of biological activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil. Steril.* 40: 242-247. 1983.

49. Monfort, S. L.; Dahl, K. D.; Czekala, N. M.; Stevens, L.; Bush, M. & Wildt, D. E. Monitoring ovarian function and pregnancy in the giant panda (Ailuropoda melanoleuca) by evaluating urinary bioactive FSH and steroids metabolites. *J. Reprod. Fert.* 85: 203-212. 1989.
50. Mortola, J. F.; Sathanandan, M.; Pavlou, S.; Dahl, K. D.; Hsueh, A. J. W.; Rivier, J.; Vale, W. & Yen, S. S. C. Supression of bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone levels by a potent gonadotropin releasing hormone antagonist: pharmacodynamic studies. *Fertil. Steril.* 51: 957-963. 1989.
51. O'Riordan, J. L. H.; Malan, P. G. & Gould, R. P. *Fundamentos de endocrinología*. Ed. Limusa. México. 233 pp.
52. Padmanabhan, V.; Chappel, S. C. & Beitins, I. Z. An improved in vitro bioassay for FSH suitable for mesurement of FSH in unextracted human serum. *Endocrinology* 121: 1089-1098. 1987.
53. Padmanabhan, V.; Lang, L. L.; Sonstein, J.; Kelch, R. P. & Beitins, I. Z. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67: 465-473. 1988.
54. Pavlou, S. N.; Dahl, K. D.; Wakefield, C.; Rivier, J.; Vale, W.; Hsueh, A. J. W. & Lindner, J. Maintenance of the ratio of bioactive to immunoreactive follicle-stimulating hormone in normal men during chronic luteinizing hormone-releasing hormone agonist administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 1005-1009. 1988.
55. Reichert, L. E. Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. *Endocrinology* 80: 1029-1044. 1971.

56. Reichert, L. E.; Sanzo, M. A. & Rarga, N. S. Studies on a low molecular weight follicle stimulating hormone inhibitor from human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 866. 1979.
57. Robertson, D. M.; Foulds, L. M. & Ellis, S. Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology* 111: 385-391. 1982.
58. Sanzo, R. & Reichert, L. Gonadotropin receptor binding regulators in serum. *J. Biol. Chem.* 257: 6033. 1982.
59. Speroff, L.; Glass, R. H. & Kase, N. G. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Wilkins & Wilkins, Co. 3rd. ed. U.S.A. p. 1-107. 1984.
60. Steelman, S. L. & Pohley, F. M. Assay of follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 53: 604. 1953.
61. Tenover, J. S.; Dahl, K. D.; Hsueh, A. J. W.; Lim, P.; Matsumoto, A. M.; Bremner, W. J. Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone levels and the response to clomiphene in healthy young and elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 1103-1108. 1987.
62. Thorell, J. I. & Larson, S. M. *Radioimmunoassay and related techniques: methodology and clinical applications*. The C. V. Mosby Co., St. Louis, U.S.A. 1978.
63. Tortora, G. J. & Anagnostakos, N. P. *Principios de anatomía y fisiología*. Ed. Harla. 3a. ed. México. p. 489-529. 1984.

64. Ulloa-Aguirre, A. & Chappel, S. C. Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J. Endocrinol.* 95: 257-266. 1982.
65. Ulloa-Aguirre, A.; Coutifaris, C. & Chappel, S. C. Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. *Acta Endocrinol.* 102: 343-350. 1983.
66. Ulloa-Aguirre, A.; Miller, C.; Hyland, L. & Chappel, S. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.* 30: 382-387. 1984.
67. Ulloa-Aguirre, A.; Mejía, J. J.; Domínguez, R.; Guevara-Aguirre, J.; Díaz-Sánchez, V. & Larrea, F. Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J. Endocrinol.* 110: 539-549. 1986.
68. Ulloa-Aguirre, A.; Espinoza, R.; Damián-Matsumura, P.; Chappel, S. C. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Rep.* 3: 491-501. 1988.
69. Ulloa-Aguirre, A.; Espinoza, R.; Damián-Matsumura, P.; Larrea, F.; Flores, A.; Morales, L. & Domínguez, R. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 38: 70-78. 1988.
70. Ulloa-Aguirre, A.; Damián-Matsumura, P.; Espinoza, R.; Domínguez, R., Morales, L. & Flores, A. Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J. Endocrinol.* 126: 323-332. 1990.

71. Van Damme, M. P.; Robertson, D. M.; Marana, R.; Ritzan, E. M. & Diczfalusy, E. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinol.* 91: 224-237. 1979.
72. Walker, L. A.; Cornell, L.; Dahl, K. D.; Czekala, N. M.; Dargen, C. M.; Joseph, B.; Hsueh, A. J. W. & Lasley, B. L. Urinary concentrations of ovarian steroid metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orchus*) during ovarian cycles and pregnancy. *Biol. Reprod.* 39: 1013-1020. 1988.
73. Wang, C.; Dahl, K.D.; Leung, A.; Chan, S. Y. W. & Hsueh, A. J. W. Serum bioactive follicle-stimulating hormone in men with idiopathic azoospermia and oligospermia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 629-633. 1987.
74. Wang, C. Bioassay of follicle stimulating hormone. *Endocr. Rev.* 9: 374-377. 1988.
75. Wang, C.; Zhong, C. Q.; Leung, A. & Low, L. C. K. Serum bioactive follicle-stimulating hormone levels in girls with precocious sexual development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 615-619. 1990.
76. Welsh, T. H. Jr.; Jia, X. C. & Hsueh, A. J. W. Forskolin and phosphodiesterase inhibitors stimulate rat granulosa cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37: 51-60. 1984.
77. Wide, L. Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 682-688. 1982.
78. Wide, L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol.* 109: 181-189. 1985.

79. Wide, L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol.* 109: 190-197. 1985.
80. Wide, L. The regulation of metabolic clearance rates of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol.* 112: 336-344. 1986.
81. Wide, L. Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J. Endocrinol.* 123: 519-529. 1989.
82. 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.* 70: 271-276. 1990.
83. Wide, L. & Hobson, B. M. Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in pituitaries of young women compared to that of men and elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 371-375. 1983.
84. Wide, L. & Hobson, B. Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 113: 17-22. 1986.
85. Wilson, C. A.; Leigh, A. J. & Chapman, A. J. Gonadotropin glycosylation and function. *J. Endocrinol.* 125: 3-14. 1990.
86. Yen, S. S. C. & Jaffe, R. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management.* W. B. Saunders Co. 2nd. ed. U.S.A. p. 75-108, 115-133, 140-150, 200-230. 1986.

87. Zaidi, A. A.; Robertson, D. M. & Diczfalusy, E. Studies of the biological and immunological properties of human follitropin: profiles of two International Reference Preparations and of an aqueous extract of pituitary glands after electrofocusing. *Acta Endocrinol.* 97: 157-165. 1981.