

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LAS DIFERENTES VARIANTES
MOLECULARES DE LA HORMONA ESTIMULANTE
DEL FOLICULO HUMANA EN EL CRECIMIENTO
FOLICULAR Y EN LA PROLIFERACION CELULAR
IN VIVO E IN VITRO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. JORGELINA BARRIOS DE TOMASI

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO ULLOA - AGUIRRE

MEXICO, D. F.



SEPTIEMBRE 2005

COORDINACIÓN

m. 348613



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jorgelina Barrios De Tomasi

FECHA: 30 SEPT 05

FIRMA: Jorgelina Barrios

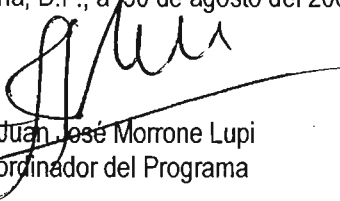
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
 Director General de Administración Escolar, UNAM
 Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de mayo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **BARRIOS DE TOMASI JORGELINA** con número de cuenta **88526670** y número de expediente **30961101**, con la tesis titulada: "Efecto de las diferentes variantes moleculares de la hormona estimulante del foliculo humana en el crecimiento folicular y en la proliferación celular in vivo e in vitro", bajo la dirección del Dr. Alfredo Ulloa Aguirre.

Presidente:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Vocal:	Dra. María Esther Cruz Beltrán
Vocal:	Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales
Vocal:	Dra. Elena Zambrano González
Secretario:	Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Suplente:	Dra. Cristina Aleida Olivares Segura
Suplente:	Dr. Horacio Merchant Larios

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
 Cd. Universitaria, D.F., a 30 de agosto del 2005.


 Dr. Juan José Morrone Lupi
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, en el Hospital de Ginecología y Obstetricia “Luis Castelazo Ayala” del IMSS y en el Centro Alemán de Primates “Deutsches Primatenzentrum” Göttingen, Alemania, bajo la tutoría del Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre, la cotutoría de la Dra. Penelope Nayudu y como miembros del Comité Tutoral al Dr. Horacio Merchant Larios y a la Dra. María Esther Cruz Beltrán. La tesis recibió apoyo financiero de la Coordinación de Investigación en Salud-IMSS (Ref. 09-B5-61-2800) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, No. de registro de Becario 93800).

A la vida porque puso al más grande amor en mi camino, Frank.

Al amor porque me dió al más bello fruto, Hannemie.

A los frutos de nuestro amor por ser la mayor inspiración en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ulloa Aguirre su asesoría en la elaboración de esta tesis, así como a la Dra. Penelope Nayudu y al comité tutorial por las aportaciones brindadas para el desarrollo de la misma.

Expreso mi agradecimiento al personal de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 del IMSS, y al personal del Departamento de Biología de la Reproducción del Centro Alemán de Primates de Göttingen, Alemania.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del doctorado y a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por la beca otorgada para realizar una estancia en el extranjero.

INDICE

Resumen.....	1
Summary.....	2
Antecedentes.....	3
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	3
Gonadotropinas.....	3
Estructura de la FSH.....	4
Modificaciones post-traduccionales.....	5
Heterogeneidad molecular de las gonadotropinas.....	6
Función de los carbohidratos en las gonadotropinas.....	9
Papel de las hormonas esteroides durante el desarrollo folicular.....	10
Biosíntesis de esteroides sexuales a partir de colesterol.....	13
Ovulación o Atresia.....	16
Comunicación intercelular vía uniones comunicantes tipo gap.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Método.....	25
A. Obtención de las variantes de FSH.....	25
B. Determinación de la actividad biológica <i>in vitro</i>	26
C. Vida media plasmática de las formas moleculares de la FSH.....	27
D. Efecto de las isoformas en la proliferación celular <i>in vivo</i>	27
E. Efectos en la maduración folicular <i>in vitro</i>	28
Análisis estadístico.....	32
Resultados.....	33
A. Isoformas de FSH.....	33
B. Actividad biológica <i>in vitro</i>	34
C. Vida media plasmática.....	36
D. Proliferación celular <i>in vivo</i>	37
E. Maduración folicular <i>in vitro</i>	42
Discusión.....	53
Conclusiones.....	62
Anexos.....	63
Referencias.....	69
Publicación original.....	77

RESUMEN

La hormona estimulante del folículo (FSH), al igual que los otros miembros de la familia de las hormonas glicoproteicas, es producida y secretada en múltiples formas moleculares. Estas variantes o isoformas difieren entre sí por los residuos de oligosacáridos que se unen a la cadena peptídica de la hormona, en su abundancia relativa y en sus propiedades biológicas.

Para entender cómo esta heterogeneidad de carbohidratos tiene un impacto en la función de la FSH se emplearon dos sistemas diferentes, uno *in vivo* y otro *in vitro*. Las isoformas se obtuvieron mediante cromatografía preparativa y radioinmunoanálisis, técnicas actualmente utilizadas para separar e identificar el perfil de distribución de las hormonas glicoproteicas; las isoformas aisladas fueron analizadas por un sistema *in vivo* en ratas prepúberes hipofisectomizadas y tratadas (6 horas posthipofisectomía) con una dosis única de las diferentes variantes de FSH y por otro lado por un sistema *in vitro* en el cual se realiza un cultivo de folículos ováricos intactos con diferentes dosis de las mismas variantes. Además se realizaron bioensayos en células de la granulosa y estudios de la vida media de las isoformas.

En ambos sistemas todas las isoformas intrahipofisarias de FSH fueron capaces de inducir una respuesta biológica. Independientemente del sistema empleado, las isoformas menos ácidas fueron más eficientes (a pesar de permanecer menos tiempo en circulación) en mantener la proliferación de las células de la granulosa (*in vivo*), indujeron un crecimiento preantral más rápido produciendo folículos antrales de mayor tamaño a dosis menores (*in vitro*), tuvieron un mayor impacto en la producción de estradiol y en la formación de la cavidad antral (ambos sistemas).

Estos resultados sugieren que las isoformas de FSH difieren en su capacidad de inducir diferentes respuestas celulares. El hallazgo de diferencias significativas en las diferentes respuestas biológicas entre las diversas isoformas intrahipofisarias de FSH, sugiere fuertemente que la producción de las isoformas y su secreción a la circulación tiene un significado fisiológico y representa un mecanismo a través del cual la hipófisis anterior regula la función gonadal.

SUMMARY

As with other members of the glycoprotein hormone family, follicle-stimulating hormone (FSH) is produced and released as an array of isoforms that differ from each other in the structure of their oligosaccharide attachments, relative abundance and biological properties.

To understand how carbohydrate heterogeneity can impact FSH action we employed two different *in vitro* and *in vivo* systems. FSH isoforms were obtained by chromatofocusing and radioimmunoassay, techniques nowadays used to separate and identify the array of glycoproteic hormones. The isoforms obtained were analysed in an *in vivo* system with prepubertal hypophysectomized rats exposed (6 hours later) to a single dose of the FSH isoforms and on the other hand in an *in vitro* system, with an intact follicle culture exposed to different doses from the same variants. We also analysed the effect in a granulosa bioassay and plasma half life.

Under both systems intrapituitary FSH isoforms were capable to induce different biological response. Regardless of the system employed, the less acidic isoforms were more efficient (in spite of the less time in circulation) keeping granulosa cell proliferation (*in vivo*), inducing a faster preantral growth and larger follicles with lower doses (*in vitro*), in a higher impact in estradiol production and in the antral formation (both systems) than the more acidic counterparts.

These results suggest that FSH isoforms differ in their capacity for inducing different cellular responses. The finding of significant differences among the various intrapituitary FSH isoforms, strongly suggests that the shift towards the isoforms production and secretion have a physiological significance and represent an important mechanism through which the anterior pituitary regulates gonadal function.

ANTECEDENTES

El folículo ovárico es una compleja unidad funcional, cuya función principal es el desarrollo y manutención de un ovocito competente, el cual será liberado mediante la ovulación, esto es, la liberación física del ovocito y las células de la granulosa circundantes. Este proceso de maduración, crecimiento y selección, implica una serie de eventos endocrinos, paracrinos y autocrinos entre los tres tipos principales de células foliculares: el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca. Estas células interactúan de una manera sincrónica y se encuentran reguladas por una serie de hormonas y de factores. De estas hormonas y factores dependerá el desarrollo adecuado de un folículo y/o la muerte o atresia de aquellos que no recibieron un estímulo adecuado para alcanzar la maduración. Estos factores y hormonas desempeñan un papel complejo en el tiempo y en el espacio, siendo el folículo una unidad móvil y no estática, cuyo desarrollo dependerá de la rápida y adecuada comunicación entre los diferentes tipos celulares.

Las gonadotropinas son las hormonas o señales endocrinas que inducen y promueven estos procesos. Las gonadotropinas son sintetizadas y secretadas por los gonadotropos en la hipófisis anterior, bajo la influencia de la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH), la cual es una hormona sintetizada en el hipotálamo. De esta manera se establece una estrecha relación entre estos tres tejidos, a lo cual se le ha reconocido como el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Las características estructurales de cada señal generada por los componentes de la hipófisis, determinarán el destino metabólico, la capacidad de unión y activación de sus receptores en la célula blanco y eventualmente la capacidad de inducir una respuesta biológica específica (Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

Hormona liberadora de Gonadotropinas

La GnRH es un decapeptido producido por células especializadas, localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo mediobasal y en el área preóptica de la región anterior del hipotálamo. Los axones de estas neuronas se proyectan hacia varias regiones del cerebro y hacia la circulación portal, donde este decapeptido alcanza los receptores membranales de los gonadotropos o células productoras de gonadotropinas. La activación del receptor para GnRH lleva a la síntesis y secreción de las gonadotropinas. La secuencia peptídica de la GnRH consiste en los siguientes residuos de aminoácidos: pyroGlu¹-His²-Trp³-Ser⁴-Tyr⁵-Gly⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂ (Matsuo y cols., 1971; Baba y cols., 1971).

Gonadotropinas

La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) son producidas por un grupo heterogéneo de células, llamadas gonadotropos en la hipófisis anterior. Ambas gonadotropinas desempeñan un papel esencial regulando la función gonadal, tanto en humanos como en otras especies animales. Las células de la granulosa, en el ovario y las células de Sertoli en el testículo son las principales células blanco para la acción de la FSH. En estas células, la FSH promueve la síntesis de estrógenos y diversos factores no-esteroidogénicos, estimula la gametogénesis, promueve la división celular, la producción de receptores tanto de FSH como de LH y la producción de uniones comunicantes tipo gap. Las células blanco para la LH son las células de Leydig en el testículo y diversos tipos celulares en el ovario, en los que la LH regula las concentraciones locales y sistémicas de los esteroides sexuales. La LH es esencial a su vez para la inducción de la ruptura folicular durante la ovulación y para el mantenimiento del cuerpo lúteo. Sinergiza junto con la

FSH el desarrollo folicular en sus fases tardías promoviendo el crecimiento de los folículos antrales al estado preovulatorio y en las células de la teca estimula la producción de andrógenos.

Las gonadotropinas hipofisarias pertenecen a una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, compuesta por la FSH, la LH, la hormona estimulante de tóroides o tirotrópina (TSH) y la hormona gonadotropina coriónica (CG), esta última producida en la placenta. Las glicoproteínas son secuencias peptídicas con cadenas laterales de oligosacáridos unidos a Asparagina (N) en el caso de la FSH y la LH; y en Treonina (T) o Serina (S) en el caso de la CG. Estas uniones se han descrito como enlaces tipo N- (cuando se encuentra unido al átomo de nitrógeno de la amida del residuo de la Asparagina) o enlaces O-glicosídicos (cuando se une al átomo de oxígeno de la Serina o Treonina) (Ulloa-Aguirre y cols., 2000) (figura 1).

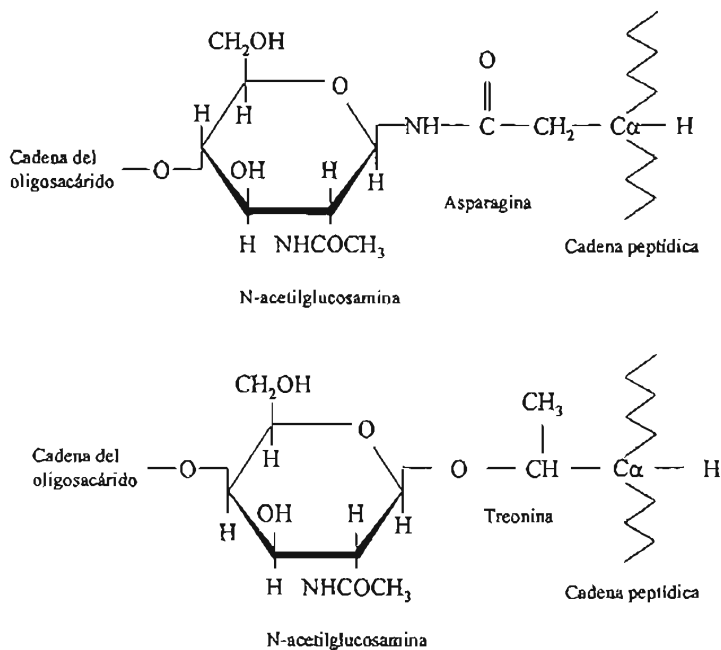


Figura 1. Enlaces N- y O-glicosídicos en glicoproteínas. En el panel superior se muestra el enlace tipo N (unido al residuo de Asparagina) que se da entre el residuo del oligosacárido y la cadena peptídica de las glicoproteínas. En el panel inferior se muestra el enlace O-glicosídico (unido al residuo de Serina o Treonina).

En el dímero α/β , la subunidad- α común en el humano contiene dos oligosacáridos unidos mediante enlaces N-glicosídicos en las posiciones $\alpha 52$ y $\alpha 78$, mientras que FSH- β presenta sitios de glicosilación en los residuos $\beta 7$ y $\beta 24$ y la LH- β en la posición $\beta 30$. (Smith y cols., 1992). La subunidad- β de CG presenta los mismos sitios de N-glicosilación que la LH- β más cuatro sitios adicionales O-glicosídicos en las posiciones $\beta 121$, $\beta 127$, $\beta 132$ y $\beta 138$ en la región carboxilo-terminal.

Estructura de la FSH

Al igual que la LH, la CG y la TSH, la FSH es una glicoproteína heterodimérica compuesta por las subunidades α y β , unidas de manera no covalente (Pierce y cols., 1981). En una misma especie animal, la síntesis de las subunidades- α comunes

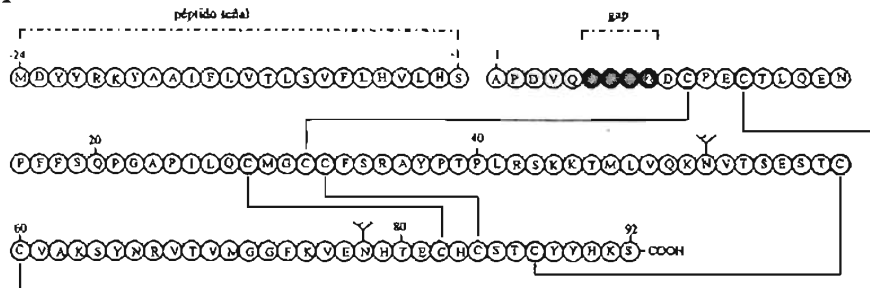
de estas glicoproteínas están codificadas por el mismo gen y por lo tanto presentan una secuencia de aminoácidos casi idéntica (Fiddes y cols., 1984). Por el contrario, las subunidades- β son codificadas por diferentes genes y por lo tanto, le confieren a la hormona especificidad inmunológica y bioquímica. La hormona es funcional y expresa su actividad biológica solamente cuando ambas subunidades se encuentran unidas. El gen de la subunidad- α común de las hormonas glicoproteicas es coordinadamente expresado con las diferentes subunidades- β y su control hormonal varía dependiendo del tipo celular. Por el contrario, los genes de la subunidad- β son expresados de manera restrictiva y presentan una regulación hormonal limitada y específica. El gen que codifica la subunidad- α de varias especies de mamíferos está constituido por cuatro exones separados por tres intrones. En humanos, este gen está localizado en el cromosoma 6p21.1-23. El ARNm de la subunidad- α posee entre 730 a 800 nucleótidos. Este ARNm codifica una secuencia señal de 24 aminoácidos seguida por la secuencia de la proteína madura, la cual está compuesta de 92 a 96 residuos de aminoácidos. En el humano, se encuentra la ausencia de cuatro aminoácidos correspondientes a los residuos 6 a 9 en otras especies, formando una brecha o “gap” al comparar las secuencias de alineación con otras subunidades- α . Sin embargo, esta brecha no altera la formación de los puentes disulfuro de la subunidad (Ulloa-Aguirre y cols., 2000). (figura 2).

En humanos, la subunidad- β de FSH es codificada por un solo gen, localizado en el cromosoma 11 (11p13). El gen de la FSH- β contiene tres exones y dos intrones. FSH- β expresa por lo menos cuatro ARNm en células normales hipofisarias y dos transcritos en células neoplásicas. La secuencia nucleotídica presenta una señal de 18-19 aminoácidos, seguido por la secuencia de la proteína madura de 111 residuos de aminoácidos (Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

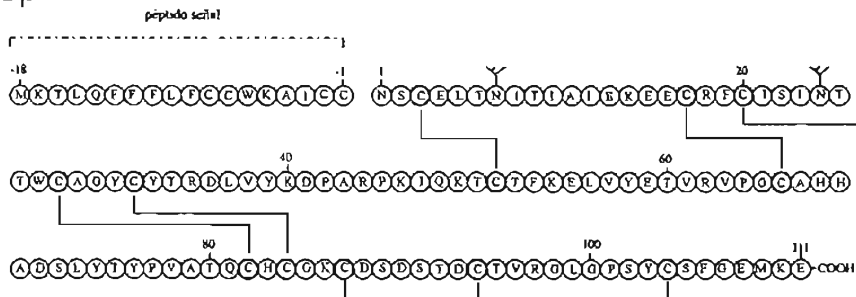
Modificaciones post-transcripcionales

Después de su síntesis, el ARNm de las gonadotropinas difunde por el citoplasma hasta alcanzar el retículo endoplásmico rugoso (RER) y se une a ribosomas, los cuales comienzan la síntesis de la proteína. En el RER también se da la asociación de ambas subunidades, la formación de puentes disulfuro y la transferencia del precursor de oligosacáridos, constituido por 3 moléculas de glucosa (Glc), 9 de Manosa (Man) y 2 de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) unidas a dolicol, un acarreador de lípidos altamente hidrofóbico que atraviesa la membrana del RER más de tres veces. Los oligosacáridos unidos a N de la subunidad- α , aparentemente desempeñan un papel importante en el plegamiento de diferentes dominios de la subunidad y probablemente afecten a su vez, la flexibilidad de la molécula, así como la formación de los puentes disulfuro. La presencia de los puentes disulfuro confiere una estructura tridimensional a las subunidades y son esenciales para mantener la actividad biológica del dímero α/β . La subunidad- α presenta 5 puentes disulfuro, mientras que la subunidad- β presenta seis (Fox y cols., 2001). Los puentes disulfuro que unen residuos de cisteína en las posiciones α 10-60, α 28-82 y α 32-84, forman lo que se le conoce como “el nudo de cisteínas”, el cual está compuesto de dos puentes disulfuro que forman un anillo por el cual pasa un tercer puente disulfuro. La posición exacta de los puentes disulfuro en la subunidad- α es en las posiciones α 7-31, α 10-60, α 28-82, α 32-84 y α 59-87; mientras que para la subunidad- β es en las posiciones β 3-51, β 17-66, β 20-104, β 28-82, β 32-84 y β 87-94 (Fox y cols., 2001). (Figura 2).

hFSH α



hFSH β



De: Ulloa-Aguirre A. y Timossi C. *Reprod BioMed Online* 1(2):48-62, 2000.

Figura 2. Secuencias de las subunidades- α comunes de humano (hFSH- α ; panel superior) y hFSH- β (panel inferior) Los corchetes sólidos representan la posición de los puentes disulfuro. Las estructuras ramificadas se indican en las posiciones de los sitios de glicosilación unidos a N.

Heterogeneidad molecular de las gonadotropinas

La glicosilación de las gonadotropinas comienza en el RER con la transferencia, durante la traducción, de un precursor del oligosacárido al residuo de N en regiones determinadas en la cadena peptídica; específicamente en los sitios donde se presenta una secuencia N-X-S/T, (N: Asparagina, S: Serina, T: Treonina y X representa a cualquier otro aminoácido) (figura 3).

subunidad- α libre de varias especies animales; sin embargo, están ausentes o en menores proporciones en FSH y CG humanas (figura 4).

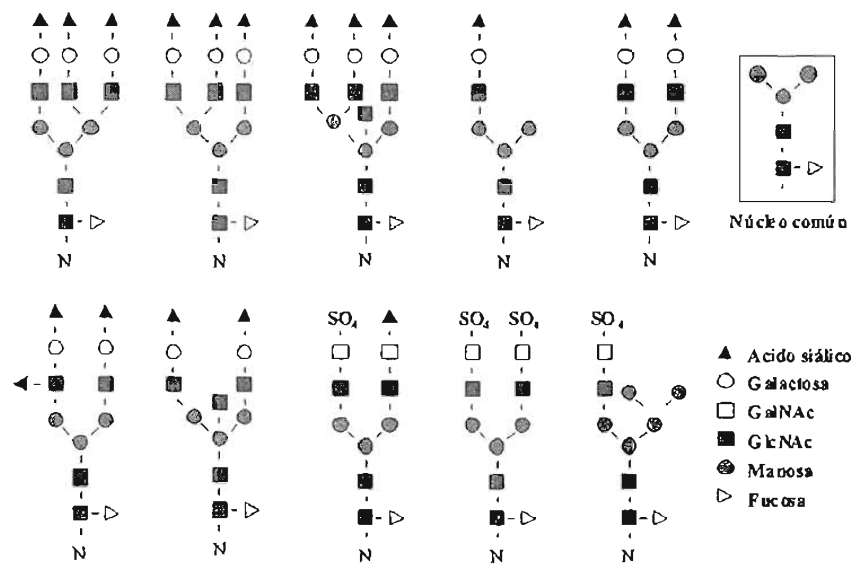


Figura 4. Algunas de las estructuras de oligosacáridos unidos por enlaces tipo N encontrados en la FSH de hipófisis de ovinos, bovinos y de humanos. Muchos otros oligosacáridos se pueden encontrar como versiones incompletas de estas estructuras, principalmente residuos terminales carentes de ácido siálico, sulfatos y fucosa (Ulloa-Aguirre y cols., 1999, 2000).

Varias enzimas se encuentran involucradas en el proceso de glicosilación. Además de las glucosidasas y manosidasas, también hay enzimas tales como un grupo de glicosiltransferasas que incluye a la GalNAc-transferasas, GlcNAc-transferasas, galactosil- y Gal-transferasas y sulfotransferasas, que influyen marcadamente en el proceso de la glicosilación. Muchas de estas enzimas requieren un sitio de reconocimiento en la secuencia peptídica que permite la adición de un nuevo residuo de un carbohidrato a la cadena del oligosacárido, mientras que otras lo añaden de una manera no específica. El sitio de reconocimiento para las GalNAc-transferasas consiste en cuatro residuos de aminoácidos básicos localizados entre dos giros presentes en la α -hélice de una región altamente conservada de la subunidad- α (Baenziger y cols., 1988, Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

En estudios cristalográficos de la CG se ha observado que los oligosacáridos unidos a N se proyectan hacia afuera de la superficie de la hormona y cada uno ocupa un volumen similar al ocupado por toda la cadena peptídica de la subunidad- α (Baenziger 1996). Sólo los dos primeros residuos de GlcNAc y posiblemente el de la manosa de la región medular de cada oligosacárido de la subunidad- β tiene un contacto sustancial con el péptido de la hormona, por lo que las regiones periféricas de estos oligosacáridos aparentemente no interactúan directamente con el péptido. Así, las variaciones en los patrones de ramificación y los sustituyentes terminales tienen un impacto en el espacio ocupado por el oligosacárido así como en la protección de la degradación hepática de la hormona. Cabe señalar que estos carbohidratos son un componente estructural que conforman alrededor del 20-30% de la masa total de la molécula de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

Las variaciones en la estructura y distribución de los oligosacáridos sializados, y en menor grado de los sulfatados, constituyen la base química más importante de las diferencias entre sus isoformas y son las responsables de la

extensa heterogeneidad por carga que las caracteriza (Zambrano y cols., 1995; Baenziger 1988). Después de su síntesis y secreción, la mezcla de isoformas llega a los tejidos blanco, en donde modula una gran variedad de procesos biológicos tales como el crecimiento y la proliferación celular, la esteroidogénesis y la síntesis de diversas proteínas. La contribución relativa de las isoformas de la FSH (y de la LH) a esta mezcla circulante varía según el estado fisiológico del donador (Ulloa-Aguirre y cols., 1988) y a su vez del origen de la preparación analizada. La mezcla de isoformas en la circulación contiene la mayoría de las isoformas detectadas en extractos crudos de hipófisis; sin embargo, el patrón de distribución por carga de isoformas séricas de FSH depende del momento de la toma de la muestra, del sexo, edad, estado de desarrollo sexual y de la fase del ciclo menstrual en la mujer. Por ejemplo, se ha demostrado que hay una mayor proporción de isoformas menos ácidas/sializadas de FSH en suero en mujeres normales durante la fase folicular tardía y en el medio ciclo (Zambrano y cols., 1995). Los extractos de FSH de orina de mujeres menopáusicas presentan una mayor cantidad de isoformas ricas en ácido siálico, por lo que su carga es predominantemente ácida ($\text{pH} \leq 5.0$). Por otra parte, las preparaciones recombinantes de esta gonadotropina presentan un patrón de distribución dependiente del tipo celular del cual se originaron, por ejemplo, las células del ovario de criceto chino (CHO) no presentan la maquinaria necesaria para sializar glicoproteínas en la posición $\alpha 2,6$; la FSH recombinante producida por estas células es menos ácida y exhibe un menor número de isómeros que los extractos de orina. La FSH recombinante producida por las células de insecto infectadas con baculovirus Hi5, expresan una gonadotropina con una carga básica neta, debido a que no presentan prácticamente ácido siálico. Finalmente, la distribución de la FSH humana recombinante producida en células embrionarias humanas de riñón 293 (HEK-293) es similar a la distribución de extractos crudos hipofisarios (Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

Función de los carbohidratos en las gonadotropinas

Las estructuras de los oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas desempeñan un papel importante en varias funciones de la molécula, tales como el plegamiento, la unión de ambas subunidades, la secreción del dímero, la determinación de su destino metabólico y la interacción con su receptor (Ulloa-Aguirre y cols., 2000). La depuración metabólica, así como la potencia biológica *in vivo* son altamente dependientes del tipo específico de residuos terminales (ácido siálico y/o sulfatos) presentes en los oligosacáridos. Las variantes recombinantes de FSH que no presentan ácido siálico, así como la FSH hipofisaria deglicosilada mediante métodos químicos o enzimáticos, son rápidamente depuradas de la circulación y son prácticamente inactivas *in vivo* en comparación con las variantes intactas. En particular, los oligosacáridos de la subunidad- β determinan la velocidad de depuración plasmática de las gonadotropinas, mientras que el oligosacárido en la posición $\alpha 2$ es esencial para la activación del receptor y de las señales de transducción intracelulares (Ulloa-Aguirre y cols., 2000).

Las isoformas ácidas, con un mayor contenido de ácido siálico, tienen una mayor vida media circulante, una reducida unión al receptor y actividad biológica *in vitro* y son producidas y secretadas preferencialmente durante el inicio del desarrollo folicular. Estas isoformas posiblemente proveen al ovario de un estímulo de acción prolongada que permita su maduración. Por el contrario, la vida media de las isoformas menos ácidas es significativamente menor que la de sus análogos más ácidos debido a su bajo contenido de ácido siálico. Sin embargo, estas isoformas presentan una mayor actividad biológica *in vitro* así como una mayor unión al receptor, siendo selectivamente producidas y secretadas antes de la ovulación para estimular posiblemente efectos agudos tales como la ruptura folicular (Padmanabhan y cols., 1988; Ulloa-Aguirre y cols.,

1990; Wide y cols., 1993; Zambrano y cols., 1995). De esta manera, los cambios en la distribución relativa de las isoformas circulantes podrían modular selectivamente los diversos efectos biológicos de la hormona en su tejido blanco.

A pesar que se conoce desde hace varias décadas que la FSH, la LH, la TSH y la CG están altamente glicosiladas, no ha sido sino más recientemente que se ha comenzado a tener una visión más precisa del significado fisiológico de los residuos de carbohidratos. En las hormonas glicoproteicas, los oligosacáridos son la principal característica estructural con un impacto en las propiedades biológicas de estas hormonas.

La FSH es el principal factor que promueve el crecimiento y desarrollo del folículo. Una de las funciones de la FSH es estimular el proceso de aromatización, en el cual los andrógenos son transformados en estrógenos en las células de la granulosa (Dorrington y cols., 1975). La FSH estimula la producción de un mayor número de receptores de FSH y para la LH en las células de la granulosa (Richards y cols., 1976). La FSH estimula la producción de inhibina, activina y del factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I), factores involucrados en el crecimiento folicular (Bley y cols., 1992). También hay evidencias de que la FSH estimula la división celular de las células de la granulosa (Yong y cols., 1992). La presencia de diferentes isoformas pudiera estar correlacionada con el papel multifuncional de la FSH.

Papel de hormonas esteroideas durante el desarrollo folicular

La esteroidogénesis en el ovario se lleva a cabo en un ambiente de estrecha relación entre las células de la teca y las células de la granulosa. Las células de la granulosa producen dos de los esteroideos sexuales más importantes: estradiol y progesterona (esta última, al final del desarrollo folicular, cuando hay receptores para LH en el folículo dominante). A pesar de que las células de la granulosa son capaces de producir progesterona de manera independiente, la biosíntesis de estrógenos requiere de la cooperación entre las células de la granulosa y las de la teca. La participación de estos dos tipos celulares y de las gonadotropinas FSH y LH, en la biosíntesis de estrógenos en el ovario, sostiene la teoría llamada dos células-dos gonadotropinas (Yen y cols., 1999) (*figura 5*).

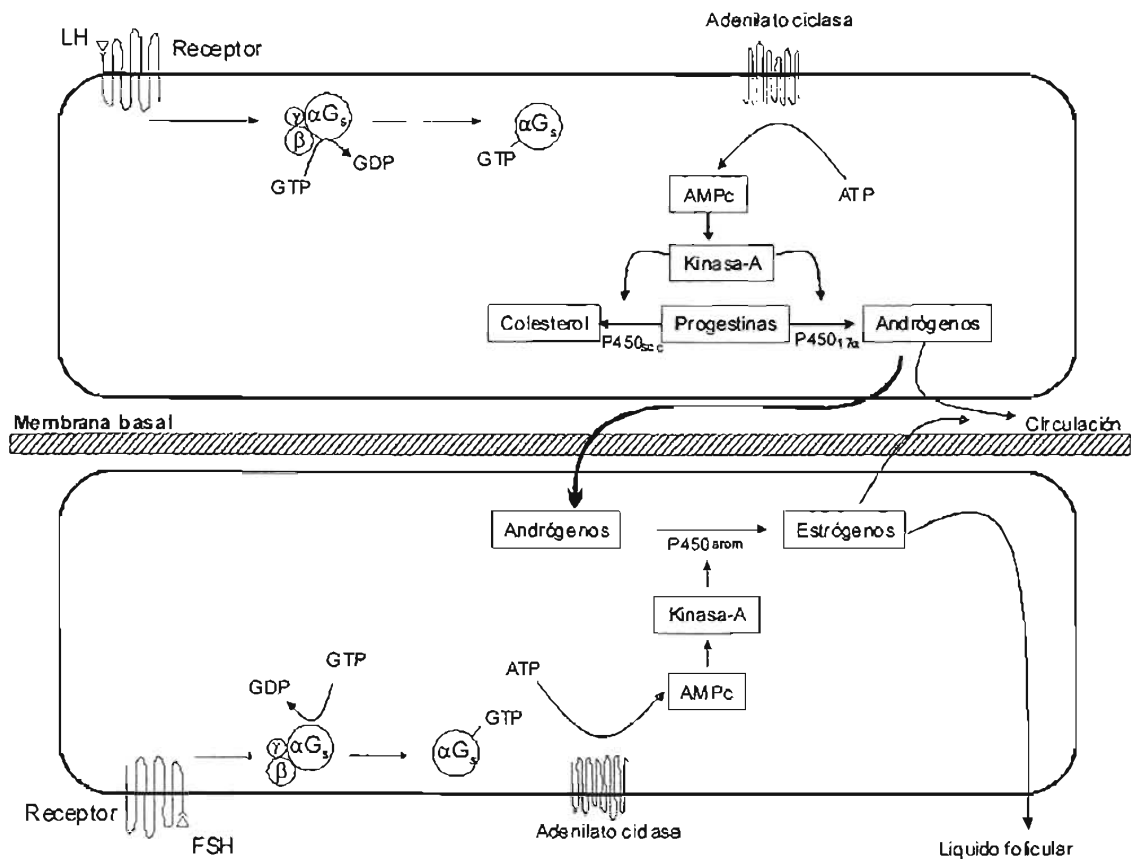


Figura 5. Teoría de las dos células-dos gonadotropinas. En las células de la teca interna (panel superior) se da la biosíntesis de andrógenos a partir de colesterol, bajo la influencia de la LH. Estos atraviesan la membrana basal para alcanzar las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos con el complejo enzimático P450arom (aromatasa) bajo el estímulo de la FSH. LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo estimulante; G_s , proteína G; GTP, guanidín trifosfato; GDP, guanidín difosfato; ATP, adenosín trifosfato; AMPc, adenosín monofosfato cíclico (Kettel, y cols., 1994).

Con base en esta teoría, los andrógenos derivados de la teca, dependientes de la LH, son aromatizados por las células de la granulosa bajo el estímulo de la FSH. El estradiol y la estrona derivan de la aromatización de los andrógenos androstendiona y testosterona, respectivamente (figura 5 y 6). Las células intersticiales son productoras también de andrógenos, los cuales atraviesan la membrana basal del folículo hasta alcanzar las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos. Las células de la granulosa son el sitio principal de la aromatización. En cultivos de células de la granulosa, la aromatización es estimulada por la FSH y no por la LH, siempre y cuando el medio de cultivo contenga un sustrato aromatizable androgénico. Por el contrario las células de la teca no producen cantidades significativas de estrógenos bajo condiciones experimentales. La actividad de la aromatasa en las células de la granulosa se ha estimado que es 700 veces mayor en los folículos preovulatorios que en la teca. Las células de la granulosa son el sitio principal de la síntesis de estrógenos en el folículo dominante preovulatorio. A pesar de que la estrona es producida a partir de la androstendiona, esta es rápidamente transformada en estradiol por la enzima esteroidogénica 17 oxoesteroide reductasa (17Red). La aromatización involucra la pérdida del grupo metilo del

carbono 19 y una eliminación estereoespecífica de los hidrógenos 1- β y 2- β del anillo A del precursor androgénico. Un total de tres hidroxilaciones se requieren por cada molécula de estrógeno formado (*figura 6*) (Kobil y cols., 1994).

La esteroidogénesis se lleva a cabo en las mitocondrias a partir de colesterol. La importancia del colesterol (LDL) como precursor de la progesterona ha sido descrito en numerosos estudios. La función de los estrógenos, además de los múltiples efectos sistémicos, es ejercer una gran variedad de acciones críticas en el ovario (Rosenfeld y cols., 2001). Tanto las células de la granulosa como la teca son sitios de acción de los estrógenos. En las células de la granulosa, los estrógenos estimulan la división celular, teniendo un efecto antiatrésico; inducen también la formación de uniones intercelulares tipo Gap y estimulan la formación del antro folicular y la síntesis de receptores para estrógenos (Rosenfeld y cols., 2001). Los estrógenos sinergizan la acción de las gonadotropinas, incluyendo la promoción del crecimiento ovárico, la síntesis de receptores para FSH y LH y aumentan a su vez la actividad de la aromatasa (Rosenfeld y cols., 2001). La capacidad de los estrógenos para incrementar la actividad de la enzima responsable de su propia formación se suma al incremento exponencial preovulatorio en las concentraciones de estradiol séricas. Esta forma de auto-amplificación pudiera ser importante en el proceso de selección folicular. Por otra parte, los estrógenos bloquean directamente inhibiendo la producción de andrógenos ováricos mediante la inhibición de la enzima involucrada en la conversión de progestinas (C21) a andrógenos (C19). En resumen, se puede mencionar que los estrógenos promueven la foliculogénesis, incrementan la expresión de receptores para gonadotropinas, incrementan las uniones tipo Gap en las células de la granulosa, estimulan la esteroidogénesis (testosterona y progesterona en las células de la teca y en las células lúteas respectivamente) e inhiben la apoptosis de las células de la granulosa (Rosenfeld y cols., 2001).

La función de los andrógenos en el desarrollo folicular es que son los precursores de los estrógenos y ejercer una variedad de efectos mediados por receptores en las células de la granulosa. Los andrógenos poseen la capacidad de promover la actividad de la aromatasa estimulada por las gonadotropinas. Así, los andrógenos aumentan la actividad de la aromatasa estimulada con FSH, actuando como sustrato y también ejerciendo un efecto autócrino directo, el cual resulta en una regulación positiva de las enzimas esteroidogénicas. Los andrógenos promueven la biosíntesis de progesterona. Por otra parte, las concentraciones altas de andrógenos 5- α reducidos, tales como la 5 α -dihidrotestosterona actúan como inhibidores de la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa (Ven y cols., 1999).

En ausencia de gonadotropinas, los andrógenos promueven la atresia folicular y antagonizan el incremento en el peso ovárico asociado a los estrógenos en ratas inmaduras hipofisectomizadas. Así mismo, el tratamiento con dihidrotestosterona inhibe la capacidad de las células de la granulosa a tener receptores de LH inducida por la FSH. También se ha observado que el aumento en la relación andrógenos a estrógenos está asociado a características morfológicas de la atresia, siendo los primeros inductores de la apoptosis ovárica, y de la luteinización del folículo (Hsueh y cols., 1994). La progesterona producida en respuesta al estímulo dado por las gonadotropinas en el medio ciclo es esencial para la ovulación y para la luteinización de los folículos en los primates, teniendo un papel antiproliferativo en las células luteinizadas.

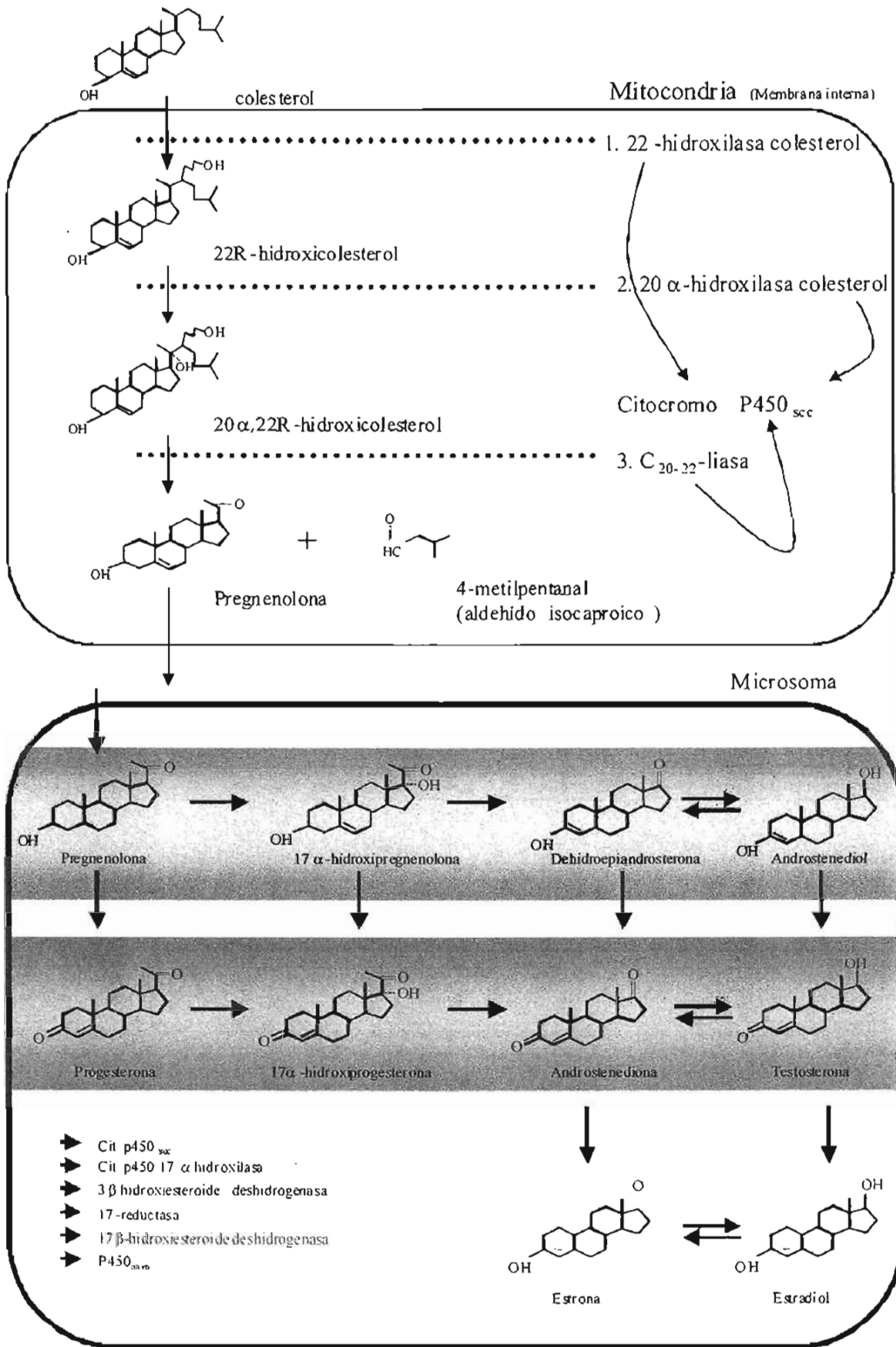
Biosíntesis de esteroides sexuales a partir de colesterol

La síntesis y el metabolismo de esteroides sexuales, involucran múltiples complejos enzimáticos los cuales son regulados tanto por los sitios intracelulares donde se localizan dichas enzimas, por el tipo celular, así como por múltiples factores y hormonas. Esta tesis se enfocará básicamente al ovario, teniendo en cuenta que la síntesis de esteroides sexuales también se lleva a cabo en los testículos y en las glándulas adrenales. En primer lugar se puede mencionar que los folículos ováricos son las unidades funcionales del ovario. La función de cada folículo es mantener el soporte físico y bioquímico necesario para la adecuada maduración del ovocito. Las células somáticas del folículo contribuyen en esta función esencial para la reproducción, lo cual involucra una relación estrecha entre los diferentes tipos celulares foliculares. Los productos de secreción más conocidos en el ovario son los esteroides sexuales (Knobil y cols., 1994). La clasificación de los esteroides sexuales con base en su función biológica se divide en tres grupos principales: progestinas, andrógenos y estrógenos, representados por: C₂₁ (pregnano), C₁₉ (androstano) y C₁₈ (estrano) respectivamente (Knobil y cols., 1994). Los esteroides sexuales son producidos a partir de colesterol (C₂₇), el cual proviene de tres posibles fuentes: 1) colesterol preformado, que proviene del flujo sanguíneo, principalmente en forma de lipoproteínas circulantes (LDL ó lipoproteínas de baja densidad y HDL ó lipoproteínas de alta densidad), 2) colesterol preformado, almacenado en las células ováricas, tanto como colesterol libre, como constituyente de la membrana celular, y 3) colesterol sintetizado *de novo* (Knobil y cols., 1994). El primer paso en la conversión de colesterol a esteroides, es la ruptura del carbono lateral C-20,22 obteniendo un compuesto C₂₁ conocido como pregnenolona y un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. El sistema de enzimas que catalizan esta reacción se localiza en la matriz intracelular entre la membrana externa e interna de las mitocondrias (figura 6). Es un complejo multienzimático constituido principalmente por la enzima citocromo P450_{sec} (en inglés side-chain cleavage). La reacción requiere de fosfato del dinucleótido de adenina y de nicotinamida en la forma reducida (NADPH) generado en la mitocondria mediante la oxidación de intermediarios del ciclo de Krebs o de ácidos grasos. Tres moles de NADPH y de oxígeno son requeridas por mol de colesterol (figura 6 flechas negras). Posteriormente, la pregnenolona es convertida a progesterona por un complejo de enzimas microsomales que incluye a la Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa: Δ^{5-4} -isomerasa, las cuales actúan en conjunto (figura 6 flechas azules). Este complejo de enzimas requiere de NAD⁺ como aceptor de electrones y la reacción es esencialmente irreversible bajo condiciones fisiológicas normales (Knobil y cols., 1994), a su vez, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, utiliza los esteroides 5 α -reducidos como sustrato en su metabolismo. La biosíntesis de andrógenos (C₁₉) en el folículo, así como en otros órganos secretores de andrógenos, es un paso limitante que incluye el complejo de enzimas: 17 α -hidroxilasa:C-17,20-liasa (figura 6 flechas rojas). Este sistema de enzimas es un citocromo P450 y requiere de NADPH y una molécula de oxígeno. La reacción puede utilizar como sustrato tanto a la pregnenolona como a la progesterona, resultando como productos la dehidroepiandrostendiona y androstendiona respectivamente. Estas dos vías alternativas se les conoce comúnmente como las vías Δ^5 (5-ene-3 β -hidroxi) (figura 6, recuadro rosa) y Δ^4 (4-ene-3-oxo) (figura 6, recuadro azul) respectivamente (Knobil y cols., 1994). Los esteroides 17-hidroxi- y 17-oxo- son convertidos mediante una reacción reversible por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa presente en los microsomas de varios tejidos esteroideogénicos, incluyendo al folículo ovárico (figura 6 flechas rosas). Tanto los andrógenos como los estrógenos son requeridos como sustratos para esta reacción (Knobil y cols., 1994). Finalmente, la androstendiona y la testosterona

(esteroides 4-ene-C₁₉) son convertidos a estrona y estradiol 17 β , respectivamente, mediante un complejo de enzimas localizadas en la membrana del retículo endoplásmico liso de varios tipos celulares ováricos. Este complejo enzimático se le conoce como “aromatasa” debido a la estructura aromática de sus productos; es un citocromo P450 que cataliza una reacción de múltiples pasos que incluyen la eliminación de un grupo metilo en la posición C-19, eliminándose como ácido fórmico y seguido por un rearrreglo del anillo A para formar una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y tres moles de O₂ son consumidas durante este proceso (*figura 6 flechas verdes*) (Kobayashi y cols., 1994).

Siguiente página

Figura 6. Esquema general de la biosíntesis de esteroides sexuales. El colesterol se biotransforma en pregnenolona en la mitocondria (panel superior) mediante el complejo enzimático P-450_{sc} (side chain cleavage). Posteriormente en la región microsomal (panel inferior) se da la síntesis de andrógenos por las vías Δ^5 (5-ene-3 β -hidroxi) (recuadro rosa) o Δ^4 (4-ene-3-oxo) (recuadro azul). Los andrógenos cruzan la membrana basal y son biotransformados en estrógenos por el complejo enzimático P450_{arom} en las células de la granulosa. Los colores de las flechas representan las enzimas y las vías sintéticas que éstas ejecutan (Modificado de: Gore-Langton y cols., 1990 y Yen y cols., 1999).



Ovulación o Atresia

El proceso cíclico de la foliculogénesis ovárica se encuentra marcado por una proliferación dramática que culmina con el desarrollo del folículo maduro. A pesar de que el papel de los esteroides y las gonadotropinas es ampliamente conocido, los diferentes destinos de los folículos han sugerido la existencia de factores intraováricos que modulan el sistema.

El destino de cada folículo, ya sea atresia u ovulación, está controlado por factores paracrinos y endocrinos. El término reclutamiento se ha utilizado para distinguir dos procesos importantes en el desarrollo folicular relacionados con el destino de cada folículo. Los folículos primordiales inactivos o latentes permanecen reclutados hasta que inician su crecimiento de manera continua, y por otra parte una vez que se incrementa la secreción de FSH en cada ciclo reproductivo se recluta una cohorte de folículos antrales. Para evitar confusiones se emplearán dos términos reclutamiento inicial (inicio de crecimiento) al primer proceso, y reclutamiento cíclico (escape de atresia) al segundo. Las diferencias entre ambos procesos se encuentran resumidas en la siguiente tabla (McGee y cols., 2000) :

	Reclutamiento inicial	Reclutamiento cíclico
Estadíos	Primordial	Antrales (2-5mm diámetro en el humano, 0.2-0.4mm de diámetro en roedores)
Hormonas involucradas	Aún no determinado	FSH
Vía por omisión	Permanece latente	Apoptosis
Tiempo	Continuamente durante la vida reproductiva, inicia después de la formación del folículo	Cíclica (humano: 28 días, roedores:4-5 días)
Estado del ovocito	Comienza a crecer, incapaz de sobrellevar la ruptura de la vesícula germinal	Crecimiento finalizado, competente para sobrellevar la ruptura de la vesícula germinal.

Tabla 1. Diferencias entre los diferentes tipos de reclutamiento en el ovario (McGee y cols., 2000).

Se desconocen los factores intraováricos o factores externos que estimulan a algunos folículos para iniciar el crecimiento presentado en el reclutamiento inicial, mientras que otros folículos permanecen latentes por meses o años. Sin embargo, este proceso de latencia pudiera estar relacionado con la presencia de un estímulo inhibitorio de origen local o sistémico (McGee y cols., 2000). Por el contrario, el reclutamiento cíclico comienza en la pubertad como resultado del incremento de FSH circulante durante cada ciclo reproductivo, que rescata a una cohorte de folículos antrales de la atresia. Sólo un número limitado de folículos sobreviven y el resto continúan por la vía de la atresia (vía por default). Después del incremento de las concentraciones de la FSH circulante durante el período perimenstrual en la mujer, una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis debido al factor de sobrevivencia de la FSH. Entre este grupo de folículos hay uno que crece con mayor rapidez (destinado a ovular) y produce mayores cantidades de estrógenos e inhibina, siendo este folículo mucho más sensible a la FSH, debido a un aumento en la expresión de receptores de FSH y LH y/o debido a un incremento en la concentración de factores de crecimiento locales. Los estrógenos e inhibina suprimen la liberación de FSH en la hipófisis en la fase folicular media tardía, y como consecuencia el resto

de los folículos son privados de la estimulación de la FSH requerida para la sobrevivencia. El folículo que empieza a crecer a una mayor velocidad produce altas concentraciones de factores de crecimiento (entre ellos el IGF-I) que actúan de una forma autócrina y paracrina incrementando la vasculatura y la respuesta a la FSH. También se ha propuesto que este folículo libera factores que inducen la atresia de los folículos que se encuentran a su alrededor (McGee y cols., 2000). Otro dato interesante es que los ovocitos que no tienen una capa homogénea de células de la granulosa se mueren por la vía apoptótica (McGee y cols., 2000). A pesar que los folículos no tienen receptores para FSH hasta que alcanzan el estadio secundario, las células de la pre-granulosa y los folículos primordiales responden a activadores del AMPc (forskolina y análogos de AMPc), incrementando la expresión de la aromataza y la síntesis de receptores de FSH (Ahmed y cols., 1986). Se ha propuesto que algunos activadores endógenos del AMPc tienen un papel importante en la diferenciación del folículo después del reclutamiento inicial (Mayerhofer y cols., 1997). También se ha estudiado al ovocito en su crecimiento y en el reclutamiento inicial, donde se ha propuesto que los ovocitos que inician primero la meiosis y maduración son los primeros en ovular. La relación entre las células de la granulosa y el ovocito es también un factor esencial para un crecimiento normal del folículo. La sobrevivencia de los folículos preovulatorios está dada por un mecanismo intrafolicular que incluye factores de sobrevivencia tales como la FSH, LH (Chun y cols., 1996), la hormona de crecimiento (Eisenbauer y cols., 1995), el IGF-I (Chun y cols., 1994), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Tilly y cols., 1992), el factor de crecimiento transformante (TGF α) (Hsueh y cols., 1994), el factor de crecimiento de fibroblastos-básico (FGF-b) (Tilly y cols., 1992), la interleucina-1 β (IL-1 β) (Chun y cols., 1995), y el óxido nítrico (McCann y cols., 1999), entre otros. A pesar que las gonadotropinas son los factores más importantes para la sobrevivencia y la ovulación, todos estos factores actúan de manera endocrina, paracrina, autocrina y yuxtacrina para mantener al folículo hasta la ovulación (McGee y cols., 2000). Por último cabe señalar que se han propuesto tres modelos hipotéticos que podrían determinar el destino de los folículos. En primer lugar, se propone que pudiera estar determinado por una deficiencia inherente, ya sea genética o de algún componente citoplásmico del ovocito o de las células somáticas o del ambiente folicular. El segundo modelo postula que la mayoría, sino es que todos los folículos, son capaces de alcanzar la ovulación; al no ser que se dispare un estímulo que inicie el proceso de atresia (por ejemplo: andrógenos, análogos de GnRH, IL-6, etc); y en tercer lugar se propone que el destino de los folículos es la atresia, sólo los folículos que alcancen cierto estadio específico y que coincidan con una señal crítica se rescatan de la atresia (gonadotropinas, estrógenos, factores de crecimiento: EGF/TGF, FGF-b, IGF-I son factores de sobrevivencia del folículo) (Hsueh y cols., 1994).

El proceso degenerativo en los folículos que no alcanzan la ovulación se le conoce como atresia. El mecanismo de selección de los folículos en la vida reproductiva normal está dado por la exposición a la FSH en un momento determinado del desarrollo. Los folículos que no tengan este soporte hormonal durante este período crítico estarán destinados a la atresia. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, descrita por primera vez por Kerr y colaboradores en 1972. La principal característica que indica que la atresia es un proceso apoptótico es que la apoptosis afecta a una sola célula o a un grupo reducido de células de una manera sincrónica (Schwartzman y cols., 1993), característica que se da dentro de un folículo y no en los folículos que se encuentran a su alrededor, mientras que otros tipos de muerte celular como la necrosis afectan a toda un área (Wyllie y cols., 1980a). Los cambios tempranos de la apoptosis, incluyen la pérdida de las uniones celulares y otras estructuras especializadas de la membrana, al mismo tiempo que el citoplasma y la cromatina nuclear se condensan (Schwartzman y cols., 1993).

La disminución del volumen del citoplasma está asociada con la pérdida de iones y fluido intracelular, así como la dilatación del retículo endoplásmico y la formación de vesículas que se fusionan con la membrana plasmática, liberando su contenido al espacio extracelular (Lockstin y cols., 1981, Morris y cols., 1984). Conforme el proceso continúa, el núcleo se rompe en varios fragmentos. Posteriormente, la célula se divide en diversos fragmentos que contienen estos restos nucleares con organelos citoplásmicos intactos. A estos fragmentos se les conoce como cuerpos apoptóticos y son fagocitados por las células circundantes o son liberados al lumen adyacente (Schwartzman y cols., 1993). Estos cuerpos apoptóticos son liberados a la cavidad antral dentro del folículo y cabe señalar la presencia de macrófagos en esta región, encargados de fagocitar dichos cuerpos (Katabuchi y cols., 1997).

La apoptosis se asocia con la activación de endonucleasas que degradan el ADN cromosómico en fragmentos de 50 a 300 kilobases y posteriormente en fragmentos más pequeños (Wyllie y cols., 1980b). La atresia folicular aparentemente es un proceso apoptótico, pues está mediada a su vez por la activación de endonucleasas. Una manera de demostrar la presencia de la apoptosis está basada en este fundamento, ya que al realizar una electroforesis en geles de agarosa con el ADN aislado de tejidos en apoptosis, se observa una figura característica similar a una escalera de fragmentos (fragmentos oligonucleosomales), a diferencia de una degradación completa del ADN en otros tipos de muerte celular (Hsueh y cols., 1994). El patrón de fragmentación del ADN que se presenta en células apoptóticas también se encontró en folículos atrésicos pero no en los sanos, demostrando el papel de la apoptosis en la atresia folicular (Hsueh y cols., 1994). En el folículo de ovarios humanos, la apoptosis ocurre en folículos antrales y preantrales, principalmente en las células de la granulosa, mientras que no ocurre en los folículos dominantes (Yuan y cols., 1997). Las características morfológicas de la atresia han sido descritas como cambios progresivos en todos los tipos celulares del folículo. Una señal temprana de la atresia es la presencia de núcleos picnóticos dentro de las células de la granulosa (Hirschfeld, 1989). Conforme progresa la atresia se va dando el desprendimiento de las células de la granulosa de la membrana basal (Junquiera y cols., 1989) y aumenta la presencia de restos celulares en la cavidad antral (Hay y cols., 1976), fragmentación de la lámina basal (Bagavandoss y cols., 1983) y reducción masiva en el número de células de la granulosa (Byskov, 1974). La separación de las células pudiera estar asociado a cambios en la expresión de la proteína cx-43 de las uniones tipo gap (Granot y cols., 1998). La disminución de las proteínas de las uniones tipo gap está asociada a cambios estructurales en la granulosa. También se ha informado la reducción en la síntesis de ADN (Wang y col, 1993a) y de proteínas en las células de la granulosa, disminución en la unión de las gonadotropinas a su receptor (Wang y col, 1993b), disminución en la síntesis de ARNm para la aromatasa y para receptores de gonadotropinas en los folículos atrésicos (Bao y col, 1998, Hsueh y cols., 1994, Yoshinaga-Hirabayashi y col, 1995). En algunas especies, se ha determinado la disminución en la síntesis de estrógenos y un incremento en la síntesis de progesterona, dado aparentemente por un decremento en la actividad de la C17,20-liasa, dando como resultado una disminución en las concentraciones de sustrato para la aromatización en la granulosa y una pérdida de la actividad de la aromatasa (Otsuka y cols., 1997). El ovocito se va desprendiendo del cumulus y posteriormente se va fragmentando (Billig H y cols., 1996). Estos cambios morfológicos que se observan durante la atresia son semejantes a los de las células en apoptosis (Hsueh y cols., 1994), así como el consumo de energía descrito en los procesos apoptóticos. Basándose en estudios realizados con folículos preovulatorios en la rata, Hsueh y cols. (1994), postularon un modelo de regulación de la apoptosis folicular involucrando diversos factores de crecimiento. Los autores sugieren que las

células de la granulosa son las únicas que sobrellevan la apoptosis en el ovario, sin embargo, tanto señales endocrinas como paracrinas convergen para regular este proceso, sugiriendo una inter-relación estrecha con las células de la teca.

Diversos mecanismos intraováricos autocrinos, paracrinos y endocrinos están involucrados en el desarrollo folicular y en la atresia. Las gonadotropinas y la hormona del crecimiento actúan en las células de la granulosa estimulando la producción del IGF-I y suprimiendo la producción de las proteínas que unen IGF (IGFBP) (Hsueh y cols., 1994). Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs), consisten en dos cadenas polipeptídicas homólogas de gran semejanza con insulina. El IGF-I se ha encontrado en los folículos preantrales mientras que IGF-II en folículos preantrales y en los dominantes. El receptor para IGF-II se encuentra en las células de la teca y las de la granulosa. En el fluido folicular se han encontrado ambos IGFs. El IGF-II es el principal IGFs en humanos, es un agente autocrino en las células de la teca y un regulador paracrino en la granulosa. En los folículos dominantes, IGF-II es un regulador paracrino (Hsueh y cols., 1994). Los IGFs sinergizan el efecto de las gonadotropinas, amplificando la señal hormonal. El IGF-I actúa en la teca y estimula la producción de factores de sobrevivencia, tales como el factor de crecimiento epidérmico/factor de crecimiento transformante α (EGF/TGF α) el cual actúa en la granulosa inhibiendo la apoptosis. Las gonadotropinas estimulan a su vez la liberación de algún factor de sobrevivencia desconocido, diferente a IGF, que promueve la secreción de EGF/TGF α en la teca. El factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGFb) y TGF α son producidos en la granulosa suprimiendo a su vez la atresia por un mecanismo autocrino o paracrino (Hsueh y cols., 1994). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) tiene una estructura análoga al factor de crecimiento transformante (TGF- α) es una cadena simple polipeptídica; ambos se unen a un mismo receptor (EGF/TGF- α) y probablemente tienen una potencia aparentemente igual en la mayoría de los sistemas estudiados. Los EGFs promueven un potente efecto regulador en la proliferación de la granulosa y su diferenciación. Los TGFs son cadenas polipeptídicas de dos cadenas homodiméricas y son reguladores polifuncionales. El TGF- β 1 promueve la proliferación y la diferenciación de la granulosa de ratas. Se encuentra en grandes cantidades en el líquido folicular, en el ovocito, en la granulosa y en la teca; por otro lado, el TGF- β 2 se ha identificado en las células de la teca y en células del cuerpo lúteo. Las concentraciones de éstos incrementan conforme progresa el desarrollo del folículo y aparentemente modulan la producción de inhibina y activina en las células de la granulosa luteinizadas en el humano.

Dentro de la familia del TGF- β se encuentran otros dos miembros: activina e inhibina, que en conjunto con la folistatina, tienen un rol en el desarrollo folicular (Li y cols., 1995). Las tres subunidades de la inhibina se expresan en respuesta a las gonadotropinas o con factores que incrementan las concentraciones intercelulares de AMPc. A diferencia de la inhibina, la activina no juega un papel endocrino en el eje hipófisis gónada, debido a que la activina en el suero de humanos se encuentra unida a proteínas (especialmente folistatina) (Nakamura y cols., 1990). La activina que deriva de las células de la granulosa promueve la inducción de la síntesis de receptores para LH en la granulosa (Hasegawa y cols., 1988), y en la teca, suprime la síntesis de andrógenos estimulada por LH (Hsueh y cols., 1987). En las células de la granulosa del humano, la activina suprime la producción de progesterona y de estrógenos, y promueve a su vez la foliculogénesis (Woodruff y cols., 1990).

Comunicación intercelular vía uniones comunicantes

Las uniones tipo gap conectan a células adyacentes y permiten la comunicación y un intercambio directo entre las células, mediante el intercambio de nutrientes, iones inorgánicos y moléculas con un peso molecular menor a 1 kDa (Ca^{2+} , AMPc, inositol 1,4,5-trifosfato). Las uniones tipo gap consisten en dos hemicanales (conexones) formados cada uno de seis proteínas transmembranales, llamadas conexinas (cx). La unión de los extremos de las conexinas de dos células adyacentes da como resultado un canal intercelular (*figura 7*). La familia de conexinas incluye alrededor de 16 conexinas (8 identificadas en ratón): cx-26, cx-30, cx-30.0, cx-31, cx-31.1, cx-32, cx-33, cx-37, cx-40, cx-43, cx-45, cx-46 (Grazul-Bilska y cols., 1997), cx-50 (Zampighi y cols., 1999), cx-57 (Manthey y cols., 1999) y cx-60 (Ishihara y cols., 1998) las cuales se han clasificado con base en su tamaño molecular.

Como se describió anteriormente el desarrollo folicular requiere de una estrecha comunicación entre los diferentes tipos celulares del ovario. Dentro del folículo en desarrollo, el ovocito se encuentra separado por un número variable de células de la granulosa y de la teca, éstas últimas son las únicas que tienen un contacto directo con los capilares ováricos; en este sistema avascular, la comunicación entre el ovocito y las células somáticas circundantes es esencial para un correcto funcionamiento (Wright y cols., 2001). Desde hace varios años se ha descrito la presencia de este tipo de uniones en el ovario de diferentes especies. Se puede mencionar que en el folículo ovárico, las uniones tipo gap facilitan que el ovocito tenga los nutrientes necesarios, tales como aminoácidos, producidos en las células somáticas (Biggers y cols., 1967). Las uniones tipo gap median una cooperación metabólica entre el ovocito y las células somáticas y transmiten diversos factores endocrinos y paracrinós (para revisión de uniones tipo gap, ver Eppig 1991; Kidder y cols., 2002; Grazul-Bilska y cols., 1997). Las uniones tipo gap coordinan el crecimiento folicular y la producción de hormonas esteroides (Grazul-Bilska y cols., 1997). Por otra parte, mantienen el arresto meiótico del ovocito en el folículo mediante señales tónicas y de baja intensidad de AMPc (Dekel, 1988) producidas por la granulosa. La comunicación vía uniones tipo gap juega un papel importante en la maduración final del ovocito y en las vías de transducción generadas por la LH (Dekel, 1988). Estudios realizados por Wright y cols (2001) demostraron un papel diferencial de la comunicación tipo gap en la regulación de la foliculogénesis, maduración del ovocito y en la atresia. Los autores encontraron que la expresión de conexinas incrementa con el tamaño folicular, una ausencia de conexinas en los folículos primordiales y detectaron ocasionalmente su presencia en folículos primarios.

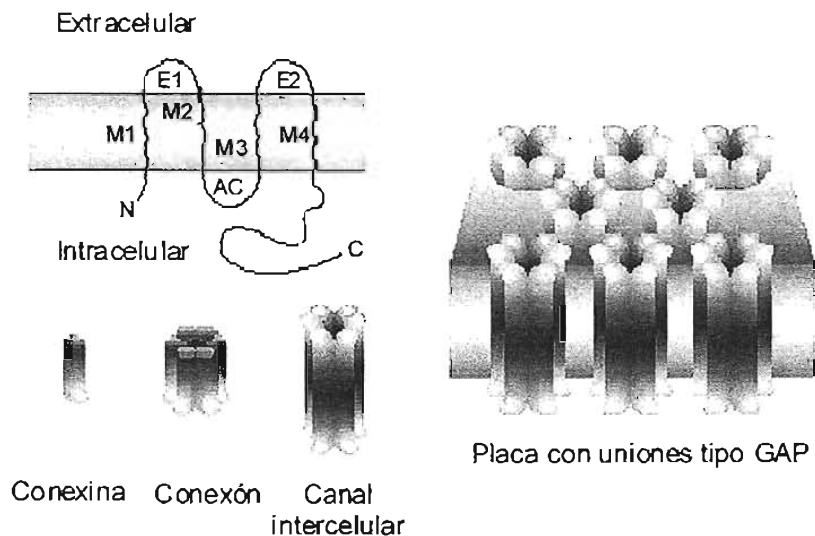


Figura 7. Organización de conexinas en conexones, canales intercelulares y en placas. AC: Asa citoplásmica; E1 y E2: dominios extracelulares; M1-M4: dominios membranales. (Kudler y cols., 2002).

Los folículos secundarios tanto en ratones prepúberes como adultos expresan uniones tipo gap. El incremento en la expresión de conexinas en los folículos de mayor tamaño pudiera estar inducida por la producción de estrógenos en las células de la granulosa, las cuales proliferan conforme el folículo crece (Wright y cols., 2001). Como se ha mencionado anteriormente la FSH es el regulador más importante en el crecimiento y el desarrollo de los folículos antrales en el ovario, por lo que varios autores han relacionado a la FSH con la formación de uniones tipo gap, las cuales se han encontrado en las células de la granulosa, y que están constituidas principalmente por la cx-43. En estudios previos (Sommersberg y cols., 2000) se demostró que la cx-43 y las uniones gap son mucho más abundantes en los folículos antrales grandes comparado con los preantrales pequeños y con los preantrales, y que esta regulación en la producción de las conexinas está regulada por la FSH (Sommersberg y cols., 2000; Granot y cols., 1998, 2002). Los folículos sanos expresan una mayor cantidad de cx-43, mientras que en los folículos atrésicos, la expresión de conexinas (particularmente cx-43) se encuentra reducida (Wiesen y cols., 1994). Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo celular de la atresia folicular es mediante la vía apoptótica (Tilly 1996), por lo que se ha involucrado a las uniones tipo gap en la transmisión de las señales que permiten la sobrevivencia de las células y así, como parte de una cascada apoptótica, reducir la comunicación intercelular con el cese de factores de sobrevivencia, resultando en la muerte del folículo. La disminución en el contacto celular es una característica de la apoptosis, así que una reducción en la expresión de conexinas pudiera reflejar la muerte celular (Willie y cols., 2001). Por otra parte, una hipótesis alternativa es que la atresia pudiera estar coordinada a su vez por la comunicación vía gap dentro del folículo; por ejemplo, la expresión de la cx-31.1 se encuentra restringida a folículos atrésicos (Willie y cols., 2001).

La mayoría de las conexinas ováricas se encuentran restringidas, a localizaciones definidas, por ejemplo, la cx-40 se encuentra en el endotelio de los vasos sanguíneos, la cx-37 en el ovocito; por el contrario, la cx-43 es la más abundante en el ovario y es expresada en diversas células endocrinas ováricas, incluyendo las células de la granulosa, teca y células luteinizadas. Estudios en cultivos de ovarios de ratones transgénicos deficientes en la producción de cx-43, demuestran que ésta tiene un papel importante en el desarrollo folicular y en la función reproductiva (Juneja y cols., 1999).

Planteamiento del problema

Muchos de los sistemas empleados tanto *in vitro* como *in vivo* ofrecen algunas ventajas y desventajas en el estudio de las hormonas; por ejemplo, los bioensayos *in vitro* cuantifican la aromatización de andrógenos o la cantidad de AMPc producida (u otros mensajeros) en cultivos de granulosa, de células de Sertoli o por líneas celulares que expresan el receptor recombinante para la FSH humana. Estos estudios tienen la ventaja de no involucrar procesos fisiológicos tales como la depuración, la vida media plasmática y la interacción con otros tipos celulares, y solamente pueden medir un parámetro en un determinado momento del desarrollo. La foliculogénesis involucra un desarrollo sincrónico de diferentes tipos celulares y compartimentos, por lo que un sólo parámetro de respuesta es inadecuado para caracterizar la compleja respuesta folicular a la FSH. Algunos procesos específicos en el desarrollo folicular incluyen la diferenciación sinérgica de las células de la granulosa y de la teca, el desarrollo de una cavidad antral y la síntesis y secreción de factores al fluido antral y a la circulación. Este desarrollo altamente complejo requiere FSH y otros factores para su progresión, así como la interacción de varios tipos celulares, de la cavidad antral y en general de la morfología intacta del folículo. Es por eso que surge la necesidad de un método que pueda integrar tanto los aspectos moleculares como los fisiológicos de manera simplificada pero que responda como un sistema *in vivo*, en el que por ejemplo, interactúen los diferentes tipos celulares y sea posible dar un seguimiento al desarrollo folicular. El cultivo de folículos intactos permite el estudio del desarrollo folicular de una manera simplificada semejante a lo que acontece *in vivo*, siendo una herramienta útil para el análisis de un proceso tan complejo como lo es el desarrollo folicular.

El estudio de los efectos de las variantes de glicosilación de la FSH en el folículo ovárico permitirá: 1) A corto plazo, ampliar los conocimientos acerca del significado fisiológico de las variantes de esta gonadotropina en el crecimiento folicular, en la proliferación y atresia folicular medido en dos sistemas, uno que involucra al organismo *in vivo*, y el segundo que involucra al folículo intacto *in vitro* 2) Comparar ambos sistemas y validar el sistema *in vitro* como un modelo útil y veraz de lo que acontece *in vivo*, y 3) A largo plazo, plantear el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para su uso en reproducción animal y el tratamiento de la infertilidad en la mujer.

HIPÓTESIS

A dosis equivalentes, las isoformas menos ácidas/sializadas de la FSH humana, presentaron una actividad biológica, en términos de inducción de efectos en el crecimiento folicular, la proliferación celular y la síntesis de factores específicos, mayor o igual que sus análogos más ácidos.

OBJETIVOS

Estudiar las características biológicas de las isoformas de la hormona estimulante del folículo humana (FSH) intrahipofisaria en términos de inducción de crecimiento y proliferación celular en sistemas *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos particulares

1. Separar y purificar las diferentes isoformas de FSH humana intrahipofisaria mediante cromatoenfoque preparativo y cromatografía por afinidad.
2. Identificar las diferentes isoformas de FSH mediante radioinmunoensayo.
3. Conocer la actividad biológica *in vitro* de las diferentes isoformas mediante la producción de estrógenos en un bioensayo de células de la granulosa de rata (GAB).
4. Establecer la vida media plasmática de las diferentes isoformas.
5. Analizar los efectos biológicos *in vivo* de diferentes variantes purificadas de la FSH hipofisaria en ratas prepúberes previamente hipofisectomizadas, mediante el estudio de sus efectos en:
 - 5.1 La incorporación de ^3H -timidina, indicador de proliferación celular, en las células de la granulosa.
 - 5.2 La presencia de núcleos picnóticos indicadores de muerte y por consecuencia de atresia de las células de la granulosa.
 - 5.3 Observación de la formación de la cavidad antral.
 - 5.4 Observación de la morfología del ovario.
6. Estudiar los efectos biológicos *in vitro* de isoformas purificadas de la FSH hipofisaria en un sistema de folículos de ovarios de ratones inmaduras, a través de sus efectos en:
 - 6.1 Diámetro mayor folicular dado por los límites de la membrana basal (diámetro folicular interno).
 - 6.2 Diámetro mayor folicular dado por los límites externos de las células de la teca (diámetro folicular externo).
 - 6.3 Observación de la formación de la cavidad antral.
 - 6.4 Observación de la morfología folicular.
 - 6.5 Análisis inmunohistoquímico de conexina 43.

MÉTODO

A. Obtención de las variantes de FSH.

Los extractos de hipófisis anterior de humanos fueron donados por el Programa Regional de Producción de Reactivos-OMS, (Instituto Nacional de Endocrinología, La Habana, Cuba). Las muestras fueron fraccionadas por cromatoenfoco preparativo siguiendo el método descrito previamente (Ulloa-Aguirre y cols., 1992) para el cual se prepararon columnas de 50 x 1 cm de la resina de intercambio PBE-94 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA). Cada columna fue equilibrada con solución amortiguadora de Imidazol-HCl (pH 7.4). A continuación la muestra se depositó en la superficie de la columna y después de penetrar en la resina se agregó el amortiguador de corrimiento Polybuffer-74 (Pharmacia Fine Chemicals), pH 4,0 a una dilución 1:8 en agua desionizada. Se colectaron fracciones de 2 mL cada una a una velocidad de flujo de 2 mL por 20 min. a 4°C y se determinó el pH de cada fracción. Al registrarse un pH de 4.0 se cambió el eluyente por una solución de NaCl 1M con el fin de obtener el material no recuperado en el rango de pH de 7.4 a 4. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la cuantificación de FSH. El contenido de FSH en las fracciones se determinó por radioinmunoensayo (RIA). Una vez identificado el patrón de distribución por carga de la FSH se procedió a dividir en intervalos de pH, y se mezclaron las fracciones que contenían la mayor concentración de FSH dentro de cada intervalo. Los grupos resultantes fueron dializados contra agua bidestilada en bolsas de membrana para diálisis con un límite de permeabilidad de 12,000 Mr (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, EUA) por 24 horas y contra carbonato de amonio por 24 horas más. Las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C.

Radioinmunoanálisis (RIA) de FSH

La cuantificación de la FSH humana se realizó por RIA con reactivos donados por el NIADDK (National Institute of Arthritis, Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, EUA), utilizando como estándar la preparación hipofisaria de referencia (LER-907) y como trazador la preparación altamente purificada FSH I-3 radiomarcado con NaI¹²⁵ (Amersham International Limited, Amersham, UK) siguiendo el método de la cloramina T (Greenwood y cols., 1963). La actividad específica obtenida fue de 35.91 µCi/µg. El antisuero empleado fue el anti-hFSH-6 (NIADDK), a una dilución final de 1:100,000. Para evitar las variaciones entre los análisis, todas las muestras fueron procesadas en una misma corrida.

Inmunoextracción de LH

Una vez liofilizadas las muestras se resuspendieron en bicarbonato de amonio 0.1M pH 7.4 y fueron transferidas a columnas de 1 x 10 cm de sefarosa 4B (Pharmacia Fine Chemicals) con un anticuerpo monoclonal previamente inmovilizado antiLH-IgG [antiLH-BG7; Programa Especial de Investigación en Reproducción, Organización Mundial de la Salud (Cuba-México), México DF, México] para remover la LH que coeluye durante la

separación mediante el cromatoenfoque. Este procedimiento removió > 90% de la LH inmunoactiva presente en la muestra concentrada original.

B. Determinación de la Actividad Biológica in vitro

Para los estudios realizados en la presente tesis, las ratas y los ratones se mantuvieron bajo supervisión del personal técnico de los bioterios siguiendo las normas y leyes del Diario Oficial de la Nación del 6 de enero de 1987 de la Secretaría de Salud, México y de la Ley de Protección de Animales en el Distrito Federal del Diario Oficial de Enero de 1981, así como los criterios internacionales de la Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de la Unión Americana (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Para determinar la actividad biológica de las isoformas y el grado de paralelismo entre sus pendientes se realizaron biensayos de aromatización en células de la granulosa de rata (GAB) siguiendo el método de Jia y Hsueh (Jia y cols., 1985), para lo cual se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 21 a 22 días de edad, a las cuales se les implantó en el dorso una cápsula subcutánea de silastic (10×2mm) conteniendo aproximadamente 10 mg de dietil-estil-bestrol (DES) (Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, EUA) para estimular la proliferación celular de la granulosa. Tres días después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron los ovarios; los folículos fueron puncionados para obtener las células de la granulosa. Las células fueron centrifugadas 15 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo McCoy 5a libre de suero (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) a una concentración de 100,000 células por cada 100 µl de medio. El medio de cultivo empleado fue el medio McCoy 5a complementado con 4 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co), 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomina (Gibco Laboratories), 1.125 µM de androstenediona (Sigma Chemicals Co), 0.125 µM de DES (Sigma Chemicals Co) y 1 µg de insulina bovina (Eli Lilly y Cia, México) y con diferentes dosis de las isoformas de FSH. El cultivo se realizó en placas de 24 pozos de 16 mm de diámetro (Gibco Laboratories) y a diferentes tiempos de exposición: 24, 48 y 72 horas. El medio de cultivo fue sustituido cada 24 horas y almacenado a -20°C hasta el momento de la cuantificación de estradiol mediante RIA. Los resultados fueron expresados en ng totales de estrógenos por pozo de cultivo.

Radioinmunoensayo (RIA) de 17β-estradiol

Las concentraciones de estradiol se determinaron por el método de RIA, empleando como trazador estradiol tritiado (Amersham International Limited, Reino Unido) y como curva estándar y anticuerpo los reactivos donados por el Programa Especial de Investigación en Reproducción de la Organización Mundial de la Salud (Cuba-México). La sensibilidad del ensayo fue de 6.4 pg/tubo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en una misma corrida.

C. Vida media plasmática de las formas moleculares de la FSH.

El estudio se realizó mediante la canulación de la vena cava de ratas machos adultos de la cepa Long-Evans siguiendo el método modificado previamente descrito por Timossi y colaboradores (1998). Se utilizaron ratas machos adultos Long-Evans, las cuales fueron anestesiadas en una cámara saturada con eter. Una vez anestesiada se le sujeta en posición decúbito dorsal sobre una mesa de corcho, aproximando la mascarilla anestésica a medio centímetro de su nariz, para evitar que se despierte durante el experimento. Empleando pinzas de disección y tijeras se llevó al cabo una incisión media xifopúbica, iniciando con la piel y siguiendo con el plano musculoaponeurótico y peritoneal. Se colocaron los retractores de pared a ambos lados y se fijaron con alfileres a la misma mesa. De esta manera quedaron expuestos los órganos intra-abdominales. Empleando una gasa húmeda en solución salina, se retrayeron las asas intestinales hacia afuera y hacia el lado izquierdo del animal para exponer el retroperitoneo. Mediante disección roma se separó el peritoneo y se expuso la vena cava inferior, se disecó y se separó de la aorta, se colocaron dos ligaduras vasculares transitorias (distal y proximal) que se traccionaron con pinzas hemostáticas, ocluyendo de esta manera la circulación, se realizó un corte en el borde de la vena por donde se introdujo un catéter de 1mm de diámetro y 3-4 cm de longitud y se fijó el catéter anudando la ligadura proximal. A través de este catéter se inyectó lentamente una dosis equivalente a 8 UI de FSH recombinante (FSHrec) (ORG32489) (Organon International BV, Oss, Holanda, 1 ng de FSHrec= 3.29 ng LER-907, de acuerdo a curvas de calibración preliminares) de cada una de las isoformas. Se realizaron extracciones de 0.6 ml de sangre a diferentes tiempos (5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 y 300 minutos). Cada volumen extraído fue sustituido con solución salina 0.9%. Las muestras fueron conservadas a 4°C y centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero fue almacenado a -20°C hasta la cuantificación de FSH mediante RIA. Se utilizaron un total de cuatro animales por cada grupo experimental. Para el análisis y determinación de la cinética de las diferentes isoformas de FSH, se utilizó un programa interactivo computarizado para el análisis estadístico y farmacocinético de datos (PKCALC) (Shumaker 1986).

D. Efectos de las isoformas en la proliferación celular in vivo

Para estudiar el efecto de las diferentes variantes de la FSH humana en condiciones *in vivo*, se emplearon ratas hembras prepúberes (21 días de edad) de la cepa Wistar gentilmente donadas por la Universidad Autónoma de Aguascalientes, a las cuales se les realizó previamente una hipofisectomía según el método descrito por Quintanar-Stephano y cols. (1994) descrito en el anexo A. Los animales tuvieron libre acceso a la comida peletizada y al agua y fueron mantenidas bajo condiciones estándares de luz (12L:12O) a 21°C.

Dosis de isoformas

Para la estandarización de las dosis de las diferentes isoformas se utilizó una preparación de FSH recombinante (FSHrec) (ORG32489) en dos diferentes dosis (2.5UI y 8.0UI). Seis horas después de la hipofisectomía grupos de cuatro ratas fueron tratadas con las dos dosis de FSHrec (para la estandarización de la dosis) administrada

por vía subcutánea o con una dosis equivalente a 8.0 UI de FSHrec de las diferentes isoformas de FSH. Los animales fueron decapitados después de 6, 12 y 18 horas de haber recibido la última inyección. Una hora antes del sacrificio, cada animal recibió por vía intraperitoneal 2.5 $\mu\text{Ci/g}$ de peso de [^3H]-timidina (Amersham International, Inglaterra). Se incluyeron así mismo, grupos de animales hipofisectomizados que recibieron únicamente el vehículo (testigo salino) así como grupos de animales a los cuales se les realizó una hipofisectomía ficticia o negativa (hipox (-)), provocándose el trauma operatorio pero sin extraer la hipófisis. Durante la necropsia, se comprobó que la extracción de la hipófisis haya sido completa.

Procesamiento de tejidos

Después de las 6, 12 y 18 horas de exposición a las diferentes isoformas de FSH, los ovarios se extrajeron asépticamente, se disecaron en solución salina y se fijaron con la solución de Karnovsky (Karnovsky 1965) modificado y se incluyeron en una resina plástica Epon® 812 (SPI Supplies, PA, EUA) siguiendo el método del anexo B para hacer cortes semifinos de 1 μm de grosor, con un ultramicrotomo Nova (LKB, Bromma). De cada 10 secciones se tomaron dos cortes, uno para la autorradiografía y otro que fue teñido con azul de toluidina 1%. Para el análisis histológico, los cortes fueron observados al microscopio óptico (Nikon HFX-DX).

Autorradiografía

La autorradiografía se realizó mediante la técnica descrita por Rogers (Rogers 1979), para lo cual se empleó la emulsión autorradiográfica NTB2 (Eastman Kodak, Rochester, NY) a una dilución 1:1 con agua desionizada. Los cortes se expusieron en oscuridad a 4°C de tres a cuatro semanas. Para el revelado de las laminillas se empleó el revelador D-11 (Eastman Kodak, Rochester, NY) a una dilución 1:1 con agua bidestilada por 4 minutos; las laminillas fueron fijadas en el fijador de Kodak por 4 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron con agua destilada y se tiñeron con azul de toluidina al 1% a temperatura ambiente, en una cámara húmeda durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con ácido acético diluido y se montaron con la resina acrílica antioxidante Accu-Mount 60 (Baxter Scientific Products, EUA) para su observación posterior.

Análisis Microscópico

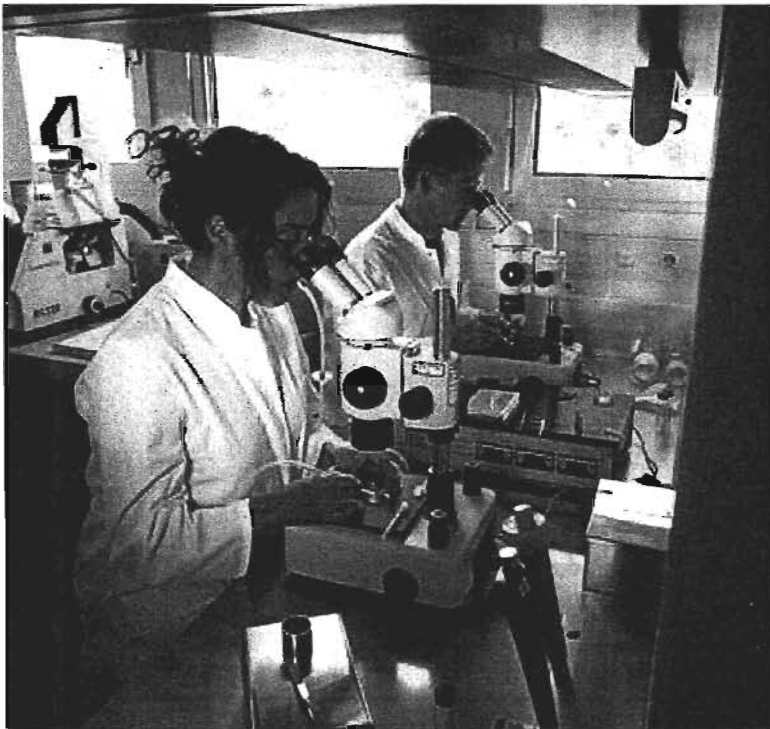
Los cortes fueron analizados en un microscopio óptico. Se contaron las células marcadas de cada uno de los folículos observados, y se identificó la presencia de células con núcleos picnóticos. Se clasificó a cada uno de los folículos en antrales y preantrales, y en sanos y atrésicos. Un folículo fue considerado como atrésico cuando presentó tres o más de tres células de la granulosa con núcleos picnóticos. Sólo se incluyeron durante el análisis de conteo celular, los folículos cuyo ovocito mostró el nucleolo y que se encontraron completos.

E. Efectos en la maduración folicular in vitro

Para analizar el efecto de las diferentes isoformas de FSH en la maduración folicular, se empleó un sistema *in vitro* de folículos de ovarios de ratones hembras de 18 a 20 días de edad descendientes (F_1) de la cruce entre hembras

de la cepa C57B1/6J y machos CBA/J, como ha sido descrito por Vitt y cols., (1998), adquiridos en Harlan Winkelmann GmbH (Borhen, Alemania).

Los ratones utilizados para obtener el suero hipogonadotrópico (*hpg*) fueron animales maduros (40-45 días de edad) descendientes de la cruce *hpg/bm* (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA). Los ratones hipogonadotrópicos homocigóticos (*hpg/hpg*) fueron seleccionados con inspección visual de los órganos reproductivos tanto internos como externos (testículos apenas visibles y útero delgado en comparación con los hermanos sanos de la misma camada). Para comprobar el estado gonadotrópico de los ratones se empleó la técnica descrita en el anexo C. Ambas cepas de animales fueron mantenidos bajo condiciones específicas de humedad, luz y temperatura, libre de patógenos y fueron alimentados *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados de acuerdo a las leyes de protección animal alemanas. Los animales fueron anestesiados con dietileter, desangrados por vía cardiaca y sacrificados por dislocación cervical.



Para cada cultivo se utilizaron ovarios de 4 animales los cuales fueron colectados bajo disección aséptica de los ovarios, y se transfirieron a medio L-15 Leibovitz (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado con 3mg/mL de BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 2.5 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich), 0.5µg/mL de L-glutamina(Gibco) y 5 µg/mL de apo-transferrina (Sigma-Aldrich).

Posteriormente se aislaron los folículos mediante disección con agujas de 27 x 13 mm; se trabajaron un par de ovarios a la vez por dos diferentes investigadores evitando la anoxia del tejido.

Se seleccionaron los folículos que presentaron el ovocito en la región central, con una capa homogénea de células de la granulosa y una monocapa delgada de células de la teca y con un tamaño entre 140-180 µm. Los folículos se colocaron en placas de cultivo de 4 pozos (Nunclon, Nalge Nunc International Corporation, Naperville, IL, EUA) con α-MEM (Gibco), para realizar una selección posterior de los folículos y a su vez para lavar y quitar el exceso de medio Leibovitz.

Aproximadamente 14 folículos por ratón cumplieron con estas características. El medio de lavado se suplementó en el momento de su uso con 3 mg/mL de BSA, 5 µg/mL de insulina, 1 µg/mL de L-glutamina, 10 µg/mL de transferrina y 50 µg/mL de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich). Después de la recolección, los folículos se transfirieron a un medio de cultivo final α-MEM suplementado con 5 µg/mL de insulina, L-glutamina 1 µM, 0.01

mg/mL de transferrina, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico y suero de ratón hipogonadotrópico al 5% (*hpg*). A excepción de los grupos control, el medio fue suplementado con diferentes dosis de las isoformas de FSH previamente purificadas (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml 800 ng/ml y 1000 ng/ml). Los folículos fueron distribuidos al azar. Se midió cada 24 horas el diámetro del folículo después de la transferencia al medio. El tamaño de cada folículo fue medido cada 24 h usando un microscopio estereoscópico Leica Wild M8 (Leica Microsystems GMBH, Nussloch, Alemania) con un aumento de 50×. Dos diferentes diámetros fueron medidos: 1) el diámetro entre los límites externos de la teca, referido como diámetro folicular externo y; 2) el diámetro entre la membrana basal, referido como diámetro folicular interno. Para cada diámetro se midió tanto el largo como el ancho y se tomó una media de ambas medidas. Los folículos se cultivaron individualmente por 4 días en placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano (Costar, Corning Science Products, Acton, MA, EUA). Se cultivaron 8 folículos por placa y el resto de los pozos se llenaron con agua estéril para evitar la evaporación del medio. Cada folículo se cultivó con 40 µL de medio y se transfirieron cada 24 horas a pozos con medio fresco. Después de transferir los folículos se recolectó el medio de cada pozo y se almacenó a -80°C para la cuantificación de 17-β estradiol. Cabe señalar que solamente se incluyeron en el estudio aquellos folículos que permanecieron intactos los 4 días. Los folículos se seleccionaron para su cultivo con base en su tamaño inicial en cuatro diferentes grupos: 1) muy pequeños (< de 159.99 µm); 2) pequeños (de 160 µm a 179.99 µm); 3) medianos (de 180 µm a 199.99 µm) y; 4) grandes (> de 200 µm).

Después de los 4 días de cultivo los folículos se procesaron mediante técnicas histológicas descritas en el anexo D y fueron incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 3µm de grosor con un microtomo de rotación y navajas metálicas. (Microm International GmbH, Walldorf, Alemania). Los cortes se colocaron en laminillas cargadas positivamente (Histobond, Marienfeld, Alemania) y fueron procesadas para la detección de conexina 43 por inmunohistoquímica siguiendo el método del complejo fosfatasa alcalina-antifosfatasa alcalina (APAAP, Dako A/S Glostrup, Dinamarca) descrito en el anexo E.

Cuantificación de 17β-Estradiol

La cuantificación de E₂ en el medio se realizó mediante un inmunoensayo enzimático usando un anticuerpo anti-17β-estradiol-6CMO-BSA (H.H.D. Meyer, Weihenstephan, Germany). Como trazador se empleó estradiol acoplado a peroxidasa (HRP; Horseradish peroxidase). El anticuerpo presentó las siguientes reacciones cruzadas: 3.9% con estrona, 3.4% con sulfato de estrona, 3.0% con estriol, 0.24% con glucurónido de estrona y <0.1% con otros esteroides. La sensibilidad del ensayo al 90% de unión fue de 0.3 pg/pozo. Los coeficientes de variación intra- e interensayo para los controles de calidad (alto y bajo) fueron de 6.7% y 11.4% (n=16), y 9.9% y 17.5% (n=34) respectivamente.

Análisis inmunohistoquímico de conexina 43

Una vez que las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina fueron examinadas y fotografiadas con un microscopio y cámara Leica (Leica Microsystems GmbH). El análisis cuantitativo se realizó en las imágenes de las secciones inmunoteñidas bajo valores constantes de contraste y brillo. La cuantificación de la inmunotinción se realizó por folículo mediante un análisis densitométrico usando un programa analizador de imágenes Scion (Scion

Corporation, EUA). Las imágenes a color fueron convertidas a escala de grises. Un valor arbitrario para el umbral fue usado para crear imágenes de tipo binario. Se analizaron áreas de $500 \mu\text{m}^2$ en dos diferentes regiones dentro del folículo: el área cercana al ovocito (area del cumulus) y el área cercana a la membrana basal (area mural). Los pixels que correspondían al área del tejido inmunoteñido fueron corregidos, contados y expresados como el porcentaje del área total.

Análisis Estadístico

Para comparar las diferencias entre las proporciones de folículos sanos y atrésicos, así como de los antrales y preantrales del estudio *in vivo*, se utilizó la prueba de χ^2 . Para analizar las diferencias en cuanto a la incorporación de [^3H]-timidina en cada uno de los diferentes grupos estudiados (dosis y tiempos de exposición) se utilizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), cuando esta prueba encontró diferencias se empleó una prueba para dos muestras (U-Mann Whitney) utilizando un nivel de significancia $p < 0.05$.

Para cada grupo experimental, el perfil de crecimiento de los folículos cultivados fue descrito como la media \pm Error Estándar (EE) del tamaño de los folículos en cada día de cultivo. Las comparaciones entre el tamaño folicular diario, el incremento diario y la cantidad de estradiol secretado entre los diferentes grupos fueron realizadas mediante un ANOVA de una vía. Las diferencias significativas en el número de folículos cultivados que presentaron cavidad antral y la producción de estradiol de los mismos fue asesorada mediante una prueba de χ^2 . Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta tesis se dividen en cinco partes: A) la separación por carga de las isoformas moleculares de la FSH mediante cromatoenfoco, B) el análisis de la actividad biológica *in vitro* (en células de la granulosa), C) vida media, D) el análisis del efecto de las diferentes isoformas en la proliferación celular *in vivo* y; E) el análisis de las mismas en la maduración folicular *in vitro*.

A) Isoformas de FSH

En la figura 1 se muestra un patrón representativo de los resultados obtenidos de los cromatoenfocos de hipófisis de humano, en donde las isoformas fueron separadas en función de sus puntos isoeléctricos [pI]. Cuando el gradiente alcanzó un pH de 4.0 se adicionó la solución de cloruro de sodio 1M, con lo que se forzó a aquellas isoformas de FSH que no eluyeron en el gradiente de pH entre 7.4 y 4.0, a salir de la columna, fracción a la que se le denominó “pico de sal” y se incluyó como la isoforma más ácida.

Como puede observarse en la figura 1 se detectó inmunoreactividad de la FSH a lo largo de casi todo el gradiente de pH analizado así como en el pico de sal. Se realizaron un total de 9 cromatoenfocos con una recuperación final de FSH del $79\pm 4.0\%$ de la concentración inicial depositada en la columna. Las fracciones de FSH que tuvieron un pH similar se mezclaron obteniendo así un total de 8 regiones o pozas, las cuales se les denominó “isoformas 1-8”. La tabla 1 muestra los rangos y las medianas de pH de las diferentes regiones o isoformas obtenidas.

ISOFORMA	RANGO DE pH	MEDIANA DE pH
1	7.10-5.99	6.53
2	6.43-5.69	6.05
3	6.18-5.35	5.69
4	5.62-4.95	5.30
5	5.31-4.63	4.97
6	5.08-4.27	4.65
7	4.69-3.75	4.22
8	<3.75	3.0

Tabla 1. Rangos y medianas de cada región de pH de las isoformas de FSH separadas por cromatoenfoco preparativo.

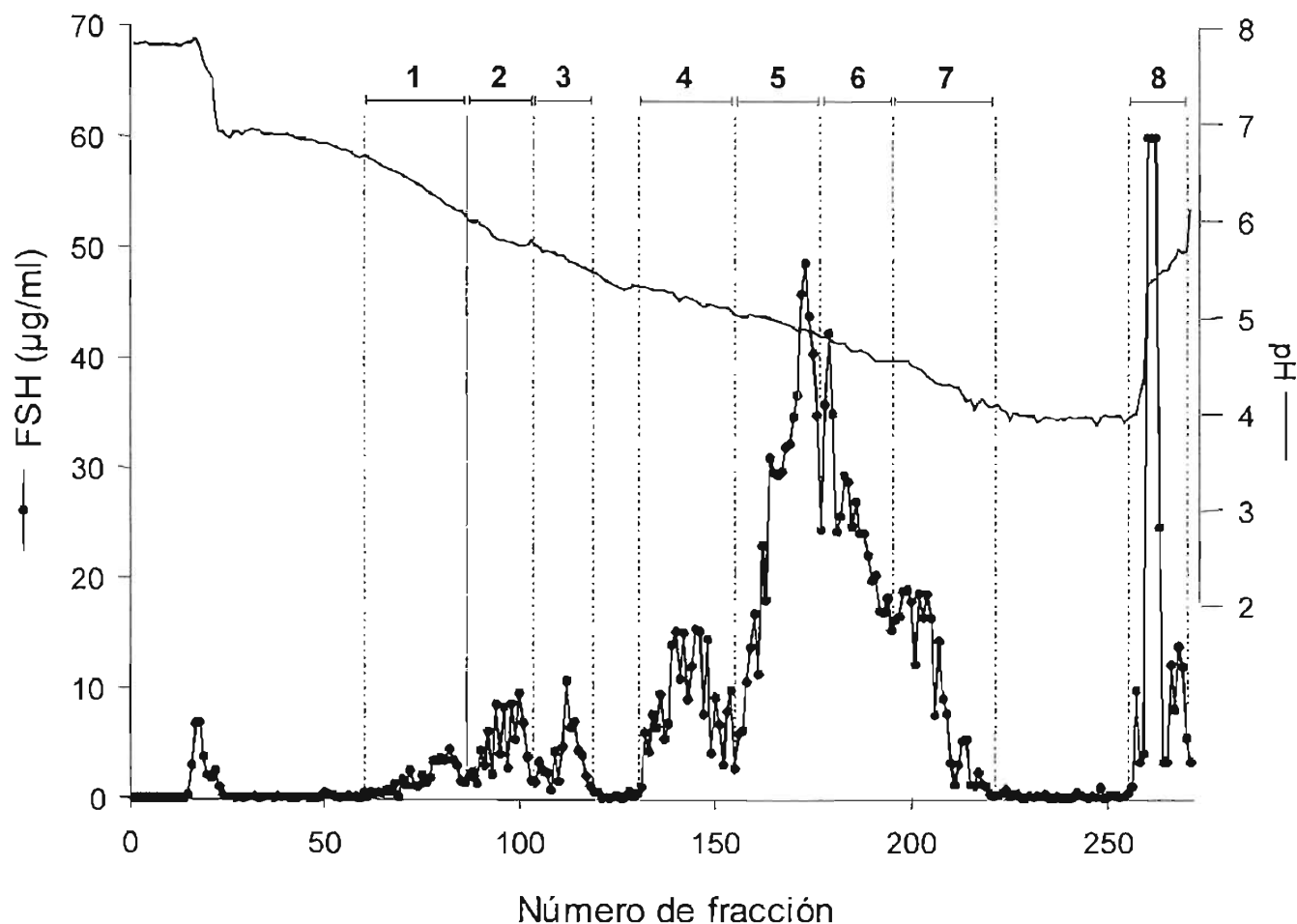


Figura 1. Perfil representativo de la distribución de pHs de FSH inmunoactiva después del cromatofoco preparativo de un extracto glicoproteico de hipófisis de humanos. Las fracciones para obtener las diferentes isoformas (1-8) se encuentran indicadas por los corchetes y están expresadas en µg/ml en términos del estándar LER-907.

B) Actividad biológica *in vitro*

Para el análisis de la bioactividad de las isoformas se realizó un ensayo de células de la granulosa (GAB) descrito previamente en el método. Para el análisis de los resultados se calculó el cociente B/I (biológico/inmunológico) (figura 2 y tabla 2). Todas las isoformas de FSH humana intrahipofisaria analizadas en el ensayo de células de la granulosa fueron capaces de inducir de manera significativa la producción de estradiol en forma dosis-dependiente y fueron paralelas entre sí y con la curva del estándar LER-907. (figura 2).

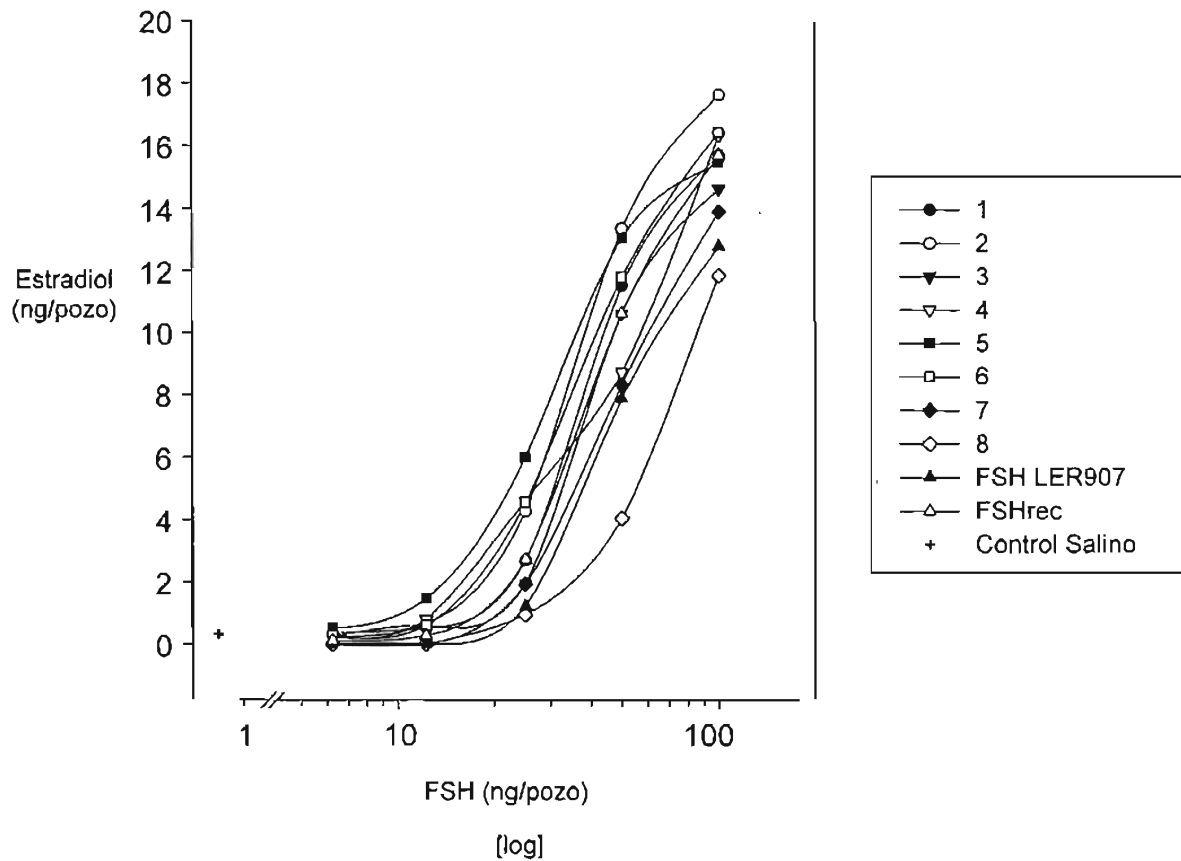


Figura 2. Capacidad de cada isoforma de FSH, FSH recombinante (FSHrec) y del estándar (LER-907) de inducir la producción de estrógenos en las células de la granulosa en cultivo.

Las isoformas más ácidas/más sializadas (isoforma 7 y 8) presentaron una relación B/I (0.73 ± 0.11 , 0.56 ± 0.08 respectivamente) significativamente menor que el resto de las isoformas (> 1.05) (Tabla 2).

ISOFORMA	COCIENTE B/I
1	1.14 ± 0.1
2	1.35 ± 0.17
3	1.07 ± 0.12
4	1.05 ± 0.17
5	1.36 ± 0.27
6	1.14 ± 0.11
7	$0.73 \pm 0.11^*$
8	$0.56 \pm 0.08^*$

* $p < 0.01$ vs 1-6.

Tabla 2. Cociente biológico sobre inmunológico de las diferentes isoformas 4 a 8 de FSH mostradas en la figura 1. Los valores representados son la media \pm EE de tres a cinco observaciones.

C) Vida media plasmática

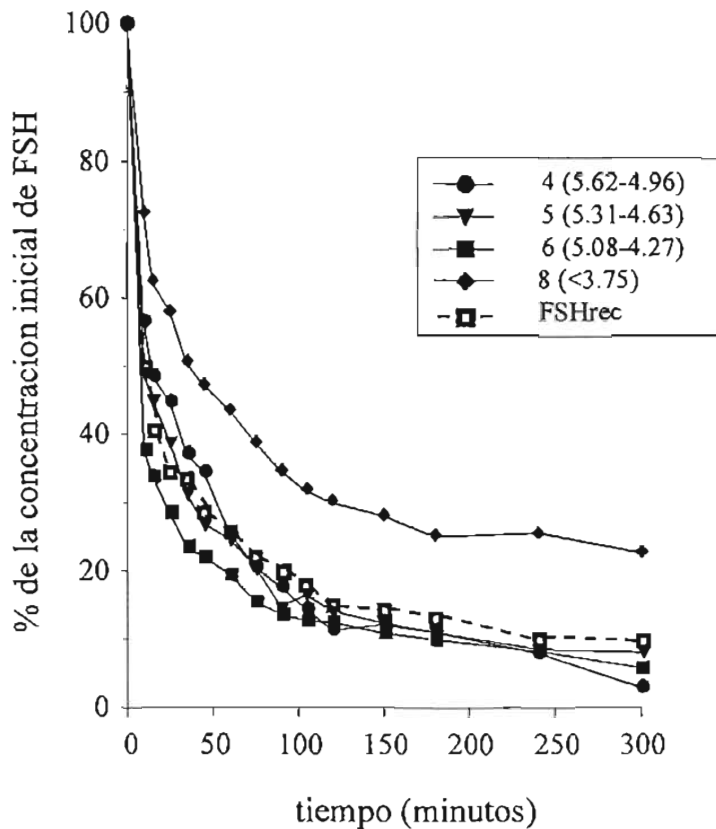


Figura 3. Curvas de depuración plasmática de las diferentes isoformas y de FSH recombinante (FSHrec). Cada curva representa la media de 5 observaciones.

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos en los experimentos realizados para determinar la vida media plasmática de las isoformas de FSH humana intrahipofisaria. La isoforma más ácida (isoforma 8), presenta un mayor porcentaje de la concentración inicial en los diferentes tiempos estudiados a diferencia de sus análogos más ácidos. En la tabla 3 se incluyeron algunos parámetros del análisis, donde se observa que la isoforma más ácida (isoforma 8) a diferencia de sus análogos menos ácidos tales como la isoforma 4, presenta significativamente una tasa de depuración plasmática menor (0.06 ± 0.01 vs 0.19 ± 0.06), un tiempo de residencia media mayor (227 ± 42 vs 112 ± 18), una mayor vida media plasmática (151 ± 3 vs 71 ± 1) y a su vez un mayor porcentaje de recuperación (22.6% vs 2.94%).

Cabe señalar que las isoformas 1, 2, 3 y 7 no se incluyeron en el estudio debido a insuficiente cantidad de material.

ISOFORMA	TDP (ml/min)	TRM (min)	T½ (min)	% rec (300 min)
4	0.195±0.06°	112±18	71±1	2.94
5	0.117±0.03	131±27	87±2	8.03
6	0.113±0.02	147±30	98±5	5.75
8	0.061±0.01*	227±42*	151±3*	22.6
FSHrec	0.12±0.01	152±8	100±6	10.2

* p<0.05 vs 4, 5 y 6.

° p<0.05 vs 6.

Tabla 3. Parámetros cuantificados en el estudio de vidas medias: TDP: tasa de depuración plasmática, TRM: tiempo de residencia media, T½: vida media y, % rec: porcentaje de recuperación a los 300 minutos después de la inyección. Los valores representados son la media ± EE.

D) Proliferación celular in vivo

Efecto de la FSH recombinante

Previamente a los experimentos realizados con las diferentes isoformas se llevó a cabo una estandarización que se realizó empleando dos dosis (2.5 y 8.0 UI) de FSH recombinante (FSHrec) y diferentes tiempos de exposición (6, 12 y 18 horas). El efecto de las diferentes dosis de FSHrec en el número de células que incorporaron [³H]-timidina, en los folículos con un diámetro < a 199 µm se muestra en la figura 4A. Al comparar las diferentes dosis, a las 6 horas de exposición, se observó un aumento significativo (p<0.05) entre las dosis de 0 UI y 2.5 UI (10.34 ± 0.83 células marcadas, 9.84 ± 0.76 células marcadas, respectivamente) con respecto a la dosis 8.0 UI (15.83 ± 1.52 células marcadas). A las 12 horas de estimulación hubo un incremento dosis dependiente (3.83 ± 0.70, 11.43 ± 0.97 y 17.44 ± 1.52 células marcadas para cada dosis). El testigo no hipofisectomizado [hipox (-)] (10.59 ± 2.52 células marcadas) no presentó diferencias significativas con 2.5 UI pero si las presentó (p<0.05) al compararlo con las dosis de 0 UI y 8.0 UI. A las 18 horas de estimulación se observó un aumento significativo (p<0.05) dosis dependiente (5.55 ± 0.97, 9.57 ± 0.92 y 20.72 ± 2.15 células marcadas para cada dosis). El hipox (-) (15.83 ± 2.44 células marcadas) fue significativamente diferente (p<0.05) con respecto a las dosis 0 UI y 2.5 UI.

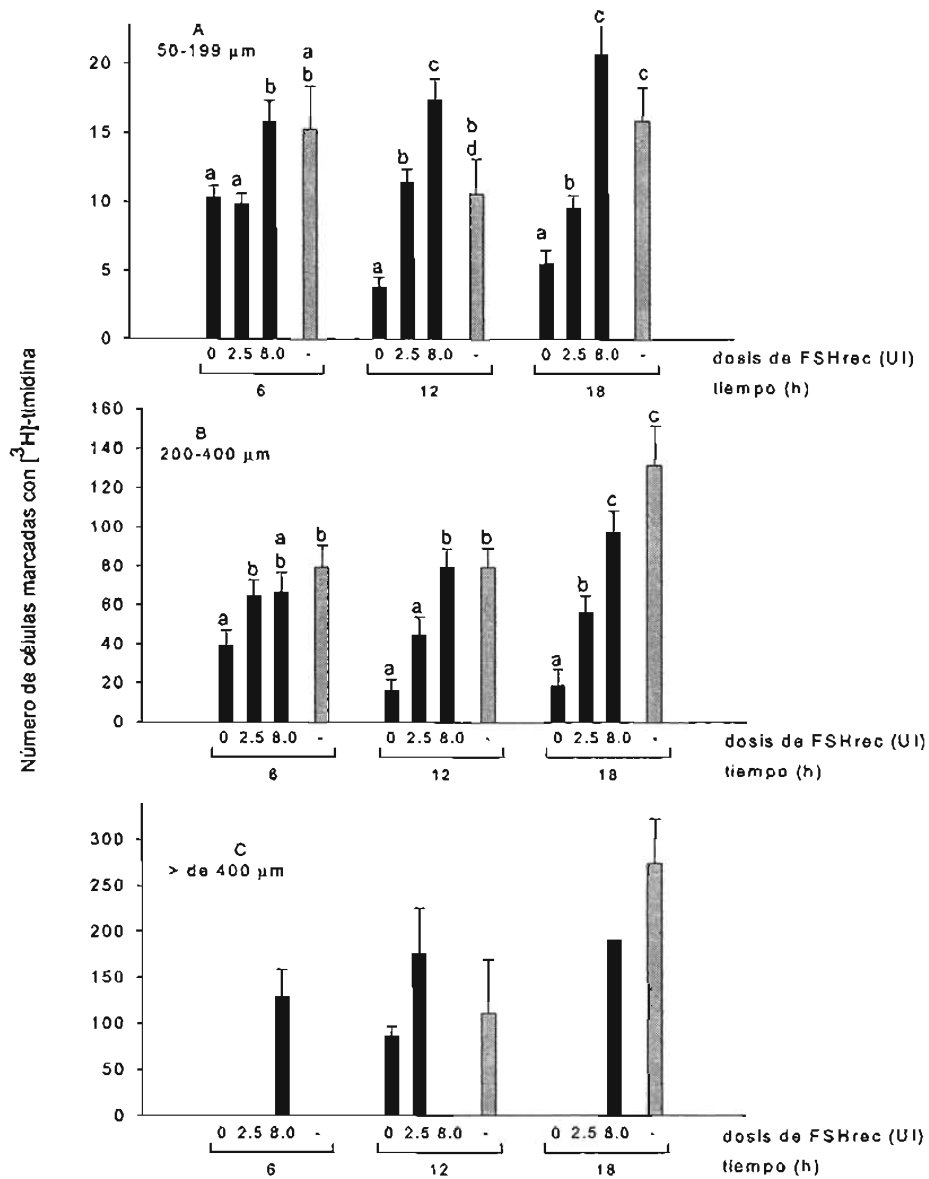


Figura 4. Número de células marcadas con $[^3\text{H}]$ -timidina de folículos de diferentes tamaños de ratas inmaduras hipofisectomizadas y tratadas con 2.5 y 8.0 UI de FSHrec o con solución salina (0) y sacrificadas a diferentes tiempos de exposición. A) Folículos de menores de 199 μm ; B) Folículos con un diámetro de 200 a 400 μm ; C) Folículos mayores a 400 μm . En cada grupo de 4 barras, la barra derecha representa la hipofisectomía negativa (-) a la cual se le realizó el trauma operatorio sin la extracción de la hipófisis. Las letras diferentes encima de cada barra indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) en cada panel. Los valores representados son la media \pm EE.

El efecto de la FSHrec en el número de células que incorporaron $[^3\text{H}]$ -timidina en folículos cuyo diámetro mayor fue entre 200 y 400 μm se encuentra en la figura 4B. A las 6 horas de estimulación se observó que los folículos

expuestos al vehículo o control salino (0 UI) presentaron un menor número de células marcadas, con respecto a las dosis 2.5 UI, 8.0 UI y la hipofisectomía negativa (-) (39.18 ± 8.0 , 64.32 ± 8.56 , 66.86 ± 9.97 y 79.44 ± 11.32 células marcadas, para cada grupo respectivamente). A las doce horas de estimulación, no hubo diferencias significativas entre 0 UI y 2.5 UI (16.33 ± 5.55 y 44.7 ± 9.19 células marcadas respectivamente) ni entre 8 UI y el hipox (-) (79.50 ± 9.64 y 79.56 ± 9.64 células marcadas respectivamente). Las dosis de 0 UI y 2.5 UI fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto a 8.0 UI y al hipox (-). A las 18 horas de exposición hubo un incremento significativo ($p < 0.05$), dosis dependiente (19.06 ± 8.20 , 56.57 ± 8.54 y 97.27 ± 11.31 células marcadas para cada una de las dosis). El hipox (-) (131.3 ± 20.39 células marcadas) no tuvo diferencias significativas con respecto a 8.0 UI pero sí con las otras dos dosis (0 UI y 2.5 UI).

El efecto de la FSHrec en el número de células que incorporaron [^3H]-timidina en folículos cuyo diámetro mayor fue mayor de 400 μm se encuentra en la figura 4C. Debido a que se localizaron muy pocos folículos con un diámetro mayor a 400 μm no se realizaron pruebas estadísticas. Para realizar el estudio del efecto de las diferentes isoformas en la proliferación celular se consideró una dosis análoga a 8 UI de FSHrec.

Efecto de las diferentes variantes de carga de FSH

El análisis del efecto de las isoformas de FSH en la proliferación celular de la granulosa en ratas inmaduras hipofisectomizadas se realizó según lo descrito en el Método. Para lo cual se emplearon las isoformas 4 a 8 con un pH de elución de 5.3 a < 3.75 a una dosis análoga a 8 UI de FSHrec. Las isoformas 1 a 3 no fueron incluidas en el estudio debido a la cantidad insuficiente de material, del mismo modo la isoforma 7 no fue incluida en el primer experimento (6 horas de estimulación) por las mismas razones. El efecto del tratamiento con las isoformas en el número de células que incorporaron timidina tritiada se muestra en las figura 5.

Los folículos pequeños antrales sanos no presentan diferencias significativas a las 6 horas de exposición (figura 5A). A las 12 horas de exposición se observó que la isoforma más ácida (8) presentó un número significativamente menor de células marcadas en comparación con sus contrapartes menos ácidas (11.33 ± 1.63 ; 43.79 ± 13.61 respectivamente), y a las 18 horas se observó un aumento en el número de células marcadas de la isoforma más ácida (8) siendo una diferencia no significativa con respecto a la isoforma menos ácida (4) (20.58 ± 2.69 ; 20.08 ± 2.96 células marcadas/folículo sano respectivamente). Sin embargo, al analizar los folículos preantrales sanos pequeños (figura 5B) se observó una marcada diferencia significativa desde las primeras 6 horas de exposición, con respecto a las isoformas menos ácidas (isoforma 4: 22.62 ± 6.12 ; e isoforma 5: 16.19 ± 1.29 células marcadas/folículo sano) las cuales presentaron un mayor número de células marcadas a diferencia de sus contrapartes más ácidas (isoforma 6: 9.03 ± 0.76 ; e isoforma 8: 11.97 ± 0.72 células marcadas/folículo sano). A las 18 horas de exposición se observó un incremento en el número de células marcadas de los animales expuestos a la isoforma más ácida (isoforma 8: 19.98 ± 2.82 células marcadas/folículo sano) siendo no significativo con respecto a su contraparte menos ácida (isoforma 4: 22.39 ± 4.72 células marcadas/folículo sano).

Por otra parte, los folículos de 200 a 400 μm antrales sanos no presentaron diferencias significativas a las 6 horas de exposición (figura 5C) en ninguno de los grupos estudiados. A las 12 horas de exposición se observó que la isoforma más ácida (8) tuvo un menor número de células marcadas en comparación con sus contrapartes menos ácidas pero este resultado no fue significativo (125.82 ± 34.72 ; 177.88 ± 33.02 respectivamente), y a las 18 horas se observó que la isoforma 7 fue la que presentó un menor número de células marcadas, significativamente menor a las isoformas 4, 5 y 6 pero no significativo con respecto a la isoforma más ácida (8) (isoforma 4: 192.9 ± 28.04 ; isoforma 5: 171.2 ± 27.95 ; isoforma 6: 161.15 ± 19.91 ; isoforma 7: 97.43 ± 17.33 ; isoforma 8: 125.13 ± 15.27 células marcadas/folículo sano).

La figura 5D representa a los folículos de un tamaño de 200 a 400 μm preantrales sanos, se puede observar que a las 6 horas de exposición, los folículos expuestos a la isoforma 8 (más ácida) presentaron un número significativamente menor de células marcadas al comparar con los folículos expuestos a las isoformas 4 y 5 pero no a la 6 (isoforma 8: 10.33 ± 1.86 ; isoforma 4: 96 ± 0 ; isoforma 5: 74 ± 8 ; isoforma 6: 39.2 ± 10.55 células marcadas/folículo sano). La isoforma 8 presentó el menor número de células marcadas incluso al comparar con los controles (isoforma 8: 10.33 ± 1.86 ; F: 64.38 ± 14.40 ; Sa: 42.8 ± 6.75 ; H-: 75.5 ± 20.5 células marcadas/folículo sano). Sin embargo, esta diferencia no se observó a las 12 horas de exposición. A las 18 horas de exposición la isoforma 7 fue la que presentó un número significativamente menor de células marcadas con respecto a las isoformas 4, 5 y 8 pero no a la isoforma 6 (isoforma 4: 160.5 ± 32.5 ; isoforma 5: 112.2 ± 14.38 ; isoforma 6: 87.63 ± 14.26 ; isoforma 7: 48.57 ± 10.97 ; isoforma 8: 122.33 ± 21.4 células marcadas/folículo sano).

En la figura 6 se pueden observar microfotografías representativas de los folículos expuestos a las diferentes isoformas (isoformas 4, 5 y 8); donde se puede observar que los folículos que fueron expuestos a las isoformas 4 y 5 (A y C) presentaron un mayor número de células marcadas que aquellos que fueron expuestos a la isoforma 8 (D), y por otro lado, un folículo atrésico después del tratamiento con solución salina que no presenta células marcadas (B).

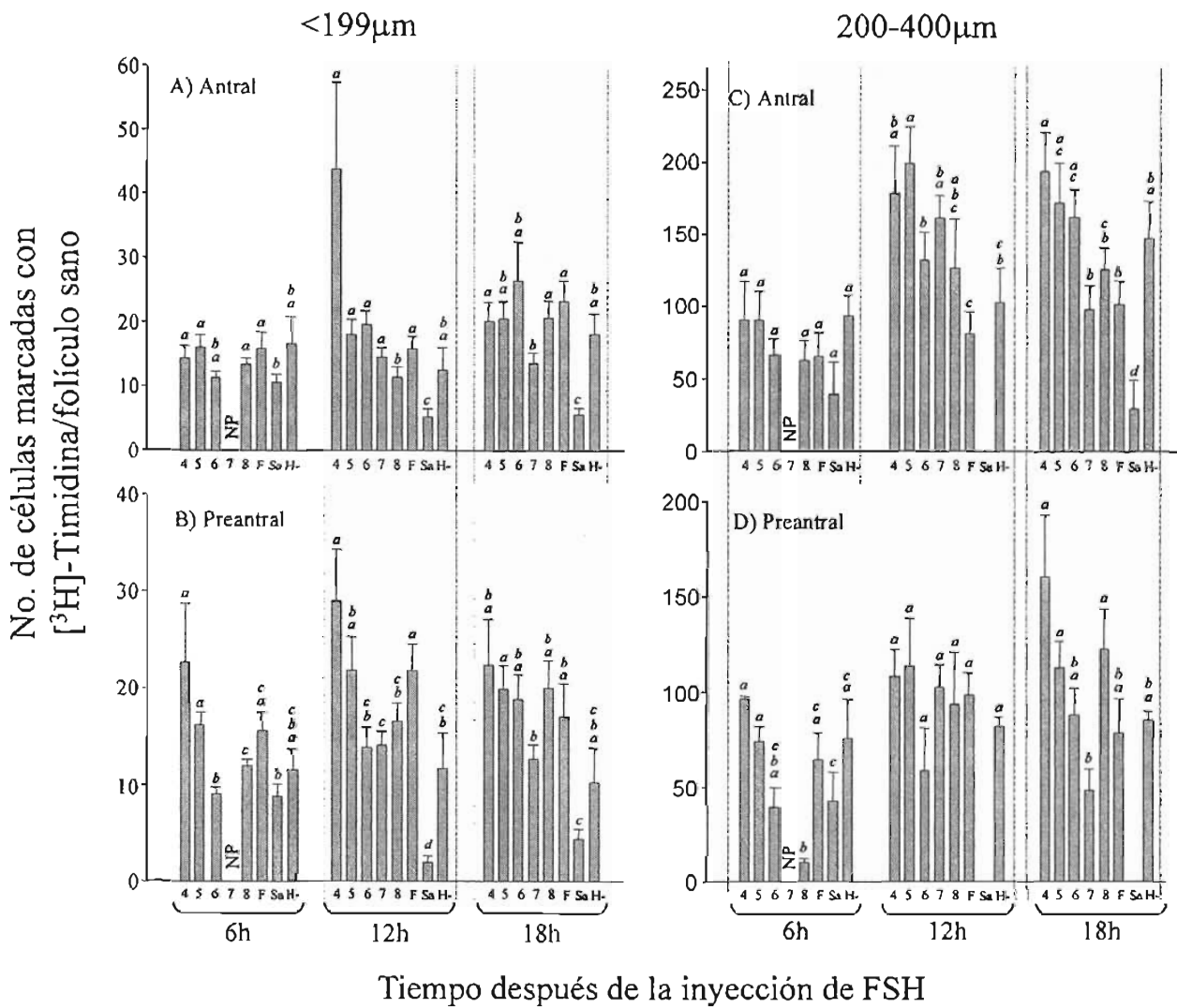


Figura 5. Efecto de la administración de las isoformas 4 a 8 de FSH, FSHrec (F) y del vehículo salino (Sa) en la proliferación de la granulosa en folículos preantrales y antrales con un diámetro mayor de 50-199 μm (A y B) y de 200 a 400 μm (C y D). Las barras representan la media \pm EE de 8 ovarios por grupo experimental. Las letras diferentes encima de cada barra indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en un mismo periodo de tiempo. Se incluyeron los animales a los cuales se les realizó la hipofisectomía negativa (H-). NP= No procesado.

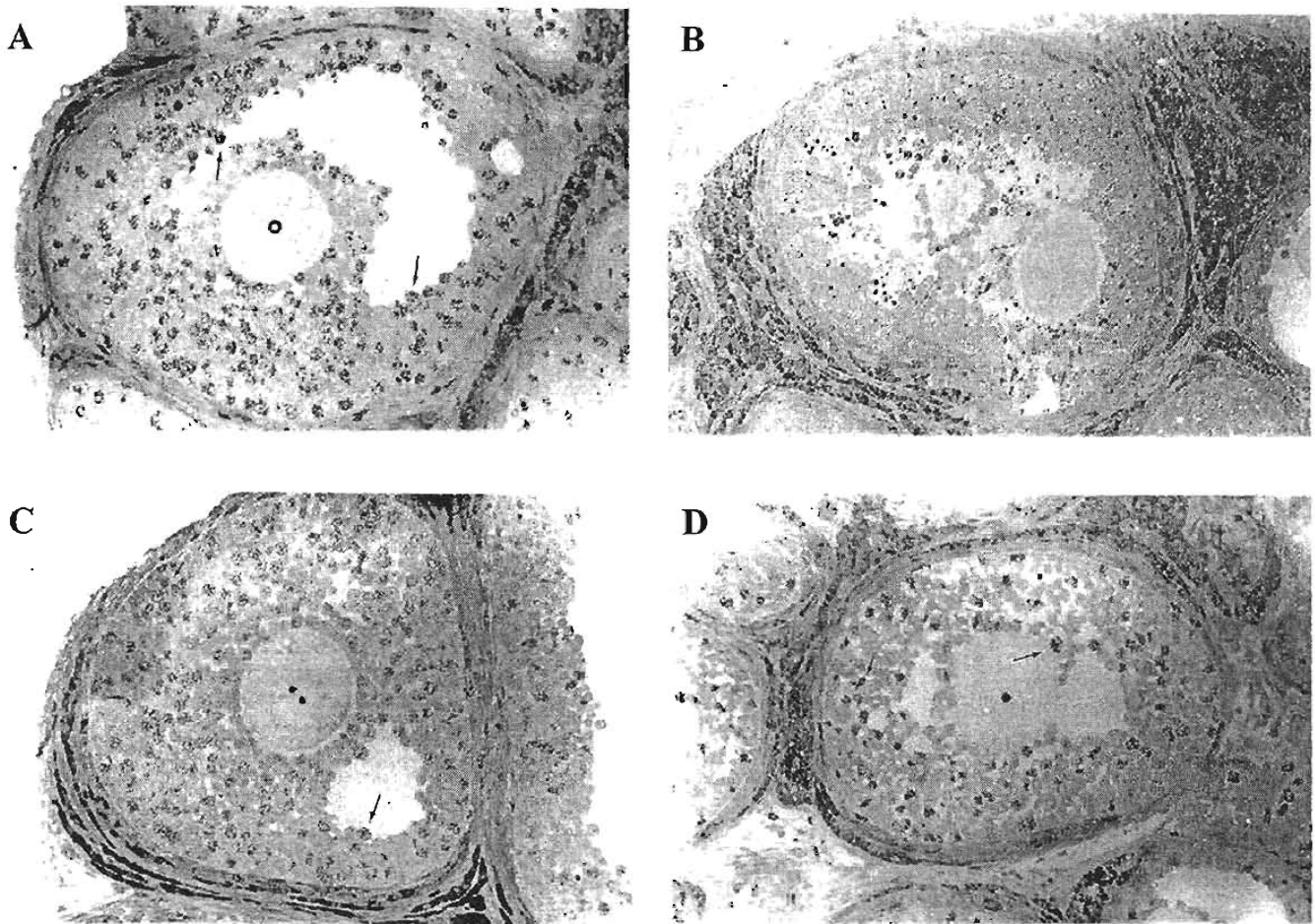


Figura 6. Microfotografías representativas de folículos antrales de ovarios de ratas inmaduras hipofisectomizadas y sacrificadas 18 horas (A y B) o 12 horas (C y D) después de la administración de FSH o solución salina. A: Folículo sano después del tratamiento con la isoforma 5; B: Folículo atrésico después del tratamiento con solución salina; C: Folículo sano después del tratamiento con la isoforma 4 y, D: después del tratamiento con la isoforma 8. Las flechas indican algunas de las células marcadas.

E) Maduración folicular *in vitro*

Para estudiar los efectos en la maduración folicular *in vitro*, se empleó el cultivo de folículos de ratón por 4 días con medio suplementado con suero de ratones hipogonadotrópicos y con las diferentes dosis de las isoformas de FSH. Para comprobar el estado gonadotrópico de los ratones, de los cuales se obtuvo el suero, se realizó un Northern blot y por otra parte, se procedió a comprobar que el suero empleado estuviera libre de gonadotropinas. En la figura 7 se puede observar la fotografía de un gel representativo de una electroforesis para poder determinar el estado gonadotrópico de los animales empleados. La letra "a" representa el estándar empleado, la letra "b" representa a un control negativo. La presencia de dos bandas en un mismo carril representa un animal heterocigótico (figura 7d). La presencia de una sola banda representa un animal homocigótico, cuando la banda se encuentra en la parte superior del gel, el animal fue normal (figura 7c), y cuando la banda se encontró en la parte inferior el animal fue homocigótico

hipogonadotrópico (figura 7e). Los animales que fueran homocigóticos hipogonadotrópicos fueron empleados para la obtención del suero, el estado gonadotrópico se comprobó visualmente a su vez, en el momento de la autopsia, debido a la presencia de un útero delgado, así como de ovarios o testículos muy pequeños. Los animales heterocigóticos fueron empleados para la obtención de nuevas crías y los animales homocigóticos normales fueron empleados para la estandarización y para la práctica en el manejo y cultivo de folículos.

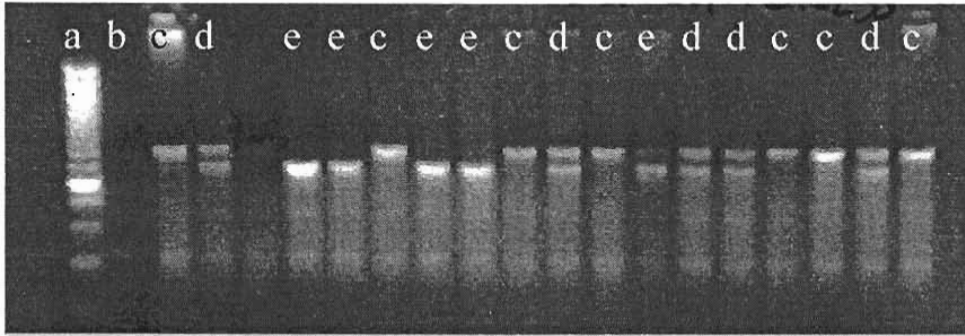


Figura 7. Patrón de electroforesis del ADN para comprobar estado gonadotrópico de los animales. a=estándar, b=control negativo, c=homocigótico normal, d=heterocigótico, e=homocigótico hipogonadotrópico.

Cultivo de folículos

El sistema empleado para el cultivo de folículos fue descrito previamente en el método (Vill y cols., 1998). Para obtener una caracterización de los efectos individuales de las isoformas naturales intrahipofisarias, se empleó un diseño simple. En cada experimento se aplicó una dosis constante (0-1000 ng/ml) de cada isoforma durante todo el cultivo (4d). La formación del antro fue observada y fotografiada con un microscopio invertido a un aumento de 100x. El porcentaje de folículos con cavidad antral fue calculado.

Se probaron varias dosis a fin de obtener la dosis umbral antral. La dosis umbral antral es aquella dosis en la cual se identifica la presencia de la cavidad antral. Para facilitar el análisis y la interpretación de los datos se tomaron en cuenta solo tres isoformas, Isoforma 1 (la menos ácida, pH: 7.10-5.99), Isoforma 4 (la medio-ácida, pH: 5.62-4.95) e Isoforma 8 (la más ácida, pH: <3.75).

En un experimento preliminar los folículos fueron cultivados con diferentes dosis del estándar no fraccionado (FSH Sigma) a diferentes dosis: 0, 5, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 mUI/ml. Cabe señalar que 1 mUI del estándar no fraccionado (FSH Sigma) equivale a 13.01 ng del estándar LER-907.

En los folículos más pequeños (tamaño inicial: $148 \pm 0.97 \mu\text{m}$) mostraron un incremento dosis dependiente en su crecimiento, pero sólo a partir de la dosis de 400 mUI/ml se encontraron folículos con una cavidad antral en formación (tamaño final: $323.33 \pm 16.67 \mu\text{m}$) (Figura 8A). Por el contrario los folículos con un tamaño inicial mayor ($180.42 \pm 0.42 \mu\text{m}$) crecieron rápidamente desde los primeros tres días del cultivo, adquiriendo alrededor del 90% de su máximo tamaño durante este período de tiempo y creciendo más lentamente al final del cultivo, inclusive los folículos que fueron expuestos a dosis más bajas de 100 mUI/ml (tamaño final: $395.00 \pm 9.57 \mu\text{m}$). Ningún folículo

cultivado en ausencia de FSH desarrolló cavidad antral y su crecimiento fue menor, independientemente del tamaño inicial seleccionado, sugiriendo la fuerte dependencia a la adición de FSH (Figura 8B).

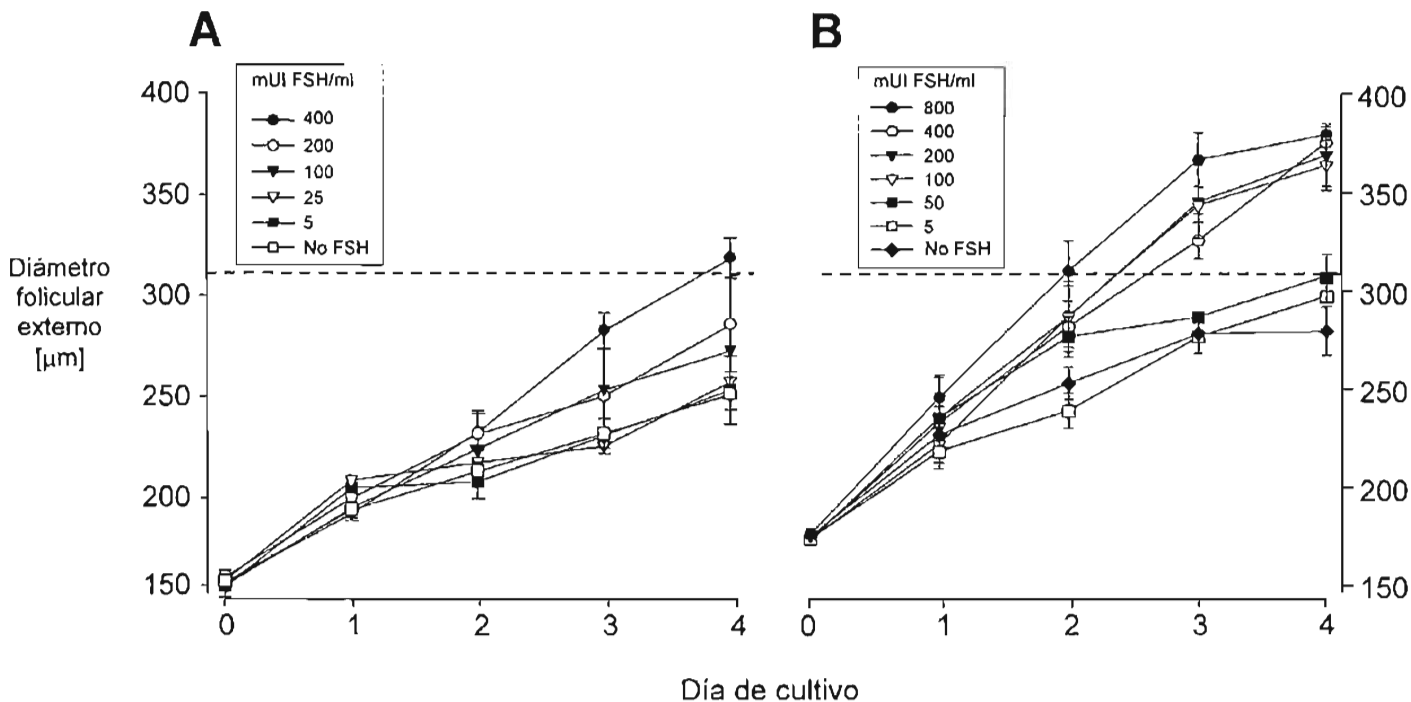


Figura 8. Patrón de crecimiento de folículos de tamaño inicial pequeño (A) y mediano (B) cultivados con diferentes concentraciones de FSH no fraccionada ($n \geq 5$ folículos en cada grupo experimental). Los datos están representados como la media \pm EE. Solamente las dosis mayores a 100 mUI/ml indujeron un tamaño folicular significativamente mayor que la de los folículos que se cultivaron sin la presencia de FSH, con 5 mUI/ml y con 50 mUI/ml desde el día 3 de cultivo ($p < 0.05$). La línea puntuada representa el tamaño umbral para la formación del antro.

Influencia de las isoformas de FSH en el crecimiento folicular (diámetro folicular externo)

Los folículos expuestos a la isoforma menos ácida (isoforma 1) a una concentración de 400 ng/ml tuvieron un tamaño final mayor ($322.86 \pm 5.97 \mu\text{m}$) que aquellos para las isoformas medio y más ácidas (isoformas 4 y 8) (295 ± 5.81 y $258.18 \pm 14.99 \mu\text{m}$ respectivamente) (figura 9A), y fueron los únicos (junto con la FSH no fraccionada) en alcanzar el tamaño umbral para la formación del antro. Esta diferencia está relacionada con un incremento en el crecimiento en el día 2, estadísticamente significativo ($p < 0.05$) observado en los folículos expuestos a la isoforma menos ácida (isoforma 1) ($52.73 \pm 9.78 \mu\text{m}/\text{día}$) a diferencia de la isoforma medio ácida (isoforma 4: $24.17 \pm 6.93 \mu\text{m}/\text{día}$) y la isoforma más ácida (isoforma 8: 20.91 ± 7.58) (figura 9C).

Por otra parte, los folículos expuestos a la isoforma más ácida (isoforma 8) a una concentración de 800 ng/ml tuvieron un tamaño final significativamente menor (292.83 ± 10.53) que aquellos para las isoformas menos y medio-ácidas ($< 340 \mu\text{m}$) (figura 9B) y debido a que no alcanzaron el tamaño umbral para la formación del antro establecido para las demás isoformas, se estableció un tamaño umbral para la formación del antro de $345 \mu\text{m}$, tamaño

en el cual sólo un folículo formó cavidad antral. Esta diferencia estadísticamente significativa está relacionada con un incremento en el crecimiento en el día 3 observado en los folículos expuestos a las isoformas menos y medio-ácidas (isoforma 1 y 4) (56.52 ± 9.82 y 64.8 ± 16.46 $\mu\text{m}/\text{día}$ respectivamente) a diferencia de la isoforma más ácida (isoforma 8: 24.58 ± 4.41 $\mu\text{m}/\text{día}$) (figura 9D). No se encontraron diferencias significativas entre la isoforma menos y medio-ácidas (isoforma 1 y 4).

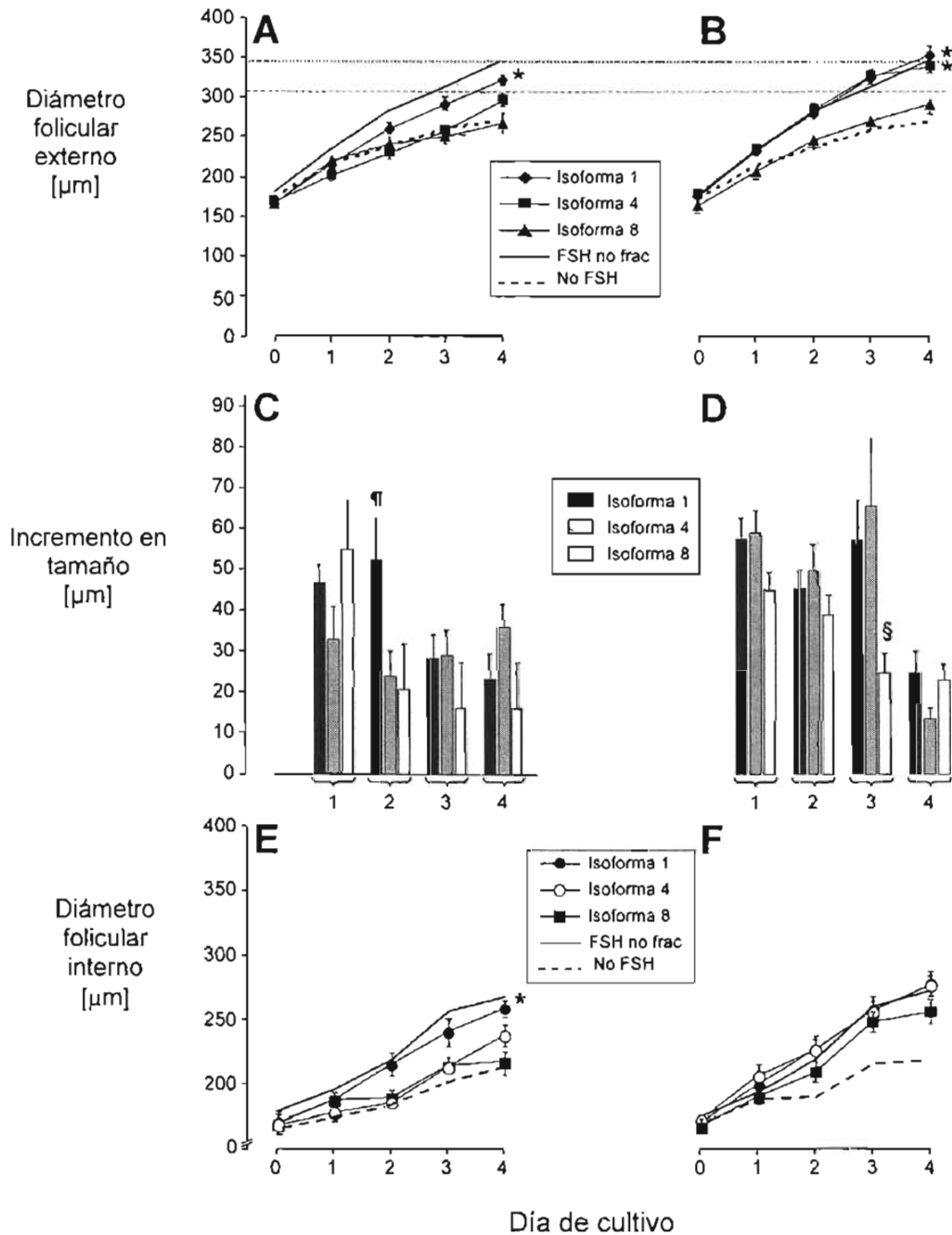


Figura 9. Diámetro folicular externo, incremento en tamaño y diámetro folicular interno de folículos (todos los tamaños incluidos) cultivados en presencia de diferentes isoformas de FSH intrahipofisaria. A, C y E: patrón de crecimiento en presencia de 400 ng/ml; B, D y F: folículos expuestos a 800 ng/ml. Los datos están representados como media \pm EE. El patrón de crecimiento de los folículos cultivados en ausencia o presencia de FSH no

*fraccionada (FSH no frac.) (Sigma-Aldrich, 100 mUI/ml o 1.3 µg/ml) también se muestra como líneas de referencia. La línea horizontal discontinua indica el tamaño umbral (310 µm) necesario para la formación del antro para las isoformas 1, 4 y FSH no frac; la línea adicional puntuada denota el tamaño umbral (345 µm) para la formación del antro en presencia de la isoforma 8. El número de folículos expuestos a 400 ng/ml fue de 8-11 para las isoformas 1 y 4, 20 para la FSH no frac y 55 para los controles (no FSH). Para los folículos tratados con 800 ng/ml el número de folículos tratados fueron: 20-22 para las isoformas 1 y 4. Los folículos cultivados en presencia de 400 ng/ml de la isoforma 1, 800 ng/ml de las isoformas 1, 4 y FSH no frac fueron mayores significativamente a los expuestos a la isoforma 8; esta diferencia resultó de un incremento en el diámetro en los días 2 (C) y 3 (D) de cultivo. * $p < 0.05$ vs isoforma 4 y 8 en el mismo día; § $p < 0.05$ vs isoforma 1 y 4 en el mismo día. Resultados similares se obtuvieron cuando el diámetro folicular interno fue considerado (E y F).*

Dosis umbral y proporción de folículos antrales para cada isoforma

La formación del antro pudo ser observada solamente en la mayoría de folículos que presentaron un tamaño mayor a 300-310 µm (diámetro folicular externo). Como se muestra en la Tabla 4, la dosis de FSH requerida para inducir un incremento en la media del diámetro folicular mayor de 300 µm (dosis umbral antral) difiere de acuerdo a la isoforma de FSH y al tamaño inicial con el que se comenzó el cultivo.

A una dosis mínima de 400 ng/ml, tanto los folículos pequeños (<180 µm) como los medianos (>180 µm) expuestos a la isoforma menos ácida (isoforma 1) fueron los únicos en alcanzar un tamaño final superior a 300-310 µm (figura 10A y D). El tamaño umbral para la formación de la cavidad antral fue sobrepasado solo en los cultivos que fueron realizados con dosis a partir de 400 ng/ml (312.5 ± 4.79 µm), dosis umbral antral para la isoforma menos ácida (isoforma 1). Los folículos cultivados con dosis menores (100 ng/ml) alcanzaron tamaños finales significativamente menores (230 ± 0.0 µm).

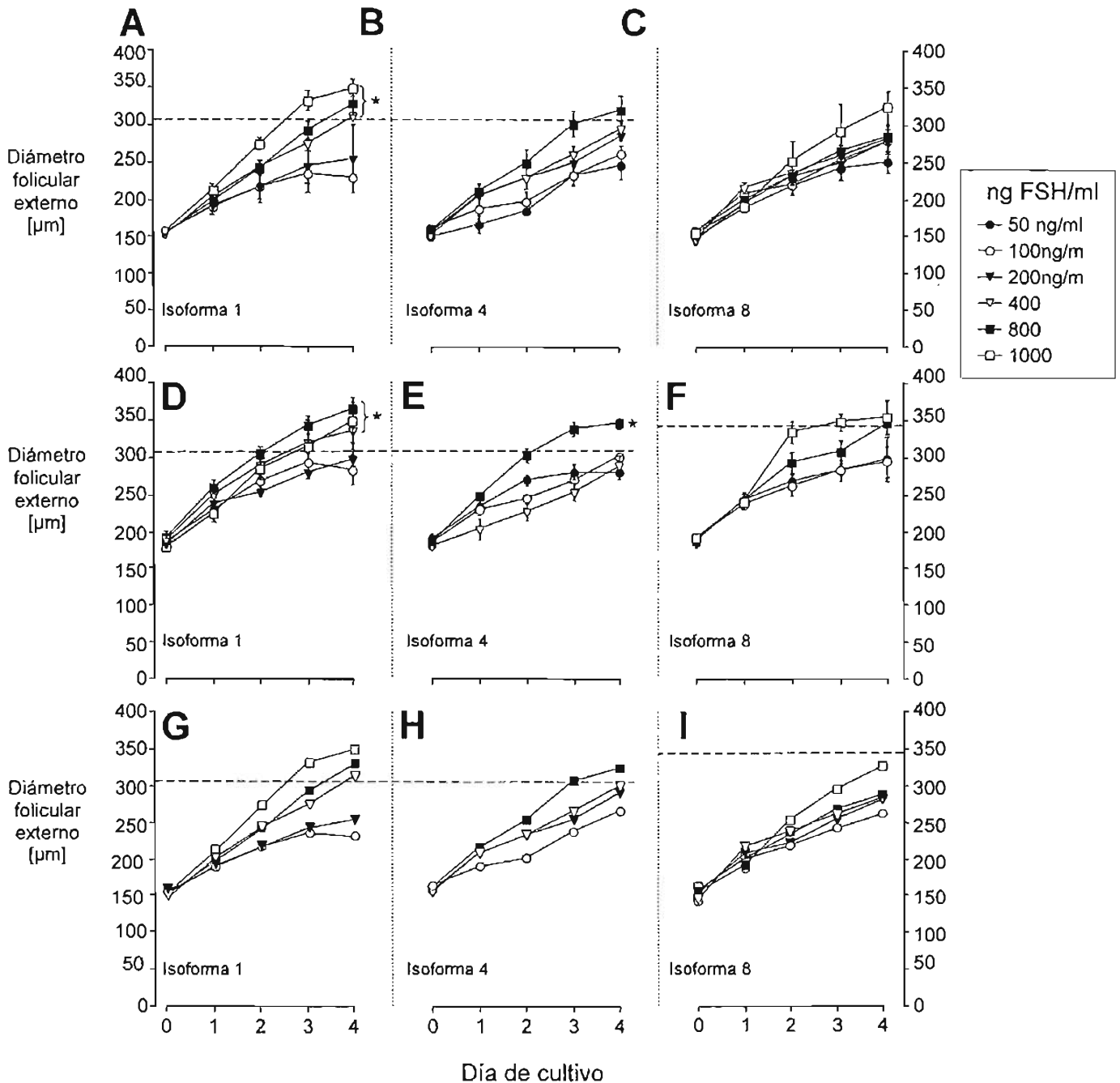


Figura 10. Patrón de crecimiento de folículos pequeños (<180 μm) (A, B y C) y de folículos medianos (>180 μm) (D, E y F) cultivados con diferentes concentraciones de las isoformas de FSH intrahipofisaria (n≥4 folículos en cada grupo experimental). Los datos están representados como la media ± EE. Las líneas horizontales representan el tamaño umbral de 310 μm para la formación del antro en respuesta a las isoformas 1 y 4, y 345 μm para los folículos medianos expuestos a la isoforma 8. La media del crecimiento de los folículos pequeños más los medianos en presencia de diferentes concentraciones de isoformas de FSH se muestra en G, H e I. * p<0.05.

Los folículos (pequeños y medianos) expuestos a la isoforma medio-ácida (isoforma 4) a una dosis de 800 ng/ml, alcanzaron un tamaño final superior a 300-310 μm (figura 10B y E). El tamaño umbral para la formación de la

cavidad antral fue sobrepasado solo en los cultivos que fueron realizados con dosis a partir de 800 ng/ml ($321.43 \pm 18.7 \mu\text{m}$), dosis umbral antral para la isoforma medio-ácida (isoforma 4). Los folículos cultivados con dosis menores (100 ng/ml) alcanzaron tamaños finales significativamente menores ($262 \pm 10.68 \mu\text{m}$).

Finalmente, los folículos (pequeños y medianos) expuestos a la isoforma más ácida (isoforma 8) a una dosis de 1000 ng/ml, alcanzaron un tamaño final superior a 300-310 μm (figura 10C y F), sin embargo, no formaron cavidad antral. El tamaño umbral para la formación de la cavidad antral, definido para las isoformas 1 y 4, fue sobrepasado en los folículos que fueron expuestos a dosis mayores de 1000 ng/ml ($326,67 \pm 21.78 \mu\text{m}$), pero a pesar de haber sobrepasado este tamaño, no formaron cavidad antral, por lo que fue necesario definir un tamaño umbral para la formación del antro para la isoforma 8 (345 μm). Los folículos cultivados con dosis menores (100 ng/ml) alcanzaron tamaños finales significativamente menores ($280 \pm 12.65 \mu\text{m}$), sin embargo, no hubieron diferencias significativas entre sus dosis.

En resumen, ver tabla 4, a una dosis de 400 ng/ml, las isoformas menos ácidas (isoforma 1) de FSH intrahipofisaria indujeron un crecimiento rápido y continuo de los folículos antrales, sin importar el tamaño inicial con el que comenzaron los folículos. La fracción medio-ácida (isoforma 4) indujo la formación del antro a dosis de 800 ng/ml y sólo en los folículos que tuvieran un tamaño inicial mayor a 160 μm . La fracción más ácida difirió de las otras dos, ya que la dosis umbral antral fue de 1000 ng/ml para los folículos que tuvieran un tamaño inicial menor a 180 μm , mientras que para los folículos con un tamaño inicial mayor a 180 μm , la dosis umbral antral fue de 800 ng/ml. Para la FSH no fraccionada, los folículos con un tamaño inicial menor a 180 μm , la dosis umbral antral fue de 400 mUI/ml (5.2 $\mu\text{g/ml}$), y para los folículos con un tamaño inicial mayor a 180 μm la dosis umbral antral se redujo a 100 mUI/ml (1.3 $\mu\text{g/ml}$). Además de las diferentes dosis umbrales antrales, la proporción de folículos que formaron cavidad antral fue diferente significativamente dependiendo de las isoformas. A una dosis de 800 ng/ml, la isoforma menos ácida (isoforma 1) indujo la formación del antro en más de un 85% en folículos que crecieron más de 300 μm . La isoforma medio-ácida (isoforma 4) indujo un 60% en folículos expuestos bajo la misma dosis, mientras que la isoforma más ácida (isoforma 8) indujo tan solo un 5% de cavidad antral en folículos mayores a 300 μm (Tabla 4).

Isoforma de FSH	Tamaño inicial				Formación de antro (%) 800 ng/ml
	140 μm	160 μm	180 μm	200 μm	
Isoforma 1	400	400	400	400	85%
Isoforma 4	n.d.	800	800	800	60%
Isoforma 8	n.d.	n.d.	800	800	5%
FSH no fraccionada	400	400	100	100	77% (con 100 mUI/ml)

Tabla 4. Dosis umbrales antrales de los folículos expuestos a las diferentes isoformas (ng/ml) y a FSH no fraccionada (mUI/ml). Dosis umbral antral: Dosis mínima en la cual el diámetro folicular externo sobrepasa el tamaño para la formación del antro (300 -310 μm para las isoformas 1 y 4; 345 μm para la isoforma 8). El

porcentaje de folículos cultivados en presencia de 800 ng/ml de FSH que presentaron antro también se muestra. n.d.=no determinado.

Secreción de Estradiol (E_2) inducido por las diferentes isoformas de FSH

La secreción de E_2 por cada folículo se realizó como se describió en el método. Los folículos expuestos a una dosis de 200 ng/ml de la isoforma menos ácida (isoforma 1), secretaron estradiol a partir del día 3 de cultivo, y del día 4, los folículos expuestos a la isoforma 4 (Figura 11A). Mientras que los folículos expuestos a una dosis de 400 ng/ml de la isoforma menos ácida secretaron estradiol a partir del día 2 de cultivo y a partir del día 4 los folículos expuestos a la isoforma 4 (Figura 11B). No fue sino hasta la dosis de 800 ng/ml cuando los folículos expuestos a la isoforma más ácida (isoforma 8) secretaron estradiol. En los folículos expuestos a una dosis de 800 ng/ml, la producción de E_2 secretada en el día 3 fue significativamente mayor en folículos cultivados con la isoforma menos ácida (isoforma 1: 906.22 pg/folículo) que aquellos expuestos a la isoforma medio-ácida (isoforma 4: 105.57 pg/folículo) o a la más ácida (isoforma 8: 14.85 pg/folículo) (figura 11C). La cantidad de E_2 secretado después de 3 días por los folículos expuestos a la FSH no fraccionada fue de 1393.77 pg/folículo (a una dosis de 5.2 μ g/ml) (no representada) y de 251.6 \pm 47.1 pg/ml representada como una barra en la figura 11. Los folículos cultivados en ausencia de FSH no secretaron cantidades detectables de E_2 . Durante las primeras 24 horas de cultivo, ningún tratamiento produjo cantidades detectables de E_2 . A partir del segundo día hasta el final del cultivo, la secreción de E_2 aumento dependiendo de la isoforma y de la dosis.

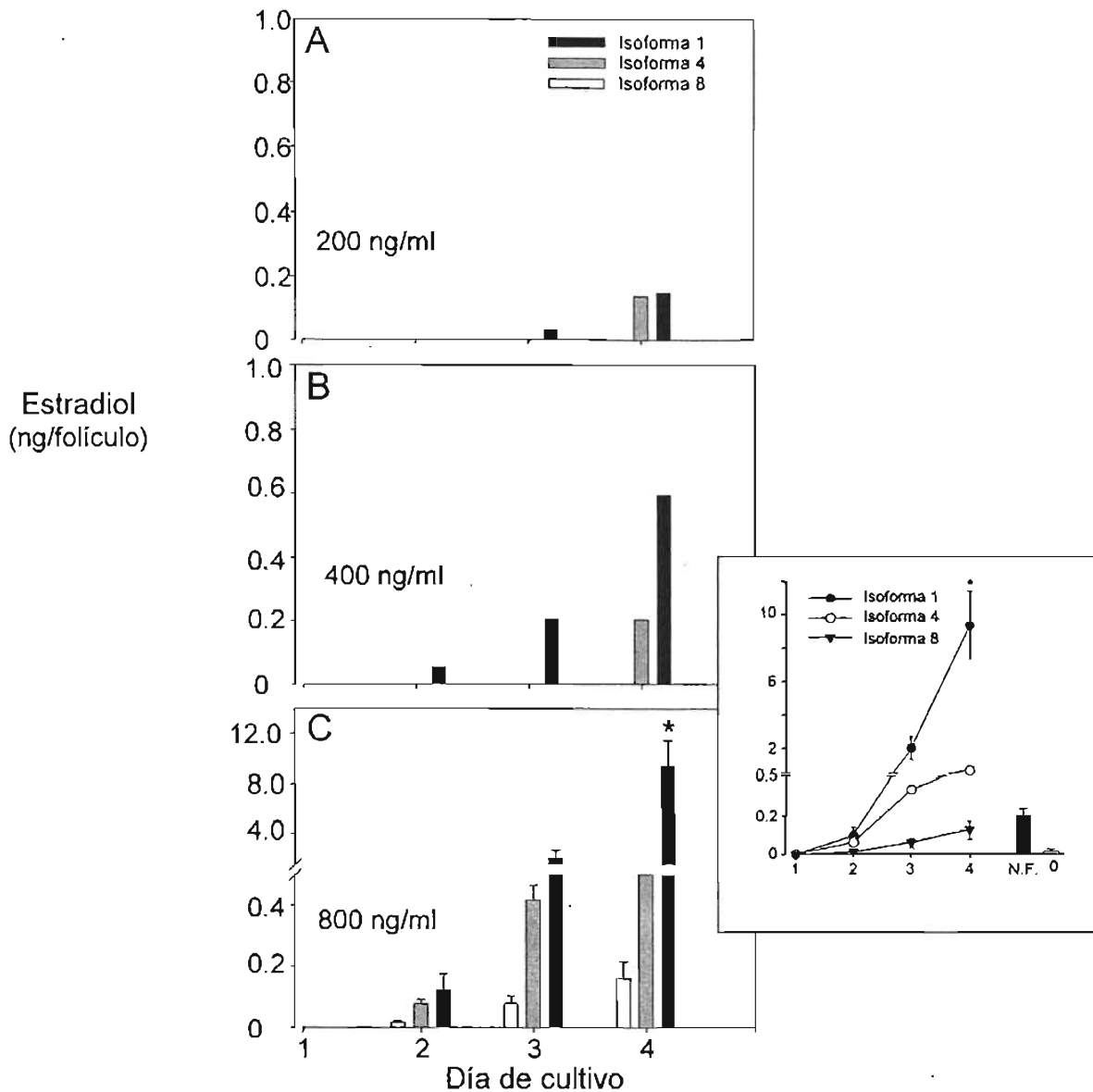


Figura 11. Secreción de estradiol (E_2) después de 4 días de cultivo a una dosis de 200 ng/ml (A), 400 ng/ml (B) y 800 ng/ml (C) de las diferentes isoformas de FSH, FSH no fraccionada (N.F.) (1.3 µg/ml) o en ausencia de FSH (0) (recuadro), * $p < 0.05$ vs isoforma 4, 8 y 0 ng/ml. Los valores representados son la media \pm EE.

Detección inmunohistoquímica de cx-43

En esta tesis, se describe por primera vez una diferente inmunolocalización de conexina 43 entre los diferentes compartimentos de la granulosa, dependiendo de la isoforma a la cual fue expuesto el folículo durante el cultivo. Como se puede apreciar en la figura 12, los folículos expuestos a 800 ng/ml de la isoforma menos ácida (isoforma 1, figura 12A) presentan un patrón de localización de la conexina 43 a lo largo de la capa externa de la granulosa o granulosa mural, a diferencia de la isoforma 4 y 8, las cuales presentan una localización cerca o alrededor del ovocito. (figura 12B y C). Los folículos expuestos a la FSH no fraccionada presentaron una localización a lo largo de la granulosa mural. Por otra parte, los folículos expuestos a la isoforma 8 (más ácida) presentaron una menor inmunotinción en comparación con sus contrapartes menos ácidas. Los folículos que fueron cultivados en ausencia de

FSH no presentaron inmunotinción a cx-43. Todos los folículos presentaron inmunotinción para cx-43 exclusivamente en las células de la granulosa y en ningún caso se presentó inmunotinción en la teca o en el ovocito.

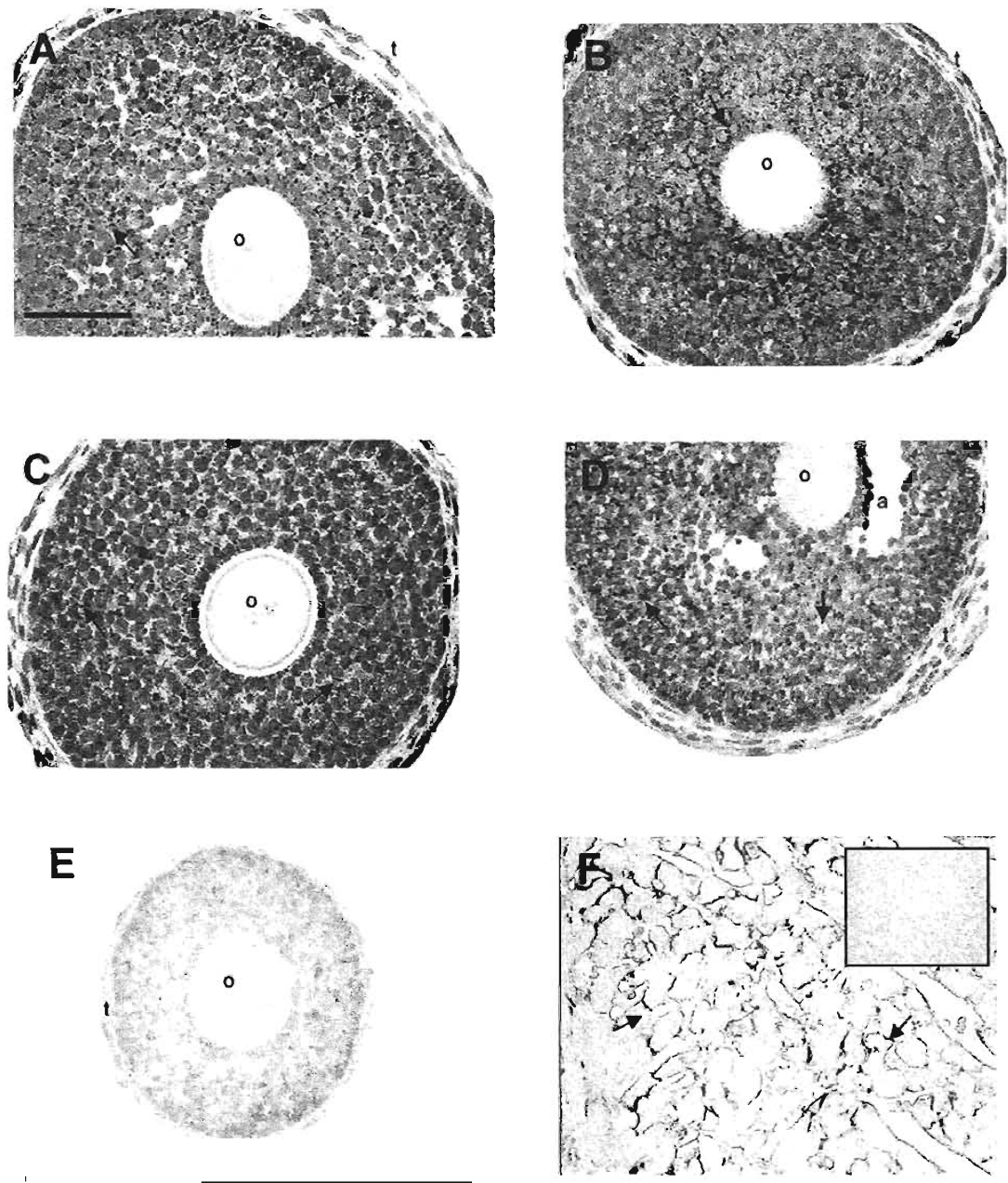


Figura 12. Inmunolocalización de conexina 43 (cx-43) en folículos ováricos de ratones cultivados por 4 días con una dosis de 800 ng/ml de las diferentes isoformas de FSH. A) Isoforma 1 (menos ácida); B) Isoforma 4 (medio ácida); C) Isoforma 8 (más ácida); D) FSH no fraccionada. La inmunolocalización (flechas) de la cx-43 dentro del folículo se encontró exclusivamente en las células de la granulosa. No se detectó cx-43 en los folículos que fueron cultivados sin FSH (E). Inmunotinción positiva se detectó en tejido de corazón (F). No hubo tinción después de haber

retirado el primer anticuerpo (recuadro en F). La barra equivale a 50 μm . o=ovocito, t=células de la teca, a=cavidad antral.

La figura 13 muestra el porcentaje del área total que se encontró inmunoteñido (cx-43) de los folículos expuestos a las diferentes isoformas. Los folículos expuestos a la isoforma 1 presentaron un porcentaje del área total significativamente menor en el área del cumulus en comparación con la región mural (0.8 ± 0.11 ; 3.87 ± 0.37 , respectivamente), y fue a su vez significativamente menor al área del cumulus de los folículos expuestos a la isoforma 4 (3.94 ± 0.92) y a la isoforma 8 (1.74 ± 0.14). A su vez, los folículos expuestos a la isoforma 1 presentaron un porcentaje del área total significativamente mayor en la región mural (3.87 ± 0.37) en comparación con los folículos expuestos a las isoformas 4 (0.39 ± 0.13) y 8 (0.33 ± 0.08).

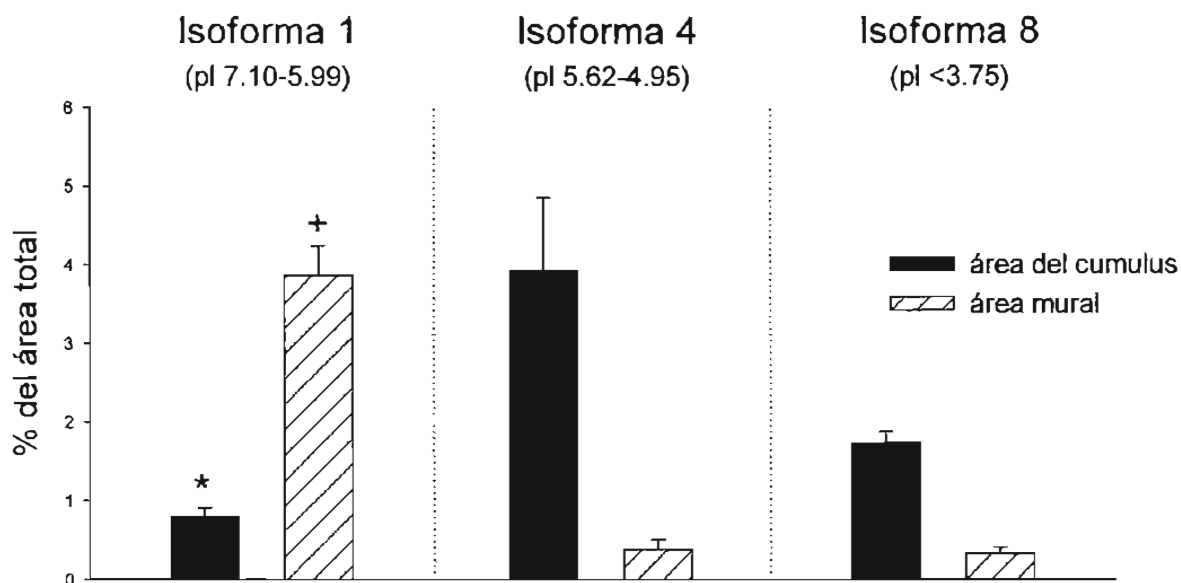


Figura 13. Porcentaje del área total inmunomarcada para cx-43 en dos diferentes regiones dentro del folículo: área cercana al ovocito (área del cumulus) y área cercana a la membrana basal (área mural) de folículos cultivados con 800 ng/ml de las diferentes isoformas de FSH. * $p < 0.05$ versus área del cumulus isoforma 4 y 8. + $p < 0.05$ versus área mural isoforma 4 y 8. Los valores representados son la media \pm EE.

DISCUSIÓN

El estudio del efecto de las diferentes isoformas moleculares de la FSH natural en la proliferación celular y en la maduración folicular permite esclarecer la importancia fisiológica del polimorfismo de las gonadotropinas. Los hallazgos de la presente tesis intentan darle un significado fisiológico a la existencia de estas isoformas moleculares de la FSH.

Se analizaron los efectos biológicos de estas variantes monitoreando diversas respuestas dependientes de FSH a nivel de la célula blanco y del folículo, constituido por tres tipos celulares diferentes y dependientes entre ellos. Las isoformas se obtuvieron mediante cromatografía preparativa y radioinmunoanálisis, técnicas actualmente utilizadas para separar e identificar el perfil de distribución de las hormonas glicoproteicas. Los resultados muestran que en condiciones *in vitro* e *in vivo* todas las isoformas intrahipofisarias de FSH fueron capaces de inducir una respuesta biológica diferencial, tales como: 1) las isoformas más ácidas/sializadas presentaron una relación B/I significativamente menor que el resto de las isoformas en el bioensayo de células de la granulosa; 2) las isoformas menos ácidas permanecieron menos tiempo en circulación, presentando una mayor tasa de depuración plasmática, menor tiempo de residencia media, menor vida media y menor porcentaje de recuperación a diferencia de sus contrapartes más ácidas; 3) las isoformas menos ácidas fueron más eficientes para mantener la proliferación de las células de la granulosa que las isoformas más ácidas en el sistema *in vivo*; 4) las isoformas menos ácidas indujeron un crecimiento preantral más rápido produciendo folículos antrales más grandes a dosis menores a diferencia de las isoformas más ácidas, en ambos sistemas; 5) las isoformas menos ácidas tienen un mayor impacto en la producción de estradiol y en la formación de la cavidad antral en el sistema *in vitro* y; 6) la inmunolocalización de la conexina 43 presentó una distribución cercana a la membrana basal en los folículos expuestos a la isoforma menos ácida y una distribución cercana al ovocito en los folículos expuestos a la isoforma más ácida en el sistema *in vitro*.

Las isoformas empleadas en este trabajo han sido utilizadas previamente para estudiar su actividad biológica *in vitro* (en el mismo bioensayo de células de granulosa) cuantificando la producción de algunos intermediarios en la comunicación intracelular, tales como AMPc, estrógenos, tPA (activador de plasminógeno tisular), y la expresión del ARNm de algunas enzimas como el citocromo P450 aromatasa, y de la subunidad- α de la inhibina (Timossi y cols., 2000; Barrios-De-Tomasí y cols., 2002). En estos estudios, los autores mencionan que la exposición de células de la granulosa a las diferentes isoformas estimulan una producción dosis dependiente de estrógenos y de AMPc *in vitro*. La producción de AMPc fue significativamente mayor cuando las células fueron incubadas con isoformas con mayor cantidad de AS (isoformas más ácidas). Mientras que las isoformas menos ácidas (con menor cantidad de AS) fueron más potentes estimulando la producción de estrógenos, datos que coinciden con los resultados obtenidos. Por otra parte, las isoformas menos ácidas exhibieron una mayor capacidad para inducir la expresión de ambos ARNm estudiados (aromatasa e inhibina) a diferencia de sus análogos más ácidos. Estudios realizados previamente (para revisión ver Ulloa-Aguirre y cols., 2003) y la presente tesis revelan que las isoformas más ácidas (isoforma 8) son menos potentes en promover la aromatización de andrógenos, la producción de AMPc y la enzima activadora de tPA, que sus contrapartes menos ácidas (isoforma 1). Resultados similares se obtuvieron con el ARNm del citocromo P450 aromatasa y tPA (Ulloa-Aguirre y cols., 2003). El mecanismo subordinado para esta variedad de respuestas de las isoformas de la FSH aún sigue siendo desconocido. Un candidato para este mecanismo podría ser la variabilidad en la afinidad al receptor por las diferentes isoformas, por ejemplo, la

actividad de unión al receptor de las isoformas de FSH de roedores, monos y humanos disminuye conforme el valor pI declina (Ulloa-Aguirre y cols., 1982, 1992), esto es, las isoformas con un pI mayor (menos ácidas) presentan una mayor unión al receptor. En estos estudios, se removieron enzimáticamente los residuos de ácido siálico de las isoformas más ácidas, dando como resultado la producción de análogos con pI mayores y con uniones al receptor similares a aquellas producidas por sus contrapartes naturales (Ulloa-Aguirre y cols., 1984, Ulloa-Aguirre y cols., 2003).

Los mecanismos bioquímicos de esta variedad de respuestas son aún desconocidos. A pesar de las diferencias en afinidad por el receptor de las diferentes isoformas, existe la posibilidad de que además de las diferencias en la unión al receptor, pudieran existir efectos particulares de estas isoformas en las señales de transducción y en la expresión génica. Las isoformas menos ácidas son activadores más potentes del receptor y son más eficientes para desencadenar señales intracelulares que las isoformas más ácidas (Ulloa-Aguirre y cols., 2003). Otra posibilidad que actualmente se está estudiando es la presencia de diferentes isoformas del receptor que pudieran a su vez estar involucradas en la respuesta celular.

Como consecuencia de las diferencias estructurales en la composición de carbohidratos, las isoformas de FSH difieren en su capacidad de sobrevivir en la circulación. La vida media plasmática es el tiempo en el cual la concentración de la hormona ha disminuido a la mitad de la concentración inicial en circulación. Como se espera, las isoformas más ácidas están relativamente mejor protegidas de la degradación hepática, por lo que exhiben una vida media plasmática mayor que sus análogos menos ácidos, hecho demostrado a su vez al tener un mayor tiempo de residencia media en circulación, una menor tasa de depuración plasmática y un mayor porcentaje de recuperación al finalizar el experimento, resultados que coinciden con otros previamente publicados (Wide 1986, Galway y cols., 1990, Ulloa-Aguirre y cols., 1992). Por el contrario, las isoformas menos ácidas mostraron una vida media menor, una mayor tasa de depuración, un mayor tiempo de residencia media en circulación y un menor porcentaje de recuperación al comparar con las isoformas más ácidas. Las isoformas menos ácidas al permanecer menos tiempo en circulación podrían proveer un estímulo corto pero intenso para la transmisión de una señal intracelular. En varios estudios se ha descrito la evidencia que los residuos de los oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas desempeñan un papel muy importante determinando la vida media plasmática y consecuentemente la bioactividad *in vivo* de la hormona secretada (Ulloa-Aguirre y cols., 1999 y 2003). Aproximadamente un 95% de la FSH humana es ácida debido a la carga negativa de los residuos de ácido siálico en la posición terminal, y por otra parte, el número de residuos de galactosa que se encuentran expuestos en la hormona tienen un papel importante en la sobrevivencia de la gonadotropina en la circulación (Ulloa-Aguirre y cols., 2003). La exposición de estos residuos de galactosa en los oligosacáridos de FSH incrementan dramáticamente la velocidad de depuración plasmática mediante un mecanismo que involucra a los receptores de los hepatocitos (Morell y cols., 1971, Ulloa-Aguirre y cols., 2003). Además, la presencia de oligosacáridos que presenten manosas o N-acetilglucosamina en su posición terminal, presentan una elevada depuración por el endotelio hepático y por las células de Kupffer (Fiete y cols., 1997). Como consecuencia, las glicofomas de la FSH que estén altamente sializadas circularán por más tiempo que las glicofomas menos ácidas/sializadas (Ulloa-Aguirre y cols., 1995, 2000 y 2003 Wide 1986). Inclusive, se encuentra documentado que el incremento en la liberación de las isoformas menos ácidas de FSH que ocurre en la fase preovulatoria del ciclo menstrual en el humano, se correlaciona con una reducción significativa en la vida media plasmática de la FSH secretada durante esta etapa del ciclo (Padmanabhan y cols., 1988, Wide y cols., 1993, Zambrano y cols., 1995, Ulloa-Aguirre y cols., 2003). Existe una posibilidad que el aumento en la capacidad de las isoformas menos ácidas de promover un

efecto biológico a nivel de la célula blanco pudiera estar compensado por la desventaja dada por una vida media más corta.

Sin embargo, otros factores, además de la depuración metabólica, pueden influir en la actividad biológica *in vivo* de la hormona. Por ejemplo, las isoformas más sializadas presentan una mayor actividad biológica y un mayor tiempo en circulación (Wide y Hobson, 1986; Mulders, y cols., 1997); sin embargo, cuando se induce un efecto agudo (tal como la inducción de la actividad de la enzima tPA y la expresión de su ARNm) se observa que las isoformas menos ácidas, con una menor vida media plasmática presentan un efecto similar a sus análogos más ácidos (Timossi y cols., 1998). Esto indica que la capacidad de las variantes menos ácidas en aumentar la inducción de un efecto biológico en un determinado blanco a nivel celular, puede estar compensado por la desventaja debida a su vida media relativamente corta. Otro ejemplo se da en esta tesis, donde se puede observar la proporción B/I *in vitro* de las isoformas empleadas (Tabla 2) y sus correspondientes curvas de depuración plasmática. La proporción B/I de las isoformas menos ácidas fue significativamente mayor que el de las isoformas más ácidas. Por el contrario, la depuración biológica de las isoformas más ácidas fue significativamente menor que la de sus análogos menos ácidas.

Con el fin de investigar los efectos de las isoformas moleculares sobre el desarrollo folicular e intentar otorgarles un significado fisiológico, se emplearon dos sistemas uno *in vivo*, con la influencia del tiempo de vida media en la circulación y el otro, *in vitro*, donde se estudió la interrelación entre los tres tipos celulares del folículo bajo condiciones conocidas. En el sistema *in vivo*, el efecto de las isoformas medio y menos ácidas (pH 5.62-4.96) fue más pronunciado en los folículos preantrales con un diámetro de 50-199 μm , en los cuales la velocidad de proliferación celular después de 6 y 12 horas de exposición a estas isoformas menos sializadas y con menor vida media, fue mayor que la exhibida por los folículos expuestos con las isoformas más ácidas (pH<3.75) (Barrios-De-Tomasi y cols., 2002). Esto es de gran importancia desde el punto de vista fisiológico, considerando que el número de variantes (incluyendo las isoformas menos ácidas) identificadas en la hipófisis son también liberadas en la circulación (Padmanabhan y cols., 1988, Wide y cols., 1993, Zambrano y cols., 1995, Ulloa-Aguirre y cols., 2003) y que el receptor de FSH requiere solamente cantidades nanomolares para que el ligando se active. Es más, una breve exposición de la célula blanco a una isoforma de una vida media corta pero altamente potente podría ser suficiente para desencadenar una respuesta biológica. Otros factores diferentes a la vida media plasmática (afinidad de unión al receptor, capacidad del ligando de activar el receptor y la eficiencia para disparar una señal intracelular) desempeñan un papel importante en la determinación de los efectos netos *in vivo* de una determinada variante de FSH.

Las isoformas menos ácidas fueron igual o un poco más eficientes que sus contrapartes más ácidas para mantener la proliferación de la granulosa después de la hipofisectomía. El efecto de las isoformas menos ácidas (particularmente la isoforma 4) fue más pronunciado en folículos preantrales que medían menos de 199 μm de diámetro mayor, en los cuales la velocidad de proliferación celular fue mayor que las observadas en folículos expuestos a las isoformas 7 y 8 en todos los tiempos examinados. Estos resultados indican que factores adicionales, tales como la afinidad de unión al receptor y la capacidad del ligando para activar el receptor y la eficiencia para disparar una señal intracelular (efectos altamente dependientes de la estructura de carbohidratos), (Ulloa-Aguirre y cols., 1999) son también importantes para determinar los efectos *in vivo* netos de las isoformas dadas.

En este trabajo se muestra por primera vez la evidencia de que las isoformas de FSH intrahipofisarias inducen

diferentes patrones de desarrollo folicular *in vitro*. El desarrollo de un folículo intacto *in vitro* provee de un modelo único en el cual las células conservan sus relaciones *in vivo* y proceden a través de estadios de desarrollo secuenciales. Las alteraciones específicas de alguna de sus partes componentes pudiera en consecuencia promover diferencias en las respuestas biológicas. Este sistema emplea folículos intactos primarios en estadios tardíos o preantrales secundarios en estadios tempranos de ratones juveniles (21 d). Los folículos se mantienen con una estructura tridimensional intacta sin adherirse al fondo o a las paredes de las placas de cultivo durante todo el período de cultivo (4 días), desarrollándose hasta tener una cavidad antral. Los folículos en este período de desarrollo no requieren LH y son sensibles y dependientes de FSH para un crecimiento adecuado. La respuesta folicular fue evaluada con cuatro diferentes parámetros: crecimiento, formación de la cavidad antral, producción de estrógenos y diferencias morfológicas y/o presencia de cx-43.

Durante el período de cultivo (4 días), los folículos se desarrollaron del estadio primario ($\approx 160 \mu\text{m}$) al estadio antral medianos. Estos estadios de desarrollo, acompañados por una proliferación celular y eventos en la diferenciación, secreción de estradiol y formación de la cavidad antral, aparentemente están regulados por la FSH (Nayudu y cols., 2002). Durante este intervalo de tiempo, los folículos en desarrollo pudieran ser sensibles a estímulos diferenciales provistos por las isoformas de FSH. A una dosis de 400 ng/ml, la isoforma menos ácida de FSH (isoforma 1) indujo un mayor porcentaje de folículos en crecimiento por encima del tamaño umbral necesario para la formación del antro, mientras que sus contrapartes más ácidas indujeron un crecimiento similar pero sólo a dosis más altas [800 ng/ml (isoforma 4 y 8)]. Las isoformas menos ácidas indujeron un crecimiento rápido de los folículos durante el desarrollo preantral. Con todas las dosis empleadas las isoformas más ácidas estimularon la producción de 17β -estradiol solamente al final del cultivo así como la formación del antro en una menor proporción en comparación con sus contrapartes menos ácidas; por lo tanto las isoformas menos ácidas inducen un crecimiento preantral más rápido, produciendo folículos antrales más grandes a dosis menores y a su vez tienen un mayor impacto en la producción de estradiol y en la formación del antro que la isoforma más ácida. Estos resultados coinciden con estudios anteriores realizados por Vitt y colaboradores (Vitt y cols., 1998, 2001) donde comenzaron a elucidar algunos de los efectos de tres fracciones de FSHrec en el desarrollo de folículos *in vitro*, con resultados similares a los presentados en esta tesis. En estos estudios (Vitt y cols., 1998 y 2001) se demostró que a una dosis de 1.5 ng/ml, las isoformas menos ácidas de FSHr indujeron un mayor porcentaje ($<70\%$) de un crecimiento rápido y continuo ($\geq 40 \mu\text{m}/\text{día}$) de los folículos antrales. La fracción medio-ácida indujo un crecimiento similar pero la formación del antro requirió una dosis mayor (7.5 ng/ml). La fracción más ácida difirió de las otras dos, ya que la dosis umbral antral fue mucho mayor (50 ng/ml) y la eficiencia en la formación del antro fue significativamente menor ($<60\%$). Además de las diferentes dosis umbrales antrales, la proporción de folículos que formaron cavidad antral fue diferente dependiendo de las isoformas. En esta tesis se demuestra que los folículos expuestos a la isoforma intrahipofisaria menos ácida de FSH tuvieron una mayor capacidad para la formación del antro a diferencia de sus contrapartes más ácidas.

El crecimiento folicular está dado por un incremento en la proliferación de las células de la granulosa y de la teca, así como por la formación de una cavidad antral que se llena progresivamente con fluido antral, un paso crítico en los estados de diferenciación. Los folículos expuestos a las isoformas menos ácidas presentaron un tamaño mayor folicular debido principalmente a un incremento en la proporción de crecimiento del día dos o tres del cultivo,

dependiendo de la dosis. Dicho crecimiento específico durante el desarrollo folicular preantral no fue inducido por las otras isoformas. Este crecimiento rápido inducido por la isoforma menos ácida, pudiera ser un efecto de la rápida proliferación celular de la granulosa, como se muestra por un incremento en el diámetro folicular interno o pudiera ser un efecto también de la potencia que tiene esta isoforma en la formación de la cavidad antral. Por el contrario la isoforma más ácida no presentó un efecto estadio específico. Sin embargo, existe la posibilidad que esta isoforma pudiera actuar preferentemente en estadios muy tempranos del desarrollo folicular, como un estímulo continuo (debido al mayor tiempo de permanencia en circulación). Este hecho podría estar relacionado con estudios previos realizados por Zambrano y cols., los cuales encontraron que las isoformas más ácidas (con valores de pH <4.5) predominan en circulación durante la fase folicular temprana y lútea. De la misma manera, informaron una mayor producción y secreción de isoformas menos ácidas (comparables con las isoformas 1 y 4 de esta tesis) durante la fase preovulatoria (Zambrano y cols., 1995); en esta etapa las isoformas menos ácidas proveerían una señal para preparar al folículo para la ovulación. Otros estudios informados previamente describen una reducción en la actividad *in vivo* alrededor del medio ciclo (Wide y cols., 1993), correlacionado con la secreción de isoformas menos ácidas.

El tamaño del folículo no es el único factor que influye en la formación del antro, se requiere de una señal necesaria para la producción y secreción del fluido antral, para la formación de un espacio organizado entre las células de la granulosa/cumulus y las células murales de la granulosa; esta señal podría ser mucho más débil en los folículos expuestos a la isoformas más ácidas de FSH. Esta señal podría ser un factor intrafolicular (probablemente el estradiol) que permita la modificación estructural de las células de la granulosa para la formación del antro.

Los efectos de las diferentes isoformas intrahipofisarias de FSH en la producción de esteroides indican que las isoformas menos ácidas inducen una mayor producción de estrógenos en células aisladas de la granulosa en comparación con las isoformas más ácidas (Cerpa-Poljak y cols., 1993). Sin embargo, estos autores no lo relacionan con otros parámetros del desarrollo folicular. En esta tesis, se demuestra que las isoformas menos ácidas inducen la secreción de estradiol a dosis menores y más temprano en el desarrollo que otras isoformas más ácidas. Por el contrario las isoformas más ácidas, a pesar de la dosis, secretaron una cantidad mínima de estrógenos. Como se sabe los estrógenos tienen un efecto antiatrésico en el desarrollo folicular, por lo que las isoformas menos ácidas podrían tener un efecto antiatrésico en los folículos y las isoformas ácidas tienen un efecto atrésico relacionado a una baja producción de estrógenos.

del ARNm y/o de la proteína de la cx-43 pudiera ser promovida por otro factor X que a su vez sea producido por la estimulación de las isoformas menos ácidas de la FSH. Este podría ser el mecanismo mediante el cual las isoformas menos ácidas promueven el desarrollo de un folículo sano que pudiera ser el seleccionado en un ciclo para ovular.

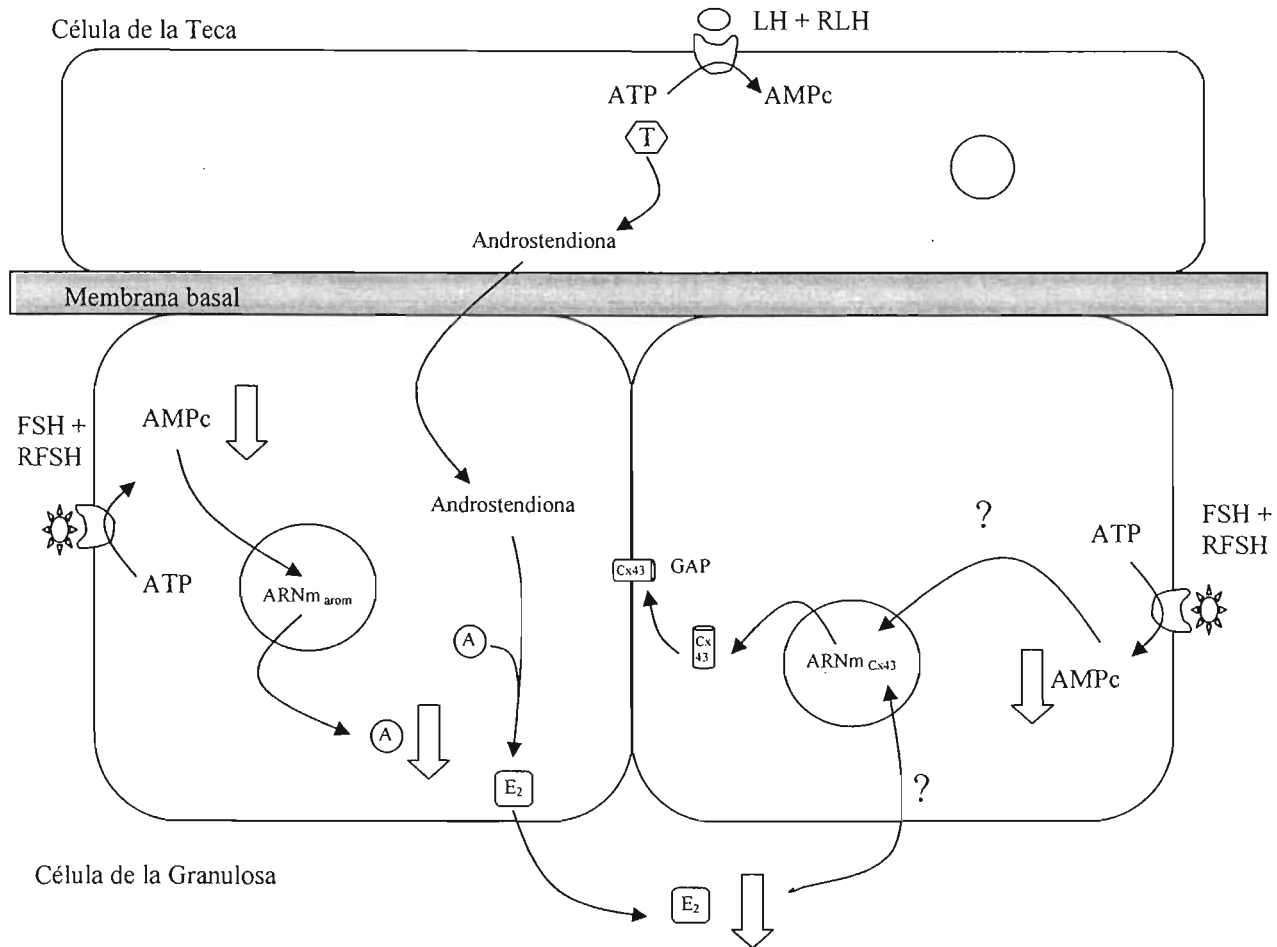


Figura 15. Hipótesis del mecanismo mediante el cual las isoformas más ácidas tienen una menor producción de estrógenos debida a una disminución en la producción de aromatasa, de su ARNm y de la producción del segundo mensajero AMPc. La disminución en la producción de los estrógenos o algún otro factor producido (?) o dejado de producir bajo la influencia de las isoformas más ácidas disminuirían a su vez la producción de cx-43 y/o su ARNm. FSH, Hormona folículo estimulante; LH, Hormona luteinizante; RFSH, receptor de la FSH; RLH, receptor de LH; ATP, adenosín trifosfato; AMPc, adenosín monofosfato cíclico, ARNm ácido ribonucleico mensajero; A, aromatasa; E₂, estrógenos; Cx43, conexina 43, T, Testosterona.

Por otra parte, en la figura 15 se propone un mecanismo mediante el cual las isoformas más ácidas pudieran tener un efecto atrésico sobre las células de la granulosa mediante una menor producción de estrógenos, como resultado de una menor producción de aromatasa, debida a su vez por una menor producción del segundo mensajero AMPc. La disminución en la concentración de estrógenos o algún otro factor estimulado o inhibido por las isoformas más ácidas disminuirían la producción de la cx-43, disminuyendo la comunicación entre las células de la granulosa, llevando al folículo a la muerte celular.

En conclusión, las diferentes variantes de la FSH inducen diferentes desarrollos foliculares y pueden ejercer efectos diferenciales e inclusive contrarios a nivel de la célula blanco (Tabla 5.), lo cual nos provee de un punto de vista fisiológico de suma importancia; una breve exposición de una isoforma altamente potente y de menor vida media puede ser suficiente para inducir una respuesta celular de la célula blanco. Las isoformas menos ácidas demostraron ser las más eficaces presentando una mayor bioactividad, promoviendo un rápido crecimiento preantral folicular, la formación de la cavidad antral y el inicio de la secreción de estrógenos a dosis menores que sus contrapartes más ácidas.

	Isoformas Neutras (menos ácidas)	Isoformas Ácidas (más ácidas)	Referencias bibliográficas
Cantidad de ácido siálico	+	+++	<i>Baezinger y cols., 1988</i>
Vida media plasmática	+	+++	<i>Blum y cols., 1985, presente tesis</i>
Potencia biológica <i>in vitro</i>	+++	+	<i>Revisado en: Ulloa-Aguirre y cols., 1995</i>
Proliferación celular de las células de la granulosa <i>in vivo</i>	+++	+	<i>Barrios-De-Tomasi y cols., 2002, presente tesis</i>
Producción de AMPc <i>in vitro</i> (granulosa y complejo ovocito-cumulus [COC])	+++	+	<i>Zambrano y cols., 1996, Yding Andersen y cols., 2001</i>
Eficiencia en el reasumo de la meiosis en ovocitos <i>in vitro</i>	+++	+	<i>Yding Andersen y cols., 1999</i>
Secreción de estrógenos <i>in vitro</i>	+++	+	<i>Revisado en: Ulloa-Aguirre y cols., 1995, presente tesis</i>
Producción de tPA <i>in vitro</i>	+++	+	<i>Timossi y cols., 2000</i>
Síntesis de cit p450arom y ARNm de tPA <i>in vitro</i>	+++	+	<i>Timossi y cols., 2000</i>
Síntesis de ARNm de α -inhibina <i>in vitro</i>	+	+++	<i>Timossi y cols., 2000</i>
Presencia durante la ovulación	+++	+	<i>Zambrano y cols., 1995</i>
Presencia en la fase lútea	+	+++	<i>Zambrano y cols., 1995</i>
Crecimiento folicular	+++	+	<i>Vitt y cols., 1998, presente tesis</i>
Inmunolocalización de cx-43	Cercana al ovocito, granulosa interna	Cercana a la membrana basal, granulosa mural	<i>Presente tesis, datos no publicados</i>

Tabla 5. Características generales de las isoformas o variantes moleculares de la FSH. +, menor; +++, mayor.

Estos resultados, podrían ser potencialmente útiles para el diseño de estrategias terapéuticas orientadas a obtener un mejor control en la estimulación exógena del ovario. Los resultados son, sin embargo, difíciles de extrapolar a lo que ocurre fisiológicamente en la pubertad y en los ciclos ovulatorios, condiciones en las cuales la señal de FSH es mucho más compleja involucrando poblaciones variables de receptores, una gran variedad de señales y vías de transducción, de

factores de crecimiento y de diferenciación, de esteroides y de otras sustancias extracelulares que modulan la acción de las gonadotropinas, dentro de un contexto que está en cambio continuo.

Muchos aspectos relacionados con el mecanismo de acción de las variantes glicosiladas de la FSH aun quedan por investigar, tales como los procesos intracelulares o a nivel del receptor que se llevan a cabo para identificar las diferentes variantes y promover distintas respuestas celulares, la conformación tridimensional de las diferentes isoformas unidas a su receptor, la capacidad de inducir funciones coordinadas múltiples pero altamente específicas y el establecimiento de combinaciones óptimas de isoformas para los diferentes estados de desarrollo del folículo, particularmente en relación a la calidad del ovocito. Así mismo, es importante realizar más estudios para determinar la ubicación de las isoformas dentro del gran contexto reproductivo, considerando al ovario como una estructura influenciada por diversos factores químicos, internos, externos e inclusive temporales, que en su conjunto han llevado a perpetuar la especie de una manera casi perfecta.

CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados, para estudiar las características biológicas de las isoformas de la FSH intrahipofisaria humana, se obtuvieron los siguientes resultados:

- En condiciones *in vitro* e *in vivo* todas las isoformas intrahipofisarias de FSH aisladas mediante cromatoenfoque, fueron capaces de inducir una respuesta biológica.
- Las isoformas más ácidas/sializadas presentaron una relación B/I significativamente menor que el resto de las isoformas.
- Las isoformas menos ácidas permanecieron menos tiempo en circulación, presentando una mayor tasa de depuración plasmática, menor tiempo de residencia media, menor vida media y menor porcentaje de recuperación a diferencia de sus contrapartes más ácidas.
- Las isoformas menos ácidas fueron más eficientes para mantener la proliferación de las células de la granulosa que las isoformas más ácidas.
- Las isoformas menos ácidas inducen un crecimiento preantral más rápido produciendo folículos antrales más grandes a dosis menores a diferencia de las isoformas más ácidas.
- Las isoformas menos ácidas tienen un mayor impacto en la producción de estradiol y en la formación de la cavidad antral.
- La inmunolocalización de la conexina 43 presenta una distribución cercana a la membrana basal en los folículos expuestos a la isoforma menos ácida y una distribución cercana al ovocito en los folículos expuestos a la isoforma más ácida.

Por lo tanto, en conclusión, la hipótesis planteada fue comprobada, ya que a dosis equivalentes las isoformas menos ácidas/sializadas de la FSH humana, presentaron una actividad biológica mayor a sus análogos más ácidos tanto en la inducción del crecimiento folicular, como en la proliferación celular, en la formación de la cavidad antral y en la síntesis de estradiol.

Anexo A

Hipofisectomía por vía parafaríngea

La hipofisectomía se realizó mediante la técnica descrita por Quintanar-Stephano (Quintanar-Stephano y cols., 1994). Previamente a la anestesia con éter etílico, se procedió a inyectar atropina (40 mg/100 g de peso) por vía subcutánea, con el fin de disminuir las secreciones salivales y bronquiales, previniendo a su vez la bradicardia provocada por una estimulación excesiva del nervio vago. Se rasuró al animal en la cara anterior del cuello y se fijó la rata en decúbito dorsal sobre la mesa de operaciones. Para entubar la tráquea se inclinó la mesa de operaciones en un ángulo aproximado de 70° iluminando de frente la zona del cuello con una lámpara y con la ayuda de un abatelenguas se observó la apertura intermitente de la glotis. Se canuló la tráquea introduciendo el catéter y asegurándose que haya quedado en la vía aérea. La cara anterior del cuello se limpió con cloruro de benzalconio y se realizó una incisión de 2 a 3 cm en la línea media de la piel, desde el borde inferior de la mandíbula hasta el mango del esternón. Se cortó la fascia superficial que recubre a los músculos digástricos y esternohioideos. Se tomó como referencia el tendón central del músculo digástrico izquierdo y con los disectores rectos se hizo una separación roma de las siguientes estructuras: vena yugular interna izquierda y cara interna del músculo masetero del mismo lado y hacia el centro el músculo digástrico y los conductos faringoesofágico y laringotraqueal. Una vez realizado lo anterior se procedió a trabajar bajo el microscopio estereoscópico con un aumento de 10x. Con el separador curvo se jalaban las estructuras internas hacia la línea media hasta observar el piso de la nasofaringe, de la que sobresale el extremo distal de la apófisis pterigoidea izquierda, la cual se tomó como referencia para desplazarse 1.5 cm hacia abajo y hacia el centro. En este punto se encontró el hueso basioccipital, el cual se legró con el mismo disector, hasta llegar a la cresta del occipital la cual se limpió en ambos lados en dirección anterior, hasta llegar a la articulación eseno-occipital, la cual se identificó como una línea transversal, generalmente de color azul claro, que corresponde a dicha articulación. Se colocaron los separadores romos de metal de tal manera que se pudiera realizar con buena visibilidad las maniobras posteriores. Para evitar un daño por compresión, así como la ruptura de la nasofaringe, fue importante que los separadores no quedaran excesivamente apretados. El número de separadores y el lugar de su localización dependió de la visibilidad de la zona operatoria. Con una broca se trepanó el hueso basioccipital en la parte media e inmediatamente por delante de la cresta y posterior de la línea azul, hasta llegar a la duramadre cuidando de no romperla. Con una legra para hueso, se levantó y se desprendió los restos de la lámina interna del hueso y se redondearon los bordes del orificio, hasta que quedó con un diámetro final de 3 mm aproximadamente. Con la aguja para meninges se rompió la duramadre y se extrajo la hipófisis con un aspirador de hipófisis conectada al vacío. Después de la hipofisectomía, se presentó una pequeña hemorragia acompañada de líquido cefalorraquídeo que cesó en unos momentos. La hipófisis extirpada y atrapada en la malla de nylon se observó al microscopio y se determinó si la hipofisectomía fue completa. Una vez que la hemorragia cesó, se aspiró el coágulo, hasta asegurar que no hubiera hemorragia. Finalmente se procedió a retirar los separadores de metal y a suturar la piel.

Cuidados Postoperatorios

Se retiró la cánula traqueal y el animal se colocó en una caja de cuidados intensivos, formada por un colchón térmico en una atmósfera de gas carbógeno (95% O₂, 5% CO₂). Como el primer efecto de la hipofisectomía es la poliuria, que aparece entre los 40-90 minutos después de la operación, la rata tuvo libre acceso a agua glucosada (10%) para evitar la muerte por deshidratación. Una temperatura de 28-30°C y una dieta constituida de agua glucosada, alimento molido y pan humedecido con leche fueron importantes para la supervivencia postoperatoria.

Anexo B

Fijación

1. Fijación de los ovarios en la solución de Karnovsky modificada (paraformaldehído 1%, glutaraldehído 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.2M sin Ca^{++} , pH 7.4) de 1 a 12 horas a 4°C
2. Lavado con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M 3× 15 min.
3. Post-fijación con tetróxido de osmio (OsO_4 1% en amortiguador de Zetterqvist ₍₁₉₅₆₎) una hora
4. lavado con agua bidestilada 3× 5 min.

Deshidratación

5. Lavado con etanol al 70% 3× 10 min. a 4°C
6. Lavado con etanol al 80% 3× 10 min. a 4°C
7. Lavado con etanol al 90% 3× 10 min. a temperatura ambiente
8. Lavado con etanol al 95% 3× 10 min. a temperatura ambiente
9. Lavado con etanol al 100% 20 min. a temperatura ambiente
10. Lavado con etanol al 100% 20 min. a temperatura ambiente
11. Óxido de propileno 20 min. a temperatura ambiente
12. Óxido de propileno 20 min. a temperatura ambiente

Impregnación

13. Mezcla de óxido de propileno y Epon® 812 (SPI Supplies) 1:1 por una hora en agitación constante a temperatura ambiente.
14. Mezcla de óxido de propileno y Epon® 1:2 por una hora en agitación constante a temperatura ambiente.
15. Epon® puro por 12 horas en agitación constante a temperatura ambiente.

Inclusión

16. Epon® puro a 60°C por 24 horas en moldes plásticos debidamente etiquetados.

Anexo C

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para comprobar el estado hipogonadotrópico de los ratones.

La condición gonadotrópica de los animales se determinó con células de folículos capilares. Mediante la obtención de una pequeña parte de tejido de la punta de la cola del animal mediante la técnica descrita por Lang en 1991.

Una vez que se colectó el trozo de tejido, se introdujo en viales eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y se agregó 200µl de la mezcla para lisis celular. La mezcla para lisis celular (lysis-Mix) se preparó en un tubo de 10 ml estéril, en hielo y bajo la campana de flujo laminar de la siguiente manera:

KCl, 500 mM	1.6 ml
Tris, 1000 mM	1.6 ml
Tritón x-100, 5%	1.6 ml
Tween 20, 22.5%	160 µl
Proteinasa K, 3 µg/µl	160 µl
Agua bidestilada estéril	2.8 ml

Las muestras se procesaron en el termociclador (Biometra 2) bajo el siguiente protocolo:

Paso 1: 55°C por 60 minutos

Paso 2: 98°C por 15 minutos

Paso 3: 4°C por 60 minutos

Posteriormente se centrifugaron las muestras a 2500 rpm para precipitar el tejido y los restos celulares y se procedió a la realización del PCR en viales estériles, incluyendo un control negativo. La mezcla del PCR se realizó en hielo y con las siguientes concentraciones:

Sonda A, 2 pmol/µl	64 µl
Sonda B, 1 pmol/µl	64 µl
Sonda C, 2 pmol/µl	64 µl
MgCl ₂ , 20 mM	64 µl
dNTPs	64 µl
ADN Taq polimerasa, 5 u/µl	3 µl

En viales estériles y etiquetados se agregó 10 µl de esta mezcla (incluyendo al control negativo), una gota de aceite para PCR (evita la condensación de la muestra) y 10 µl de la muestra (se tomó del sobrenadante y se depositó debajo de la capa de aceite). El control negativo lleva 10 µl de la mezcla Lysis-Mix.

Las muestras se procesan en el termociclador bajo el siguiente protocolo:

Paso 1: 92°C 4 min. 45 seg.

Paso 2: 94°C 15 seg.

Paso 3: 60°C 15 seg.

Paso 4: 72°C 1 min.

24 ciclos del paso 2 al paso 4

Paso 5: 94°C 15 seg.

Paso 6: 60°C 15 seg.

Paso 7: 72°C 2 min.

7 ciclos del paso 5 al paso 7

Paso 8: 4 °C indefinido

Preparación del gel: Se preparó un gel al 2% con amortiguador TE 1×. Una vez disuelta la agarosa se agregó 1 µl de Bromuro de etidio (Sigma). En cada carril se depositaron 2 µl del amortiguador de corrimiento y 12 µl de la muestra, para el estándar (GeneRuler™, 100bp DNA Ladder plus) se preparó con 11 µl de agua bidestilada estéril, 2 µl del amortiguador de corrimiento y 1 µl del estándar. La electroforesis se corrió alrededor de 1 hora a 70 voltios con amortiguador TBE 1×. Se fotografió bajo luz ultravioleta con el programa Eagle eye (Stratagene).

Sondas empleadas para el protocolo de PCR:

Sonda A (del gen de GnRH) (2 pmol/µl) (MWG Inc Biotech)

Secuencia: 5'-CAC ATC TGT AGC CAC AGT CC-3'

20 µl Sonda A

980 µl agua bidestilada estéril

almacenar a -20°C

Sonda B (del gen de GnRH) (1 pmol/µl) (MWG Inc Biotech)

Secuencia: 5'-AGC TCC GAG GCT GTC ACT GG-3'

10 µl Sonda B

990 µl agua bidestilada estéril

almacenar a -20°C

Sonda C (del gen de GnRH) (2 pmol/µl) (MWG Inc Biotech)

Secuencia: 5'-GCT TGG AGA GCT GTA AGG TC-3'

20 µl Sonda C

980 µl agua bidestilada estéril

almacenar a -20°C

Anexo D

Histología

Fijación

Después de los cuatro días de cultivo se procedió a realizar la inmunohistoquímica de conexina 43 de los folículos, para lo cual se interrumpió el cultivo transfiriendo los folículos al fijador (Formalina 3.5% en PB a 37°C). La fijación se realizó por una hora y luego se transfirieron los folículos a PB, tres veces por 5 minutos. Debido al pequeño tamaño de los folículos primero se incluyeron en agar (2%) para hacer más fácil su manipulación y observación. Para la inclusión en parafina se siguió el siguiente protocolo:

Paso 1	Alcohol 50%	10 minutos
Paso 2	Alcohol 70%	10 minutos
Paso 3	Alcohol 80%	10 minutos
Paso 4	Alcohol 96%	10 minutos
Paso 5	Alcohol 96%	10 minutos
Paso 6	Alcohol 100%	10 minutos
Paso 7	Alcohol 100%	10 minutos
Paso 8	Cloroformo	10 minutos
Paso 9	Cloroformo	15 minutos
Paso 10	Parafina 40°C	30 minutos
Paso 11	Parafina 40°C	45 minutos

Al día siguiente de la inclusión se sacaron los folículos, se orientaron y se colocaron en contenedores metálicos, los cuales se colocaron sobre una parrilla térmica a -4°C para agilizar la solidificación de la parafina. Una vez solidificada, se sacaron los bloques y se almacenaron en un lugar fresco o en frío antes de cortarlos.

Cortes

Previamente a cortar los bloques, se depositaron en hielo para facilitar su manipulación y para facilitar el cortado. Se realizaron cortes seriados de 3 µm de grosor con un microtomo de rotación y navajas metálicas. (Microm International GmbH, Walldorf, Alemania). Cada corte se tomó colocando un trozo de papel calca previamente humedecido con agua fría en el momento del corte, lo cual evitó que el corte se doble o se arrugue, y se depositaron en agua caliente (40°C) para que se estiraren. Posteriormente se tomaron los cortes con laminillas Histobond® (Marienfeld, Alemania) y se dejan secar a 40°C.

Inmunotinción con reacción Fosfatasa Alcalina

Para cortes en parafina: Reacción APAAP

1. Poner los cortes a 37°C toda la noche en atmósfera seca
2. Poner los cortes a 60°C 1 h
3. Serie de alcohol/Xilol: 3x 5 min. Xilol, 2x 5 min. Etanol absoluto, 1x 5 min. Etanol 90%, 1x 5 min. Etanol 80%, 1x 5 min. Etanol 70%, 1x 5 min. Etanol 50%, 1x 5 min. agua bidestilada.
4. Tratamiento con microondas para la recuperación de antígenos: Amortiguador de citratos (pH 6,0) cocinar 15 min. a 640 W. Cada 5 minutos rellenar con amortiguador para evitar que los cortes se sequen. Dejar enfriar.
Sol A: 21.01 g $C_6H_8O_7 \cdot xH_2O$ en 1 l agua bidestilada
Sol B: 29.41 g $C_6H_5O_7Na_3 \cdot x2H_2O$ en 1 l agua bidestilada
Amortiguador de citratos: 18 ml A + 82 ml B, aforar a un litro, pH 6,0
5. 2 x 2 min. Agua destilada
6. Ácido acético 20% 10 seg.
7. 3 x 3 min. Amortiguador de lavado (amortiguador Tris-NaCl 0.05 mol/L)
8. Amortiguador de bloqueo (Albúmina de suero de bovino 5% [BSA]) 30 min.
9. Primer anticuerpo: conejo anti-conexina 43 (policlonal) (Zymed, GMBH, Berlin, Alemania) 1:10 Incubación toda la noche a 4°C
10. Amortiguador de lavado 3 x 3 min.
11. Segundo anticuerpo: ratón anti-Ig de conejo (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) 1:50 en amortiguador de bloqueo por 30 min. a T°C amb.
12. Amortiguador de lavado 3 x 3 min.
13. Tercer anticuerpo: conejo anti-Ig de ratón (Dako A/S) (1:50) en amortiguador de bloqueo por 30 min. a T°C amb.
14. Amortiguador de lavado 3 x 3 min.
15. Incubar con complejo APAAP (ratón, monoclonal) (Dako A/S) 1:50 en amortiguador de bloqueo por 30 min. a T°C amb.
16. amortiguador de lavado 3 x 3 min.
17. Para la visualización de la fosfatasa alcalina se empleó un estuche colorimétrico Histomark® Red (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, EUA)
18. Amortiguador de lavado
19. Contratinción azul de hematoxilina (10 seg.)
20. Montar con Immu-Mount™ (Thermo Shandon, Pittsburg, PA, EUA)

REFERENCIAS

- Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*. 1986; 118:1682-1689.
- Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971; 44:459-463.
- Baenziger JU. Editorial: Glycosilation: To what end for the glycoprotein hormones?. *Endocrinology*. 1996; 137(5):1520-22.
- Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochem. Biophys. Acta*. 1988; 947:287-306.
- Bagavandoss P, Midgley AR Jr, Wicha M. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1983; 31:633-640.
- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Animal Sci*. 1998; 76(7):1903-1921.
- Barrios-de-Tomasi J, Timossi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Yding CA, and Ulloa-Aguirre A. Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 186:189-198.
- Biggers JD., Whittingham DG., Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *P Natl Acad Sci*. 1967; 58:560-567.
- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*. 1996; 2(2):103-117.
- Bley MA, Simon JC, Estavez Ag, Jimenez de Asua L, Barrarao JL. Effect of follicle- stimulating hormone on insulin growth factor-I stimulated rat granulosa cell desoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. 1992; 131:1223-9.
- Bley MA, Simon JC, Saragueta PE, Barano JL. Hormonal regulation of rat granulosa cell desoxyribonucleic acid synthesis effects of estrogens. *Biol Reprod*. 1991; 44:880-888.
- Blum WFP, Gupta D. Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *J Endocrinol*. 1985; 105:29-37.
- Byskov AG. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*. 1974; 37:277-285.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, SmithGM, Stuart MC, Schofield PR. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology*.

1993; 132:351-356.

Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafri A, Hsueh AJW. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 1994; 135:1845-1853.

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. 1996; 137:1447-1456.

Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJW. Interleukin-1 β suppress apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*. 1995; 136:3120-3127.

Dekel N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Ann NY Acad Sci*. 1998, 541:211-216.

Dorrington JH, Bendell JJ, Khan SA. Interactions between FSH, estradiol-17 beta and transforming growth factor-beta regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 1993; 44:441-447.

Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. Estradiol 17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 1975; 97:1328-31.

Eisenhauer KM, Chun SY, Billig H, Hsueh AJW. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod*. 1995; 53:13-20.

Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays*. 1991; 13:569-574.

Fiddes JC, Talmadge K. Structure, expression and evolution of genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res*. 1984; 40:43-78.

Fiete D, Baenziger JU. Isolation of the SO₄-4-GalNAc β 1, AGlcNAc β 1,2Man α -specific receptor from rat liver. *J Biol Chem* 1997; 272:14629-14637.

Fox KM, Dias JA, Van Roey P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol*. 2001;15(3):378-389.

Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, Yamoto M, Fauser BCJM, Boime I. In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transferred eukaryotic cell lines. *Endocrinology*. 1990; 127: 93-100.

Gore-Langton RE, Daniel SA. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganisation of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biol Reprod*. 1990; 43:65-72.

Granot I, Dekel N. Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of

connexin 43. Hum Reprod. 1998; Dec;13 Suppl 4:85-97.

Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. TRENDS Endocr Metab. 2002; 13(7):310-313.

Grazul-Bilska AT., Reynolds LP., Redmer DA. Gap junctions in ovaries. Biol Reprod. 1997; 57:947-957.

Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem J. 1963; 89:114-123.

Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. Biochem Biophys Res Commun. 1988; 156:668.

Hay MF, Cran DG, Moor RM. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell Tissue Res. 1976; 169:515-529.

Hirshfield AN. Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. Biol Reprod. 1989; 40:181-190.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafiriri A: Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev. 1994; 15(6):707-24.

Hsueh AJW, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:5082.

Itahana K, Tanaka T, Morikazu Y, Komatu S, Ishida N, Takeya T. Isolation and characterization of a novel connexin gene, Cx-60, in porcine ovarian follicles. Endocrinology. 1998; 139:320-329.

Jia X C, and Hsueh AJ. Sensitive *in vitro* bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. Neuroendocrinol. 1985; Nov 41(5):445-448.

Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. Biol Reprod. 1999; 60:1263-1270.

Junquiera LC, Carneiro J, Kelly RO. Basic Histology. Appleton and Lange, Norwalk, 1989. pp.443-444.

Katabuchi H, Suenaga Y, Fukumatsu Y, Okamura H. Distribution and fine structure of macrophages in the human ovary during menstrual cycle, pregnancy and menopause. Endocrine J. 1997; 44(6):785-795.

Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol. 1965; 27:137A.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-257.

Kettel LM, Erickson GF. Basic and clinical concepts in ovulation induction. En: Rock J, Alvarez-Murphy A eds. *Advances in obstetrics and gynecology*, vol. 1. Chicago: Mosby-Year Book, Inc., 1994:214.

Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002; 123:613-620.

Knobil E, Neil JD, *The physiology of reproduction*. Raven Press. 1994.

Lang J. Assay for deletion in GnRH (hpg) locus using PCR. *Mouse Genome*. 1991; 89(4):857.

Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. *Endocrinology*. 1995; 136:849-856.

Lockshin RA, Beaulaton J. Cell death: questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J*. 1981; 13:659-666.

Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K. Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin -57 in human HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; 274:14716-14723.

Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971; 43:1334-1339.

Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 1997; 138:3320-3329.

McCann SM, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH: The role of nitric oxide in reproduction. *Braz J Med Biol Res*. 1999; Nov;32(11):1367-79.

McGee EA, Hsueh AJ: Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000; 21(2):200-214.

Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein hormones in the circulation. *J Biol Chem* 1971; 246:1461-1467.

Morris RG, Duvall ED, Hargreaves AD, Wyllie AH. Hormone-induced cell death. II. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol*. 1984; 115:426-436.

Mulders JWM, Derksen M, Swolfs A, Maris F. Prediction of the *in vivo* biological activity of human recombinant follicle-stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. *Biologicals*. 1997; 25:269-281.

- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*. 1990; 247:836.
- Nayudu PL, Vitt UA, Barrios-De-Tomasi J, Pancharatna K, Ulloa-Aguirre A. Intact follicle culture: What it can tell us about the roles of FSH glycoforms during follicle development. Symposium: Endocrine aspects of follicular and oocyte growth. *Reprod BioMed Online*, 2002, 5(3):240-253.
- Otsuka M, Kishi H, Arai K, Watanabe G, Taya K, Greenwald GS. Temporal changes in inhibin, steroid hormones and steroidogenic enzymes during induced follicular atresia in the hypophysectomized cyclic hamster. *Biol Reprod*. 1997; 56:423-429.
- Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ. 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.
- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem*. 1981; 50:465-495.
- Quintanar-Stephano, A., Quintanar-Stephano, J.L. Hipofisectomía transfaríngea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet Méx*. 1994; 25(1):13-17.
- Richards JS, Midgley AR Jr. Protein hormone action: a key to understanding follicular and luteal cell development. *Endocrinology*. 1976; 97:1174-84.
- Rogers AW. *Techniques of Autoradiography*. 3rd Ed. New York: Elsevier/North-Holland, 1979.
- Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts MR, Lubahn DB: Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 2001; 122:215-226.
- Schwartzman RA y Cidowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993; 14(2):133-151.
- Shumaker, C.R. PKCALC: A basic interactive computer program for statistical and pharmacokinetic analysis of data. *Drug Metab. Rev*. 1986; 17:331-348.
- Smith GM, Bishop LA, DeKroon R, Wright G, Cerpa-Poljak A, Schofield PR. 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.
- Sommersberg B, Bulling A, Salzer U, Frölich U, Garfield RE, Amsterdam A and Mayerhofer A. Gap Junction Communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*. 2000; 63:1661-1668.
- Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction*. 1996; 1:162-172.

Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJW. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 1992; 6:1942-1950.

Timossi C, Damián-Matsumura P, Domínguez-González A and Ulloa-Aguirre A. A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analogue in phenobarbital-blocked pro-oestrous rats. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4(11):1032-38.

Timossi CM, Barrios de Tomasi J, González Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa Aguirre A. Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* 2000; 165(2):193-205.

Ulloa-Aguirre A., Chappel SC. Múltiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol.* 1982; 95, 257-266.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura M, Jiménez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V. Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Human Reprod.* 1992; 7:1371-78.

Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza P, Dominguez R, Morales L, Flores A. Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol.* 1990; 126:323-332.

Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, Chappel SC. Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotropins. *Human Reprod.*, 1988; 3:491-501.

Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel SC. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod.* 1984; 30,382-387.

Ulloa-Aguirre A, Rees MA Jr, Beitins IA, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16:765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropins. *Reprod BioMed Online.* 2000; 1(2):48-62.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-De-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: Studies derived from *in vitro* and *in vivo* models. *Biol Reprod.* 2003; 69:379-389.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P., Dias JA. Role of glycosilation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine.* 1999; 11(3):205-215

Vitt UA, Nayudu PL, Rose MU, Kloosterboer HJ. Embryonic Development after follicle culture is influenced by follicle-stimulating hormone isoelectric point range. *Biol Reprod.* 2001; 65, 1542-1547.

Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JWM, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL. Isoforms of human recombinant follicle stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. Biol Reprod. 1998; 59:854-861.

Wang XN, Greenwald GS. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. J Reprod Fertil. 1993a; 99(2):403-413.

Wang XN, Greenwald GS. Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth and follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. Biol Reprod. 1993b; 48:585-594.

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.

Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. J Clin Endocrinol Metab. 1993; 76:885-889.

Wide L, Hobson BM. Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. Acta Endocrinol. (Copenh) 1986; 113:17-22.

Wiesen JF., Midgley Jr R. Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. Biol Reprod. 1994; 50:336-348.

Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. Endocrinology. 1990; 127:3196-3205.

Wright CS., Becker DL., Lin JS., Warner AE., Hardy K., Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. Reproduction. 2001; 121:77-88.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980a; 68:251-306.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature. 1980b; 284:555-556.

Yding Andersen C, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-de-Tomasi J, Kristensen K, Byskov A. Effect of different FSH isoforms on cyclic-AMP production by mouse cumulus oocytes complexes: a time course study. Mol Hum Reprod. 2001; 7(2):129-35.

Yding Andersen C, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-de-Tomasi J, Moore L, Byskov AG. FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. Mol Hum Reprod. 1999; 5(8):726-731.

Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL; Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. Fourth Edition. W.B. Saunders Company, USA, 1999.

Yong EL, Baird DT, Yates R, Reichert LE Jr, Hillier SG. Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74:842-9.

Yoshinaga-Hirabayashi T, Osawa Y. Steroidogenic activity and ultrastructural observation of atretic follicles in the cycling hamster ovary. *Ital J Anat Embryol.* 1995; 100 Suppl 1:485-493.

Yuan W, Giudice LC: Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocr Metab.* 1997; 82(9):3148-55.

Zambrano E, Barrios de Tomasi J, Cárdenas M y Ulloa-Aguirre A. Studies on the relative in vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2(8):563-571.

Zambrano E, Olivares A, Diaz-Cueto L, Mendez JP, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. Dynamics of basal and GnRH releasable serum FSH charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(5):1647-1656.

Zampighi GA, Loo DD, Kreman M, Eskandari S, Wright EM. Functional and morphological correlates of connexin50 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Gen Physiol.* 1999; 113:507-524.

Zetterqvist, H. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm, 1956.

PUBLICACION ORIGINAL

Assessment of the *in vitro* and *in vivo* biological activities of the human follicle-stimulating isohormones

J. Barrios-De-Tomasi^a, C. Timossi^a, H. Merchant^b, A. Quintanar^c, J.M. Avalos^a,
C. Yding Andersen^d, A. Ulloa-Aguirre^{a,*}

^a Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecología "Luis Castelazo Ayala", Instituto Mexicano del Seguro Social, Apdo. Postal No. 99-065, 10101 Unidad Independencia DF, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^c Department of Physiology and Pharmacology, Centro Básico, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., Mexico

^d Laboratory of Reproductive Biology, Section 5712, Juliane Marie Center for Children, Women and Reproduction, University Hospital of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

Received 23 March 2001; accepted 12 April 2001

Abstract

Gonadotropins are synthesized and released in different molecular forms. In this article, we present evidence that the glycosylation variants of human pituitary FSH exhibit differential and divergent effects at the target cell level and that less sialylated, short-lived variants may exert significant effects in *in vivo* conditions. Less acidic/sialylated glycoforms (elution pH value 6.60–4.60 as disclosed by high resolution chromatofocusing of anterior glycoprotein extracts), induced higher cAMP release, estrogen production and tissue-type plasminogen activator (tPA) enzyme activity as well as cytochrome P450 aromatase and tPA mRNA expression in cultured rat granulosa cells than the more acidic analogs (pH < 4.76). By contrast, the more acidic/sialylated glycoforms induced higher α -inhibin subunit mRNA expression than their less acidic counterparts. In cumulus enclosed oocytes isolated from mice ovaries, addition of less acidic isoforms induced resumption of meiosis more efficiently than the more acidic analogs. Interestingly, the least acidic isoform (pH > 7.10) behave as a strong antagonist of several FSH-mediated effects. Assessment of the *in vivo* effects of the isoforms on granulosa cell proliferation in follicles from immature rats, revealed that short-lived isoforms were equally or even more efficient than their more acidic counterparts in maintaining granulosa cell proliferation when administered immediately after hypophysectomy. These results show that the naturally occurring human FSH isoforms may exhibit differential or even unique effects at the target cell level and that factors other than the metabolic clearance rate of the molecule (including receptor-binding affinity and capability of the ligand to activate its receptor and trigger intracellular signaling) also play an important role in determining the net *in vivo* effects of a particular FSH variant. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Follicle-stimulating hormone; Carbohydrates; Oligosaccharides; Glycoprotein hormones

1. Introduction

Follicle-stimulating hormone (FSH), one of the major hormones produced by the anterior pituitary gland, is involved in the regulation of several reproductive functions including gametogenesis, follicular growth, and ovulation. This gonadotropin is a heterodimer consisting of an α -subunit (which is common to all

members of the glycoprotein family of hormones) non-covalently bound to a unique β -subunit. The subunits of all glycoprotein hormones contain various Asn-linked oligosaccharide structures that represent a major structural component (~ 20 to 30% of the mass) of the hormone (Dias et al., 1998). In human (h) FSH, N-linked oligosaccharides are attached at positions Asn52 and Asn78 in the α -subunit and at positions Asn7 and Asn24 in FSH β (Ulloa-Aguirre et al., 1999). As in other glycoproteins from multicellular eukaryotes, oligosaccharide structures on glycoprotein hormones are highly variable and play a key role in determining several

* Corresponding author. fax: + 525-616-2278.

E-mail address: aulloaa@buzon.main.conacyl.mx (A. Ulloa-Aguirre).

functional properties of the hormone, including subunit assembly, intracellular sorting, metabolic clearance and regulation of potency at the target cell level (Baenziger and Green, 1988; Dias et al., 1998; Ulloa-Aguirre et al., 1995, 1999).

As a consequence of carbohydrate variability, FSH exists as a family of isoforms, which differ in electric charge (mainly determined by the amount of terminal sialic acid and, to a lesser extent, sulfate residues present in the oligosaccharide attachments) and inner carbohydrate structure (Baenziger and Green, 1988; Ulloa-Aguirre et al., 1995; Stanton et al., 1996). These variations in oligosaccharide structure modulate the net biological potency of the isoforms *in vitro* and *in vivo*. In this article, we summarize recent data obtained in our laboratory on the *in vitro* and *in vivo* bioactivity of the hFSH charge isoforms, and discuss some of the mechanisms subservient to their particular biological effects.

2. Biological potency of the hFSH charge isoforms

2.1. *In vitro* studies

The *in vitro* biological potency of the alternatively glycosylated variants of anterior pituitary FSH from several animal species has been previously analyzed

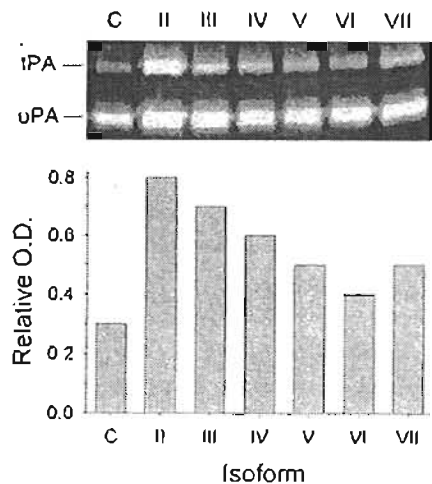


Fig. 1. Tissue-type plasminogen activator enzyme activity in cultured rat granulosa cells exposed to 2.8 ng of FSH isoforms II–VII for 72 h. Upper panel: Representative zymograph showing FSH-induced *t*PA enzyme activity. The location of *t*PA ($M_r \sim 70\,000$) and high molecular weight ($M_r \sim 50\,000$) urokinase-type plasminogen activator (*u*PA) activities are noted. No proteolytic activity with $M_r \sim 70\,000$ or $M_r \sim 50\,000$ was detected when plasminogen was omitted from the polyacrylamide gels (not shown). Lower panel: Relative OD (*t*PA/*u*PA OD ratio) of the lytic areas from the zymograph shown above. The results are representative of three independent experiments. C, control incubation in the absence of FSH. (Reproduced from Timossi et al. (2000) with permission from ©The Society for Endocrinology, UK).

employing mainly the rat granulosa cell or the Sertoli cell aromatization bioassays (reviewed in Ulloa-Aguirre et al., 1995). More recently, we have re-assessed the biological effects of the hFSH variants by monitoring several FSH-dependent responses of the target cell. For these studies, hFSH charge isoforms were obtained through high-resolution chromatofocusing of anterior pituitary glycoprotein extracts; this chromatofocusing procedure, which employs columns measuring 90×1.5 cm, has allowed identification of ~ 20 charge isoforms with elution pH values ranging from > 7.0 to < 3.80 (Zambrano et al., 1999; Timossi et al., 1998a, 2000). Fractions containing the greatest concentrations of immunoreactive FSH (as assessed by a polyclonal antibody-based RIA) were separately pooled and concentrated and the LH content was removed from each concentrate by affinity chromatography (Timossi et al., 1998a). The resulting 7 hFSH isoform pools [with pH values > 7.10 (pool I), 6.60–6.20 (pool II), 5.47–5.10 (pool III), 5.06–4.60 (pool IV), 4.76–4.12 (pool V), 4.05–3.82 (pool VI) and < 3.80 (pool VII)] were then tested for *in vitro* biological activity in heterologous and homologous assay systems. Due to the possibility that the isoforms may exert differential effects at the target cell level (Ulloa-Aguirre et al., 1995), we monitored FSH-induced generation of various intermediate and end products, including cAMP, estrogens and tissue-type plasminogen activator (*t*PA), as well as FSH-triggered cytochrome P450 aromatase ($P450_{arom}$), *t*PA and α -inhibin subunit (α -inh) mRNA expression following previously described procedures (Timossi et al., 2000).

Exposure of cultured rat granulosa cells to increasing doses of hFSH isoform pools II–VII for 48 h, stimulated significant dose-dependent cAMP and estrogen production. cAMP production was significantly ($p < 0.05$) greater when the cells were stimulated by isoforms with elution pH 6.60 to 4.60 (ED_{50} 2.44 to 2.48) than when they were incubated with isoforms with pH values 4.76 to < 3.80 (ED_{50} 2.70 to 2.89). Likewise, hFSH isoform pools with elution pH values 6.60 to 4.60 (pools II–IV) were more potent in stimulating estrogen production than the more acidic hFSH pools [biological to immunological (*B/I*) FSH ratios: 1.24 ± 0.05 , 0.90 ± 0.04 , 0.76 ± 0.02 , 0.62 ± 0.04 , 0.37 ± 0.04 and 0.49 ± 0.03 for isoform pools II to VII, respectively]. Similar effects were observed when induction of *t*PA enzyme activity by cells exposed to these isoform pools for 72 h was measured as the biological end point (Fig. 1). The effect of hFSH isoform pools II to VII on $P450_{arom}$ and *t*PA mRNA expression is shown in Fig. 2. Less acidic isoforms (pools II–IV, pH 6.60 to 4.60) exhibited a greater capacity to induce expression of both mRNAs than their more acidic counterparts. In contrast to these observations, α -inh mRNA production was greater in incubations with the more acidic/sialylated isoforms

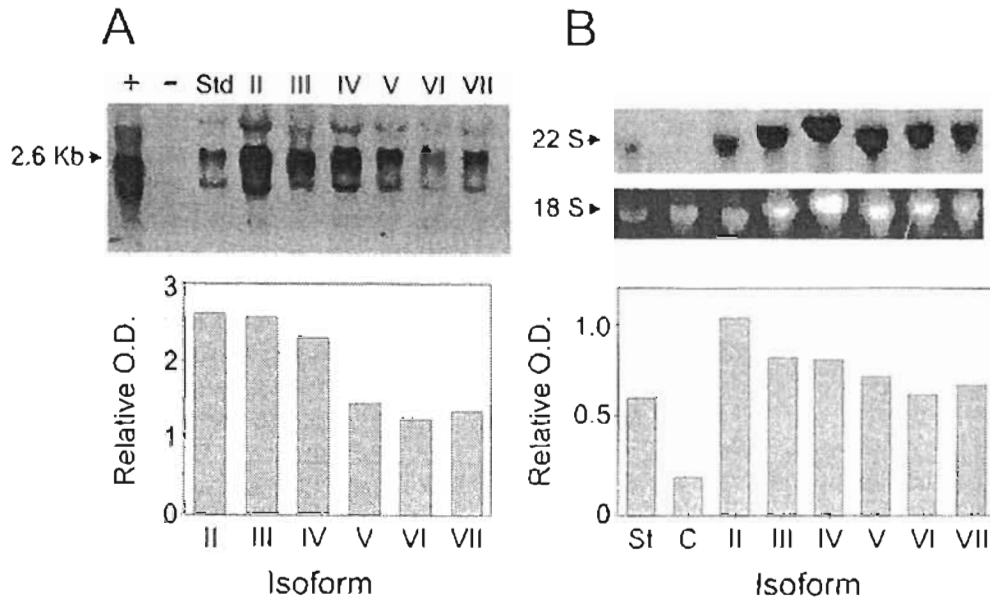


Fig. 2. Cytochrome P450_{arom} and tissue-type plasminogen activator mRNA expression in cells exposed to 2.8 ng of FSH isoforms II–VII for 48 h (P450_{arom}) or 12 h (tPA). [A] Upper panel: Representative Northern blot hybridization analysis of P450_{arom} mRNA production in response to FSH exposure. + : positive control (ovarian RNA from 18-day pregnant rats); – = negative control (granulosa cells RNA cultured in the absence of FSH); Std: granulosa cells exposed to LER-907. Lower panel: Relative O.D. (2.6 Kb P450_{arom} mRNA/18 S rRNA O.D. ratio) of the autoradiograph shown above. [B] Upper panel: Representative Northern blot hybridization analysis of tPA mRNA expressed after FSH exposure. Middle panel: The corresponding 18 S rRNA. Lower panel: Relative O.D. (tPA mRNA/18 S rRNA O.D. ratio) of the tPA mRNA and 18S rRNA bands shown above. St: human recombinant FSH (2.8 ng/well); C: cells cultured in the absence of FSH. The results are representative of three independent experiments for each end point measured. Similar results were obtained employing semiquantitative RT-PCR analysis. (Adapted from Timossi et al. (2000) with permission from ©The Society for Endocrinology, UK).

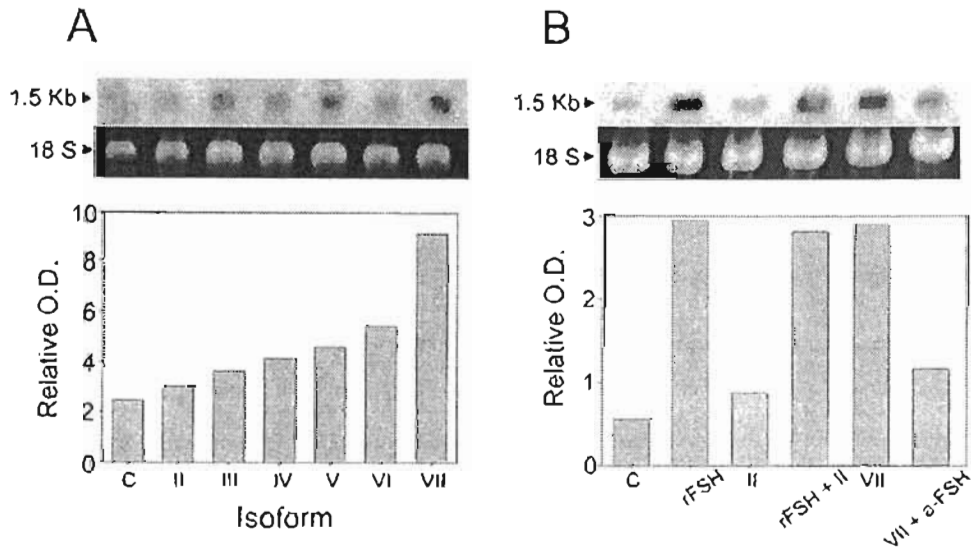


Fig. 3. α-inhibin subunit mRNA expression in granulosa cells exposed to FSH isoforms II–VII, recombinant hFSH (rFSH) or FSH isoforms II and VII in the presence or absence of either rFSH or hFSH antiserum (α-FSH: 1:10 000 dilution) during 24 h. [A] Upper panel: Representative Northern blot hybridization analysis of α-inhibin mRNA production induced by cell exposure to FSH isoforms II to VII (2.8 ng/culture well). Middle panel: The corresponding 18S rRNA bands. Lower panel: Relative O.D. (α-inhibin mRNA/18S rRNA O.D. ratio) of the mRNA and 18S rRNA bands shown above. Similar results were found by semiquantitative RT-PCR analysis (not shown). Results are representative of three independent experiments. C: incubations in the absence of FSH. [B] Upper panel: Representative Northern blot hybridization analysis of α-inhibin mRNA production induced by cell exposure to rFSH or FSH isoforms II and VII with or without rFSH (2.8 ng/culture well) or human FSH antiserum. Middle panel: The corresponding 18S rRNA bands. Lower panel: Relative O.D. (α-inhibin mRNA/18S rRNA O.D. ratio) of the mRNA and 18S rRNA bands shown above. Similar results were found in a replicate experiment. C: incubations in the absence of FSH. (Adapted from Timossi et al. (2000) with permission from ©The Society for Endocrinology, UK).

(particularly isoform VII) than in those in which the less acidic counterparts were added (Fig. 3A). The relatively decreased production of α -inh mRNA by the less acidic isoforms was not due to their enhanced ability to stimulate androgen aromatization and estrogen production since addition of the potent estradiol receptor antagonist ICI 182, 780 or omission of the aromatization substrate (androstenedione) in the incubations did not significantly modify the isoforms-induced α -inh mRNA production by cultured rat granulosa cells (not shown). Furthermore, the addition of recombinant hFSH or anti-hFSH to granulosa cells cultured in the presence of isoforms II and VII either increased or decreased, respectively, α -inh mRNA production stimulated by these isoforms, thus ruling out the possibility that the differential effect of the FSH isoforms on α -inh mRNA production was dependent of non-FSH factors that may unspecifically inhibit or stimulate the production of this particular mRNA (Fig. 3B).

Interestingly, in contrast to isoform pools II-VII which behaved as FSH agonists in this heterologous primary cell culture system, the least acidic isoform (isoform I, pI > 7.10) exhibited antagonistic effects on FSH action. Although this particular isoform was able to partially potentiate the effects of recombinant FSH on cAMP production (Fig. 4A, inset), it profoundly inhibited FSH-induced aromatase (Fig. 4A) and tPA enzyme

activity (Fig. 4B) as well as P450_{arom} and tPA mRNA expression (not shown) (Timossi et al., 1998a, 2000).

The biochemical mechanisms subserving this variety of responses to the FSH variants are uncertain. Although differences in receptor affinity may account for the observed variations in in vitro biopotency between the various isoforms (Zambrano et al., 1999), the possibility exists that, in addition to differences in binding, particular effects of the isoforms on signal transduction and gene expression may be also related to the diverse glycosylation-dependent abilities of the glycoforms to interact with the receptor and allow preferential degrees of activation/inhibition of one or more signal transduction pathways (G_s - and/or G_i -mediated). In fact, we have shown that in a homologous in vitro bioassay system (which presumably expresses a unique human FSH receptor population), less acidic isoforms are more potent activators of the receptor and more effective triggers of G_s -mediated intracellular signal transduction than their more acidic counterparts, despite the absence of differences in receptor affinity (Zambrano et al., 1999). The possibility also exists that some variants may act through altered FSH receptor isoforms, some of which may exhibit dominant negative properties via preferential coupling to the G_i -mediated transducing machinery (Sairam et al., 1996). Finally, other mechanisms including cross-talk between the FSH receptor and other

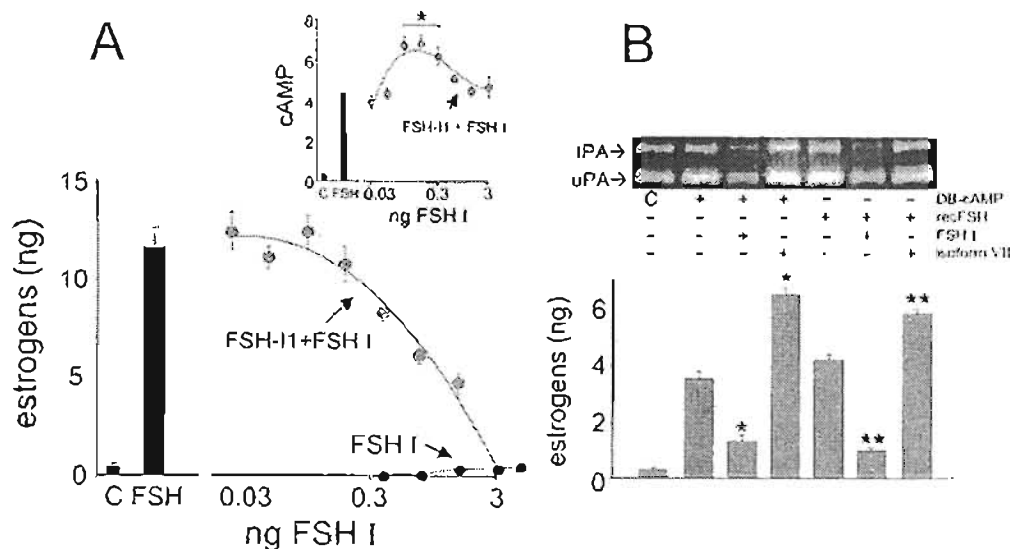


Fig. 4. Inhibitory effects of a basically charged human FSH isoform (FSH I) on FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator (tPA) enzyme activity in vitro. [A] Changes in concentrations of estrogens released into the culture medium of granulosa cells cultured during 48 h in the presence of increasing doses of isoform FSH I (solid circles), a highly purified pituitary hFSH standard (FSH-II, National Hormone and Pituitary Program, USA) (FSH, ED₅₀ dose, black bar) and FSH-II plus increasing concentrations of FSH I (grey circles). Inset: Cyclic AMP (cAMP) production by FSH-II (FSH, black bar) and FSH-II plus FSH I. C = control incubations in the absence of hormones. **P* < 0.01 versus the lower and higher FSH I doses and versus FSH alone. [B] Detection of tPA enzyme activity (upper panel) and total estrogens (lower panel) in conditioned media from granulosa cells exposed for 48 h to human recombinant FSH (recFSH, ED₅₀ dose) produced by CHO cells and dibutyryl cAMP (DB-cAMP) in the presence or absence of a basically charged human FSH isoform (FSH I) or a highly sialylated isoform (Isoform VII). The location of tPA (M_r ~ 70000) and high molecular weight (M_r ~ 50000) urokinase-type plasminogen activator (uPA) activities are noted. C = control incubations with no hormones or DB-cAMP added. **P* < 0.01 versus DB-cAMP; ***P* < 0.01 versus recFSH in the absence of FSH I or Isoform VII and p.N.S. recFSH plus FSH I versus DB-cAMP plus FSH I and recFSH plus Isoform VII versus DB-cAMP plus Isoform VII. (Adapted from Ulloa-Aguirre et al. (1999) with permission from Karger AG, Basel and Humana Press, USA).

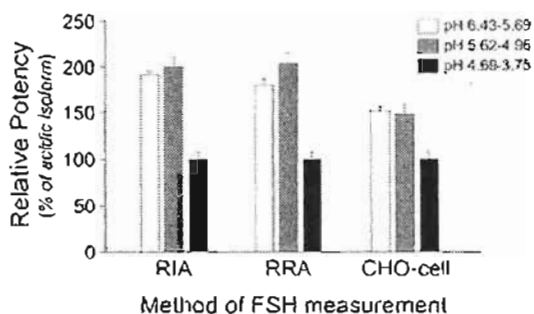


Fig. 5. Effect of different FSH isoforms on resumption of meiosis in mouse cumulus enclosed oocytes in vitro. Isoforms A, I and IV (see Fig. 6 for details) were used in the mouse oocyte assay (Yding Andersen et al., 1999) at amounts determined by three different assays {radioimmunoassay (RIA), radioreceptor assay (RRA) and a Chinese hamster ovary (CHO) cell bioassay (CHO-cell). In the CHO-cell, FSH binds and activates the human FSH receptor expressed by the CHO cells causing a dose-dependent accumulation of cAMP. For each isoform, serial dilutions were tested in the mouse oocyte assay and the concentration of FSH that caused 50% of the cumulus enclosed oocytes to resume meiosis within the culture period was determined (i.e. ED₅₀ GVBD value) (Yding Andersen et al., 1999). The potency of each isoform fraction relative to the more acidic isoform (isoform IV), which was defined as having an activity of 100%, is shown. Statistical analysis of the actual mean ED₅₀ GVBD-values showed that for each of the three FSH monitoring systems, the less- and mid-acidic isoforms were significantly higher than the acidic isoform ($P < 0.01$), and that less- (isoform A) and mid- (isoform I) acidic isoforms were similar. Each bar represents the Mean \pm S.D. of at least three independent experiments for each isoform.

receptor systems, cAMP-dependent autoregulatory mechanisms and activation of alternate signaling pathways (Maizels et al., 1998; Gonzalez-Robayna et al., 2000) may also potentially explain the divergent effects on α -inh mRNA expression exhibited by isoforms II to VII and the antagonistic effects of the least acidic isoform upon several FSH-induced effects. It will be of great interest to determine the oligosaccharide structure associated with this particular glycoform, and whether the glycoform may be present in the circulation in specific physiological and/or pathological circumstances, as suggested by studies on GnRH antagonist-treated hypogonadal women (Dahl et al., 1988). The structural features may unmask previously unappreciated mechanisms of signal transduction modulated by oligosaccharide heterogeneity. Since this isoform does not block adenylyl cyclase activation (Fig. 4, inset), it is unlikely to couple preferentially to the inhibitory subunit G_{i α} . However, its ability to block cAMP effects (Fig. 4B) may provide additional evidence that alternate signaling pathways for FSH exist and that cAMP enables or acts in concert with, but is insufficient for the activation of these pathways. It appears that glycoforms of glycoprotein hormones may have variable signal transduction capacities as exemplified not only by the studies described above but also by other studies employing alternative glycosylation variants of human TSH (Medri et al., 1994; Schaaf et al., 1997).

Since in the majority of the in vitro studies described above we used an immunoassay method to determine the mass of the hFSH isoforms used in the experiments performed, it may be argued that the higher activity of the less acidic isoforms may be due to underestimation by our polyclonal antibody-based radioimmunoassay of the amount at which the granulosa cells were actually exposed. However, several lines of evidence indicate that this was not the case: (1) We and others have shown that the potential discrepancies among different (polyclonal, monoclonal, and polyclonal/monoclonal) quantitative immunoassays are minor and do not significantly alter the calculated in vitro bioactivity/immunoactivity ratio of the human FSH glycoforms (Zambrano et al. 1996; Oliver et al., 1999), (2) As discussed below, studies on purified hFSH charge isoforms, in which the amount of each isoform tested for in vitro bioactivity was assessed by methods other than immunoassays, have also indicated that less acidic isoforms are more biologically active than their more acidic counterparts (Vitt et al., 1998), and (3) It has been shown that desialylation of rat and human LH isoforms increase LH in vitro bioactivity and radioreceptor activity (Hattori et al., 1985; Burgon et al., 1997) without significantly affecting immunoactivity (Burgon et al., 1997). More recently, we have observed that less acidic hFSH isoforms induced resumption of meiosis significantly more efficiently than acidic isoforms, regardless of the method employed to determine the concentration of the isoforms tested (radioimmunoassay, radioreceptor assay and in-vitro bioassay) (Fig. 5).

The results derived from these studies on naturally occurring FSH glycoforms are in agreement with those that have assessed the in vitro bioactivity of purified variants of recombinant hFSH produced by either Chinese hamster ovary (CHO) cells (Cerpa-Poljak et al., 1993; Lambert et al., 1995; De Leeuw et al., 1996) or human embryonic kidney 293 cells (Flack et al., 1994). In this regard, the observations by Vitt and colleagues (1998) on murine follicle development in vitro under the effect of recombinant hFSH variants are particularly interesting; these investigators showed that the least acidic isoforms (pI 5.0–5.6) of recombinant hFSH produced by CHO cells induced the fastest preantral growth and the largest antral follicles at a lower dose than mid (pI 4.5–5.0) and more acidic (4.6–3.6) isoforms, and that both the less and mid acidic isoforms had more impact on estradiol production and antral formation than the more acidic variant.

2.2. In vivo studies

As a consequence of their carbohydrate-based structural differences, hFSH isoforms differ in their ability to survive in the circulation. As expected, more acidic/

sialylated isoforms exhibit longer plasma half-lives than their less acidic counterparts (Wide, 1986; Galway et al., 1990; Ulloa-Aguirre et al., 1992). The impact that

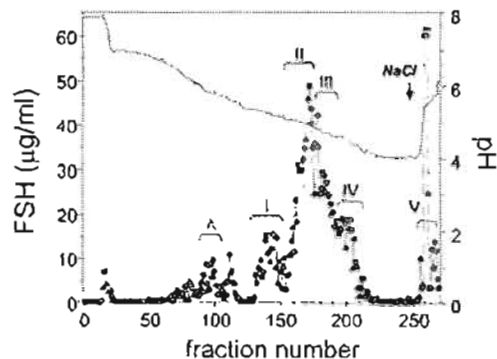


Fig. 6. Representative profile of pH distribution of immunoreactive follicle-stimulating hormone (FSH) after chromatofocusing of an anterior pituitary glycoprotein extract. The brackets indicate the column fractions pooled to conform the different isoform concentrates (A, pH 6.43–5.69; I, pH 5.62–4.96; II, pH 5.31–4.63; III, pH 5.08–4.27; IV, pH 4.69–3.75 and V, pH <3.75) used in the experiments shown in Figs. 5 and 8. Column dimensions: 50 × 1 cm. (Adapted from Yding Andersen et al. (1999) with permission from Oxford University Press).

Table 1
Biological to Immunological (B/I) ratio of the hFSH charge isoforms I to V shown in Fig. 6

Isoform	B/I ratio
I	1.05 ± 0.16
II	1.36 ± 0.26
III	1.14 ± 0.11
IV	0.73 ± 0.11 ^a
V	0.56 ± 0.08 ^a

^a $P < 0.01$ versus I, II and III.

Values are means ± S.E.M. of 3 to 5 observations

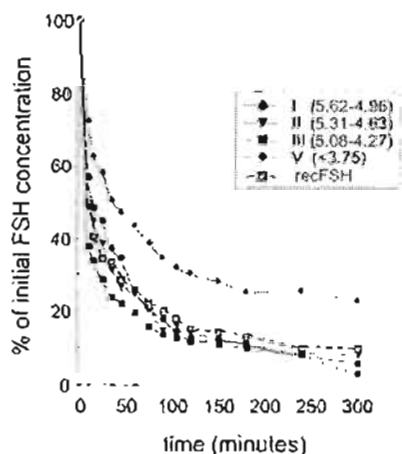


Fig. 7. Plasma disappearance curves of FSH present in isoforms I, II, III and V (Fig. 6) and in human recombinant FSH (rechFSH). Values in parenthesis indicate the elution pH value of each FSH isoform. The plasma disappearance of isoform IV was not assessed due to insufficient FSH material.

the varying degrees in sialylation of circulating FSH may have on its net plasma half-life is exemplified by the study from Zambrano et al. (1995), which showed that the increased release of less sialylated isoforms occurring during the preovulatory phase of the human menstrual cycle correlated with a significant reduction in the plasma half-life of FSH secreted during this particular cycle phase.

Studies employing human pituitary FSH isoforms with variable degrees of sialylation as well as different in vivo biological end points, have suggested that factors other than the metabolic clearance rate of the gonadotropin molecule may also influence the net in vivo biological activity of the hormone. On one side, it has been observed that the in vivo increase in ovarian weight conditioned by the repeated administration of hFSH isoforms over several days, is closely related to the metabolic clearance rate and hence, sialic acid content of each variant, with the long-lived, more sialylated isoforms exhibiting the highest bioactivity (Wide and Hobson, 1986; Mulders et al., 1997). However, when an acute effect (such as induction of tissue-type plasminogen activator enzyme activity and mRNA expression) was examined, less sialylated, shorter-lived FSH molecules exhibited a similar effect than more sialylated analogs (Timossi et al., 1998b). This observation indicated that the enhanced capability of the less acidic variants to induce a biological effect at the target cell level (see above), may effectively compensate for the drawback imposed by their relatively shorter plasma half-life. In fact, data derived from a recent pharmacokinetics study that employed an acute bioassay procedure, suggest that the intrinsic differences in in vivo bioactivities between the LH glycoforms may be primarily dependent on the initial interaction of the hormone with the target cell rather than on differences in their metabolic clearance rate (Burgon et al., 1996).

In a more recent study, we have analyzed the effects of hFSH isoforms on granulosa cell proliferation in immature hypophysectomized rats. Intrapituitary hFSH charge isoforms (I to V in Fig. 6, elution pH values 5.30 to <3.75) were fractionated by chromatofocusing anterior pituitary glycoprotein extracts and their LH content was removed by immunextraction. The in vitro B/I ratio of the isoforms employed [as disclosed by the rat granulosa cell aromatization bioassay (Jia and Hsueh, 1985)] is shown in Table 1 and their corresponding plasma disappearance curve is presented in Fig. 7. The B/I ratio of isoforms I to III was higher than those of isoforms IV and V. By contrast, the plasma clearance rate of the more acidic isoform was significantly lower than that of the less acidic analogs (isoform I, 0.195 ± 0.06 ; isoform II, 0.117 ± 0.03 ; isoform III, 0.113 ± 0.02 and isoform V, 0.061 ± 0.01 ml/min; $P < 0.05$ isoform V vs. isoforms I, II and III, and

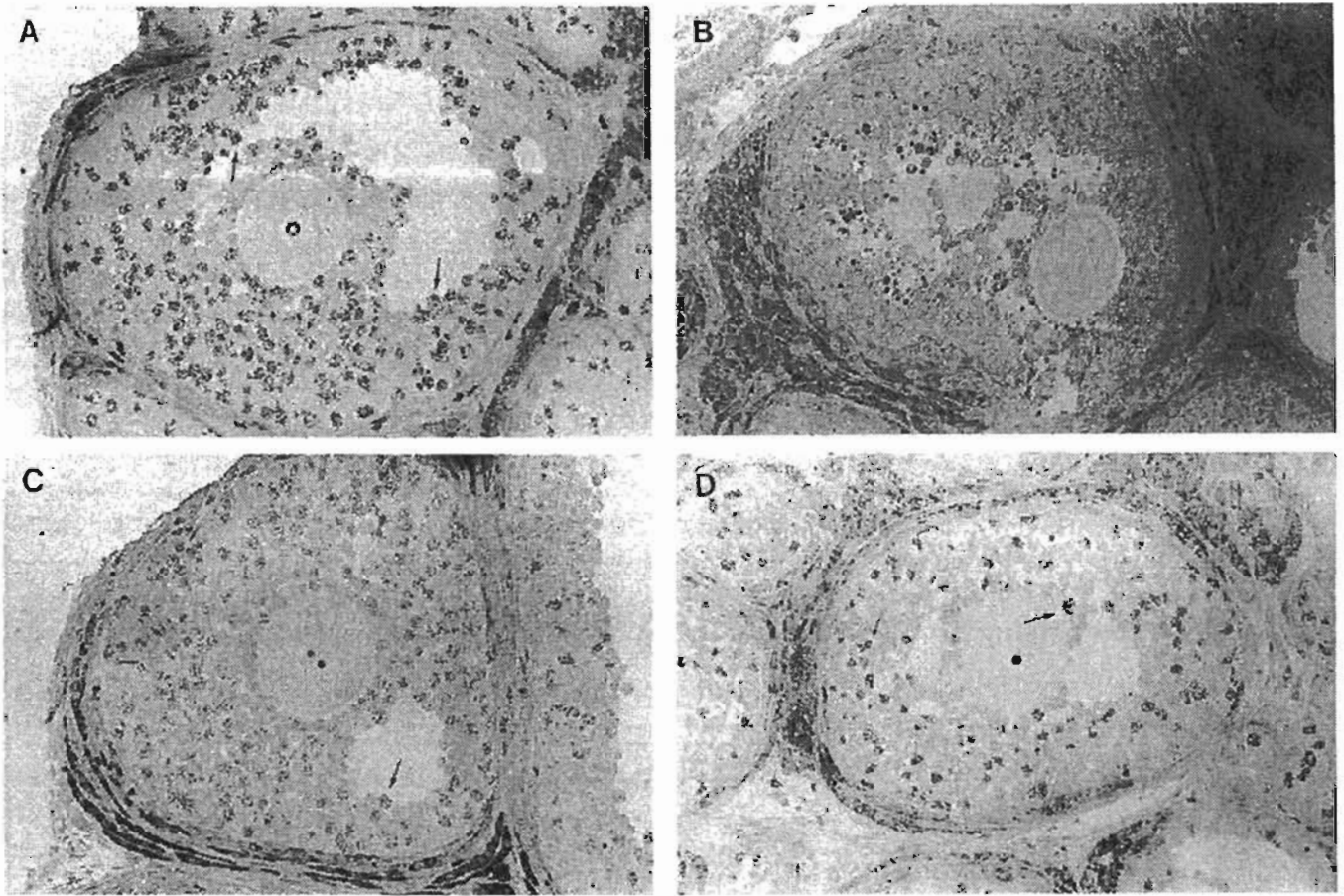


Fig. 8. Representative microphotographies of antral follicles from ovaries of immature hypophysectomized rats killed after 18 h (A and B) or 12 h (C and D) of hFSH or saline administration. Immature female rats were hypophysectomized and 6 h later they received a single s.c. injection [at doses equivalent to 8 IU human recombinant FSH as assessed by an FSH bioassay procedure (Jia and Hsueh, 1985)] of one FSH isoform, recombinant hFSH or vehicle (saline). Five, 11 or 17 h post-injection, rats were treated with [^3H]-thymidine ([^3H T; 2.5 $\mu\text{Ci/g}$ b.w.) and killed 1 h later. Ovaries were dissected and processed for histological and autoradiographic examination. Every tenth section from each ovary was examined (18 total sections examined/ovary) and the number of [^3H T]-labelled granulosa cells was recorded by 2 independent investigators. Only follicles showing both oocyte and nucleolus were considered. A: Healthy follicle after treatment with hFSH isoform II (see Fig. 6); B: Atretic follicle after treatment with saline; C: Healthy follicle after treatment with isoform I and D: after treatment with isoform V (magnification $\times 20$). Arrows indicate some of the [^3H T]-labelled cells.

isoform I vs. III). The effects of isoform treatment on granulosa cell proliferation in preantral, early antral and antral follicles measuring 50–199 μm (excluding primordial follicles) and 200–240 μm in largest diameter, are shown in Fig. 8 and Fig. 9. Less acidic isoforms were equally or even more efficient than the more acidic counterparts in maintaining granulosa cell proliferation immediately after hypophysectomy. The effect of the less acidic isoforms (particularly isoform I) was more pronounced on preantral follicles measuring 50–199 μm in diameter, in which the rate of cell proliferation under the stimulus of these shorter-lived, less acidic/sialylated isoforms was higher than that observed in follicles stimulated with isoforms IV and/or V at all times examined (Fig. 9). These results indicate that additional factors, such as receptor-binding affinity and capability of the ligand to activate its receptor and efficiently trigger intracellular signaling [an effect that is highly dependent on the oligosaccharide structures (Ulloa-

Aguirre et al., 1999)], seem to be also important in determining the net *in vivo* effects of a given FSH variant.

3. Summary and conclusions

We have herein presented a series of data showing that the naturally occurring variants of hFSH may exert differential and even opposite effects at the target cell level. In addition, we have also shown how the less acidic, short-lived hFSH variants may exhibit significant effects *in vivo* when more physiological and specific end points (other than changes in ovarian weight) are monitored as the response parameters. These observations are important from the physiological point of view, particularly considering that a number of the FSH isoforms (including the less sialylated variants) identified in pituitary extracts may be detected in circu-

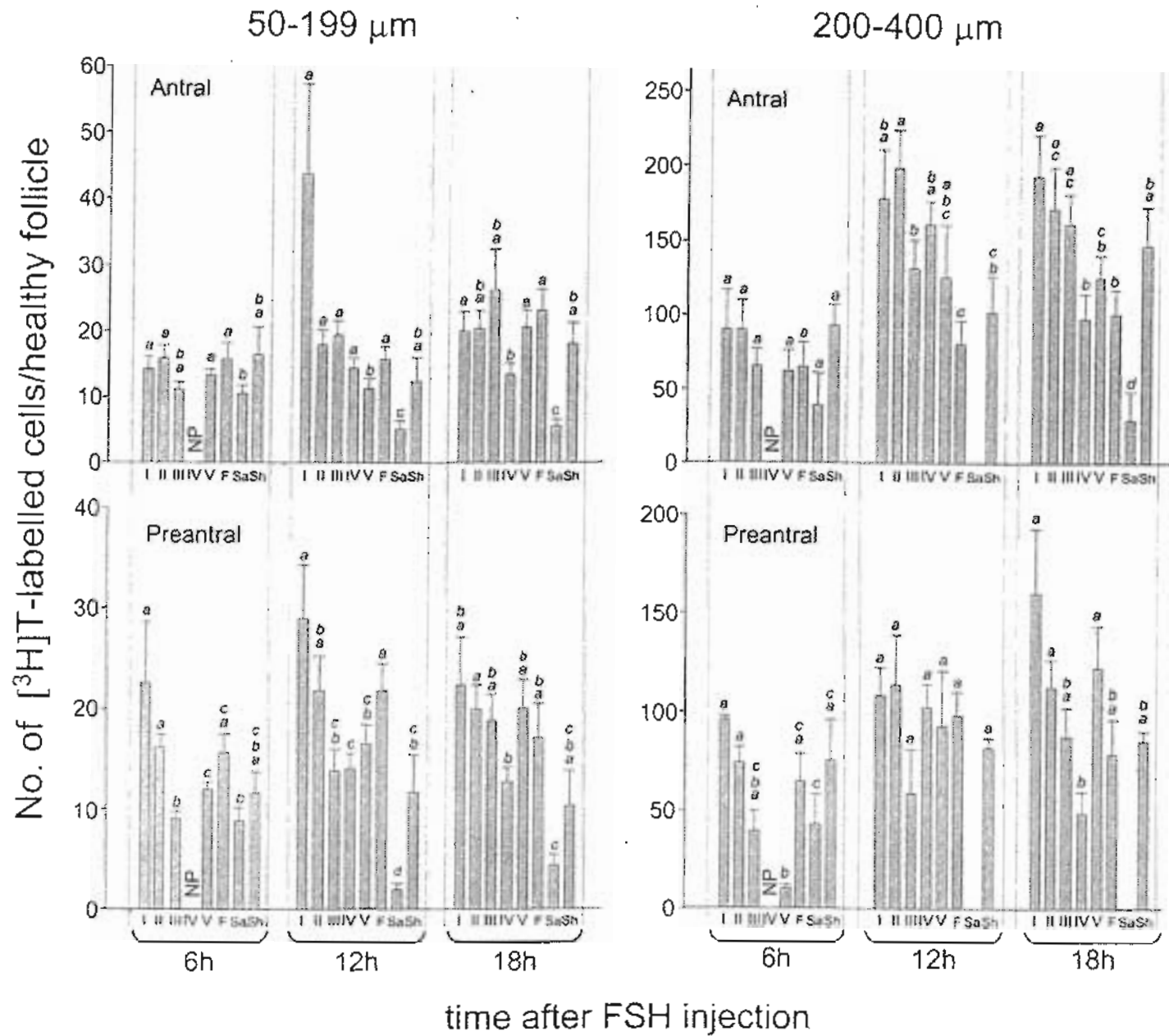


Fig. 9. The effect of isoforms I to V shown in Fig. 6, recombinant hFSH (F) and saline (Sa) administration in proliferation of 50–199 μm (excluding primordial follicles) and 200–400 μm preantral, early antral and antral follicles granulosa cells. The bars represent the Mean \pm S.E.M. of eight ovaries per treatment group. No healthy preantral or antral 200–400 follicles, or preantral 200–400 μm follicles were observed in animals killed 12 or 18 h after vehicle administration, respectively. Different letters above bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between the treatment groups within the same period of time (as delimited by the light vertical lines). Sh = sham-operated animals; NP = not performed due to insufficient FSH material.

lation and that the FSH receptor only requires of nanomolar concentrations of the ligand to become activated. Thus, even a brief exposure of the target cell to short-lived but highly potent glycoforms may be sufficient to incite significant biological responses.

Many aspects related with the mechanism(s) of action of the FSH glycosylation variants at the cellular level still remain to be investigated. Among these are included the characterization of the conformational changes in the hormone receptor complex that may result from naturally occurring variations in the oligosaccharide structure of the ligand, the identification of alternate intracellular signalling pathways that may be potentially involved in some of the intracellular effects provoked by the glycosylation variants, and to explore the interesting hypothesis that some of the gonadotropin isoforms may act through interactions with variant gonadotropin receptor populations (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Sairam et al., 1996).

Acknowledgements

The studies performed in the laboratories of the authors have been supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (28589-N and 0004P-N9505; to A.U.-A.) and from the Danish Medical Research Council (9400824, 9502022 and 9602272; to C.Y.A.).

References

- Baenziger, J.U., Green, E.D., 1988. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta* 947, 287–306.
- Burgon, P.G., Stanton, P.G., Robertson, D.M., 1996. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 137, 4827–4836.
- Burgon, P.G., Stanton, P.G., Petterson, K., Robertson, D.M., 1997. Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity in vitro, radioreceptor activity and immunoreactivity. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 501–508.
- Cerpa-Poljak, A., Bishop, L.A., Hort, Y.J., Chin, C.K.H., DeKroon, R., Mahler, S.M., Smith, G.M., Stuart, M.C., Schofield, P.R., 1993. Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology* 132, 351–356.
- Dahl, K.D., Bicsak, T., Hsueh, A.J.W., 1988. Naturally occurring anti-hormones: secretion of FSH antagonists by women treated with a GnRH analog. *Science* 239, 72–74.
- De Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G., Rombout, F., Damm, J., Kloosterboer, L., 1996. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Mol. Hum. Reprod.* 2, 361–369.
- Dias, J.A., Lindau-Shepard, B., Hauer, C., Auger, I., 1998. Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol. Reprod.* 58, 1331–1346.
- Flack, M.R., Bennet, A.P., Froehlich, J., Anasti, J.N., Nisula, B., 1994. Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 756–760.
- Galway, A.B., Hsueh, A.J.W., Keene, J.L., Yamoto, M., Fauser, B.C.J.M., Boime, I., 1990. 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.
- Gonzalez-Robayna, J.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., Richards, J.S., 2000. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 1283–1300.
- Hattori, M., Ozawa, K., Wakabayashi, K., 1985. Sialic acid moiety is responsible for the charge heterogeneity and the biological potency of rat lutropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 501–508.
- Jia, X.C., Hsueh, A.J.W., 1985. Sensitive in vitro bioassay for the measurement of serum follicle-stimulating hormone. *Neuroendocrinol.* 41, 445–448.
- Lambert, A., Rodgers, M., Mitchell, R., Wood, A.M., Wardle, C., Hilton, B., Robertson, W.R., 1995. In-vitro biopotency and glycoform distribution of recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489), Metrodin and Metrodin-HP. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 1928–1935.
- Maizels, E.T., Cottom, J., Jones, J.C.R., Hunzicker-Dunn, M., 1998. Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138, 3353–3356.
- Medri, G., Sergi, I., Papandreou, M.J., Beck-Peccoz, P., Verrier, B., Ronin, C., 1994. Dual activity of human pituitary thyrotrophin isoforms on thyroid cell growth. *J. Mol. Endocrinol.* 13, 187–198.
- Mulders, J.W.M., Derksen, M., Swolfs, A., Maris, F., 1997. Prediction of the in vivo biological activity of human recombinant follicle-stimulating hormone using quantitative isoelectric focusing. *Biologicals* 25, 269–281.
- Oliver, R.L., Kane, J.W., Waite, A., Mulders, J.W.M., Robertson, W.R., 1999. Do immunoassays differentially detect different acidity glycoforms of FSH? *Clin. Endocrinol.* 51, 681–686.
- Sairam, M.R., Jiang, L.G., Yarney, T.A., Khan, H., 1996. Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of the receptor which inhibits hormone action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 717–722.
- Schaaf, L., Leiprecht, A., Saji, M., Hübner, U., Usadel, K.H., Kohn, L.D., 1997. Glycosylation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 132, 185–194.
- Stanton, P.G., Burgon, P.G., Hearn, M.T.W., Robertson, D.M., 1996. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 125, 133–141.
- Timossi, C.M., Barrios de Tomasi, J., Zambrano, E., González, R., Ulloa-Aguirre, A., 1998a. A naturally occurring basically charged human follicle-stimulating hormone (FSH) variant inhibits FSH-induced androgen aromatization and tissue-type plasminogen activator enzyme activity in vitro. *Neuroendocrinol.* 67, 153–163.
- Timossi, C., Damián-Matsumura, P., Domínguez-Casalá, A., Ulloa-Aguirre, A., 1998b. A less acidic human follicle-stimulating hormone preparation induces tissue-type plasminogen activator enzyme activity earlier than a predominantly acidic analogue in phenobarbital-blocked pro-oestrous rats. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1032–1038.
- Timossi, C.M., Barrios-de-Tomasi, J., González-Suárez, R., Arranz, M.C., Padmanabhan, V., Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A., 2000. Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J. Endocrinol.* 165, 193–205.

- Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P., Jiménez, M., Zambrano, E., Díaz-Sánchez, V., 1992. Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum. Reprod.* 7, 23–30.
- Ulloa-Aguirre, A., Rees Midgley, A. Jr, Beitins, I.A., Padmanabhan, V., 1995. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr. Rev.* 16, 765–787.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damián-Matsumura, P., Dias, J.A., 1999. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 11, 205–215.
- Vitt, U.A., Kloosterboer, H.J., Rose, U.M., Mulders, J.W.M., Kiesel, P.S., Bete, S., Nayudu, P.L., 1998. Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biol. Reprod.* 59, 854–861.
- Wide, L., 1986. The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 112, 336–344.
- Wide, L., Hobson, B.M., 1986. 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.
- Yding Andersen, C., Leonardsen, L., Ulloa-Aguirre, A., Barrios-De-Tomasi, J., Moore, L., Byskov, A.G., 1999. FSH-induced resumption of meiosis in mouse oocytes: effect of different isoforms. *Mol. Hum. Reprod.* 5, 726–731.
- Zambrano, E., Barrios-de-Tomasi, J., Cárdenas, M., Ulloa-Aguirre, A., 1996. Studies on the relative in-vitro biological potency of the naturally-occurring isoforms of intrapituitary follicle stimulating hormone. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 563–571.
- Zambrano, E., Olivares, A., Mendez, J.P., Guerrero, L., Diaz-Cueto, L., Veldhuis, J.D., Ulloa-Aguirre, A., 1995. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1647–1656.
- Zambrano, E., Zariñán, T., Olivares, A., Barrios-de-Tomasi, J., Ulloa-Aguirre, A., 1999. Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems. Implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine* 10, 113–121.