

Tesis de Posgrado

Caracterización de la hormona folículo-estimulante humana : Relación estructura-función

Creus, Silvina Florencia

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Creus, Silvina Florencia. (1999). Caracterización de la hormona folículo-estimulante humana : Relación estructura-función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3209_Creus.pdf

Cita tipo Chicago:

Creus, Silvina Florencia. "Caracterización de la hormona folículo-estimulante humana : Relación estructura-función". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3209_Creus.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CARACTERIZACION DE LA HORMONA FOLICULO-ESTIMULANTE HUMANA:
RELACION ESTRUCTURA-FUNCION**

Autora: **SILVINA FLORENCIA CREUS**

Directora: **STELLA CAMPO**

Co-Directora: **SELVA B. CIGORRAGA**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTORA DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

CENTRO DE INVESTIGACIONES ENDOCRINOLOGICAS

1999

8320

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**CHARACTERIZATION OF THE HUMAN FOLLICLE-STIMULATING HORMONE:
STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP**

Author: **SILVINA FLORENCIA CREUS**

Director: **STELLA CAMPO**

Co-Director: **SELVA B. CIGORRAGA**

THESIS FOR PURSUING A Ph.D. DEGREE
FROM THE UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

CENTRO DE INVESTIGACIONES ENDOCRINOLOGICAS

1999

A mi familia,

a mis padres y mis hermanos

*a Fernando,
y a nuestros hijos Florencia y Manuel*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Stella Campo por haberme guiado en mis primeros pasos en la investigación científica y por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo de Tesis bajo su dirección.

A la Dra. Selva B. Cigorruga por su valioso asesoramiento y colaboración durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Barontini y el Dr. Bergadá por su apoyo constante, y por brindarme el marco institucional adecuado para desarrollar el presente trabajo de tesis.

Al Dr. Héctor Chemes por sus aportes en la discusión de los resultados y la revisión de este trabajo de Tesis.

A la Dra. Silvia Gottlieb, por su permanente disposición en la evaluación clínica de los niños y su colaboración en la obtención de las muestras.

Al Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre, del Instituto Nacional de la Nutrición de Méjico, por la donación del material hipofisario humano. Agradezco asimismo, el haberme brindado la posibilidad de conocer y trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Eliana Pellizzari, por su cooperación constante en la realización de los bioensayos de FSH.

A todos los integrantes del Centro de Investigaciones Endocrinológicas, por su colaboración en el trabajo diario.

Finalmente, quiero agradecer a todas mis compañeras y amigas del Centro de Investigaciones Endocrinológicas, con quienes he compartido tantos seminarios y charlas, los cuales han contribuido a mi formación científica y a la realización de este trabajo de tesis. Agradezco, además y sobre todo, el haber trabajado diariamente a su lado.

RESUMEN

La hormona folículo estimulante humana, producida y secretada por la hipófisis anterior, está estrechamente relacionada con la regulación y el mantenimiento de procesos reproductivos esenciales tales como el desarrollo y maduración de los folículos ováricos y la gametogénesis testicular.

Esta hormona consiste en un heterodímero formado por dos subunidades, cada una de las cuales tiene unidas al polipéptido dos cadenas de oligosacáridos. Estas cadenas de carbohidratos, si bien comparten el mismo núcleo de azúcares formado por un pentasacárido en la porción interna de la cadena, difieren en la porción externa de la misma, variando en complejidad, grado de ramificación y en el contenido de residuos terminales de ácido siálico. Las variaciones en la estructura de la cadena carbohidratada, dan lugar a la aparición de una familia heterogénea de isoformas con diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Las isoformas presentan diferencias en: sus puntos isoeléctricos, la afinidad de unión a su receptor específico y la vida media en circulación. La abundancia relativa de cada una de estas isohormonas varía con el sexo y con las condiciones fisiológicas del donante. En los estudios realizados hasta el presente, el contenido de ácido siálico había sido considerado como el principal determinante de la heterogeneidad molecular de la hormona.

El propósito de esta Tesis fue analizar el polimorfismo de la FSH hipofisaria humana y la FSH circulante en diferentes condiciones fisiológicas: fase folicular de ciclos menstruales normales, postmenopausia y pubertad masculina. Este estudio fue especialmente diseñado para determinar los efectos producidos por el entorno hormonal sobre las características moleculares y biológicas de esta gonadotrofina.

Las isoformas de FSH hipofisaria fueron aisladas, mediante cromatoenfoco, de acuerdo al contenido de ácido siálico, residuo terminal de las cadenas de oligosacáridos. Posteriormente se analizó la distribución de las diferentes isoformas de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas de carbohidratos por cromatografía seriada en lectinas. Se relacionó la estructura interna de las cadenas carbohidratadas de las diferentes isoformas con su capacidad de inducir una respuesta biológica a nivel de la célula blanco. Esta respuesta biológica fue evaluada utilizando un bioensayo *in vitro*.

Los resultados obtenidos demuestran que en la regulación de la biopotencia de la hormona participa no sólo el azúcar terminal, sino también el tipo de estructura de cadena carbohidratada interna al ácido siálico. Los estudios realizados en sueros obtenidos en

distintas condiciones fisiológicas demuestran que el entorno hormonal modifica las características estructurales de la molécula, regulando así su biopotencia y su tiempo de permanencia en circulación. Se postula que cada una de las variantes moleculares de esta hormona sería responsable de la inducción diferencial de una determinada respuesta biológica.

ABSTRACT

FSH is produced and secreted by the anterior pituitary gland. It is closely involved in the regulation and maintenance of essential reproductive processes, as follicular development and testicular gametogenesis.

This hormone is a heterodimeric protein composed of two different subunits; each subunit bears two oligosaccharide chains attached to its polypeptide backbone. Although the oligosaccharide moieties share the same pentasaccharide core, they differ in their external carbohydrate structure, which includes completion, degree of branching and sialic acid content.

Variations in the structure of the oligosaccharide chains result in the existence of a family of isoforms with different physicochemical and biological properties. FSH isoforms differ in their isoelectric point, receptor binding activity and plasma half-life. Sex and physiological condition of the donor will determine the relative abundance of the different isoforms. Differences in sialic acid content of FSH isoforms have been considered the main determinant of hormone polymorphism since FSH heterogeneity was described.

The aim of this Thesis was to analyse the polymorphism of FSH in human pituitaries as well as that of circulating FSH in different physiological conditions: the follicular phase of normal menstrual cycles, postmenopause and male puberty. This study was particularly designed to determine the possible effects that changes in hormonal status may have upon the molecular and biological characteristics of this gonadotropin.

Chromatofocusing was used to isolate pituitary FSH isoforms according to their sialic acid content. Serial lectin chromatography was used to determine the distribution of different FSH isoforms according to the inner structure of their carbohydrate chains.

The relationship between the structure of the carbohydrate moiety of FSH isoforms and their capacity to produce a specific biological response on the target cell, was established. The biological response was determined using an *in vitro* bioassay.

The results obtained in this study demonstrate that the biopotency of the hormone is not only regulated by sialic acid content of FSH isoforms but also by the inner structure of the carbohydrate chain.

The characteristics of circulating FSH polymorphism determined in different physiological situations showed that changes in the hormonal status affect the proportion of circulating FSH isoforms bearing different structures in their carbohydrate chains, thus modulating the hormone biopotency and plasma half-life.

It can be hypothesized that modifications in FSH heterogeneity express the need to obtain specific biological responses to different physiological situations.

ABREVIATURAS

ABP.....	proteína ligadora de andrógenos
ACTH	hormona adenocorticotrófica
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
Asn.....	asparagina
B/I.....	bioactividad / inmunoreactividad
B-FSH	FSH biológica
Con-A.....	Concanavalina A
DAG.....	diacilglicerol
DE.....	desvío estándar
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
Dol.....	dolicol
DR.....	isoformas débilmente retenidas
E ₂	estradiol
EC.....	edad cronológica
FR.....	isoformas fuertemente retenidas
FSH.....	hormona folículo estimulante
Fuc.....	fucosa
Gal.....	galactosa
GH.....	hormona de crecimiento
Glc.....	glucosa
Glucósido.....	metil- α -D-glucopiranosido
GnRH.....	hormona liberadora de gonadotropinas
hCG.....	gonadotropina coriónica humana
I-FSH.....	FSH inmunológica
IP ₃	inositol trifosfato
LcH.....	lectina de lenteja
LH.....	hormona luteinizante
Man.....	manosa
Manósido.....	metil- α -D-manopiranosido
NAcGal	N-acetilgalactosamina
NAcGlc	N-acetilglucosamina

NR	isoformas no retenidas
P.....	progesterona
PA.....	pubertad avanzada
PBS.....	buffer fosfato salino
pI	punto isoeléctrico
PKC.....	proteína quinasa C
PM.....	pubertad media
PRL	prolactina
PT	pubertad temprana
R	isoformas retenidas
RER	retículo endoplásmico rugoso
RNA	ácido ribonucleico
S.A.	ácido siálico
Ser	serina
SFF.....	suero de mujeres en fase folicular
SHBG.....	hormona ligadora de esteroides sexuales
SPM.....	suero de mujeres postmenopáusicas
T	testosterona
Thr	treonina
TRH.....	factor liberador de tirotrófina
TSH	tirotrófina
UI	unidades internacionales
VP	vello pubiano
VT	volumen testicular
VT _D	volumen testículo derecho
VT _I	volumen testículo izquierdo
WGA	aglutinina de germen de trigo

INDICE

INTRODUCCION.....	1
1. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.....	1
1.1 Descripción anatómica y funcional.....	1
1.2 Regulación de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.....	2
1.2.1 Control hipotalámico de la secreción de gonadotrofinas.....	4
1.2.2 Control gonadal de la secreción de gonadotrofinas.....	5
2. Gonadotrofinas y ciclo menstrual	9
2.1 Fase folicular.....	10
2.2 Fase ovulatoria.....	11
2.3 Fase lútea.....	11
2.4 Fase menstrual.....	12
3. Gonadotrofinas y pubertad.....	12
4. Gonadotrofinas y postmenopausia.....	14
5. Estructura molecular y biosíntesis de gonadotrofinas.....	15
5.1 Procesamiento de los oligosacáridos de la glicoproteínas.....	18
5.1.1 Etapas iniciales	18
5.1.2 Incorporación de fucosa.....	21
5.1.3 Etapas finales	21
5.2 Estructura de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas.....	23
5.3 Estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH humana.....	24
6. Función de los oligosacáridos en las glicoproteínas.....	25
6.1 Función de los oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas.....	26
6.2 Significado fisiológico de la heterogeneidad de FSH.....	27
6.3 Regulación hormonal de la heterogeneidad de FSH.....	28
7. Mecanismo de acción de FSH.....	31
OBJETIVOS.....	32
MATERIALES Y METODOS	33

1. Materiales Biológicos.....	33
1.1 Extractos hipofisarios humanos	33
1.2 Sueros de mujeres postmenopáusicas.....	33
1.3 Sueros de mujeres en fase folicular.....	33
1.4 Sueros de niños en distintos estadios del desarrollo puberal.....	34
2. Drogas y reactivos.....	34
3. Métodos	36
3.1 Caracterización de isoformas de FSH hipofisaria humana.....	36
3.1.1 Cromatoenfoque.....	36
3.1.2 Tratamiento de los análogos de carga I a V obtenidos por cromatoenfoque.....	37
3.1.3 Determinación de I-FSH por radioinmunoensayo.....	37
3.1.4 Determinación de bioactividad de FSH <i>in vitro</i>	38
3.1.5 Determinación de la relación bioactividad / inmunoactividad.....	39
3.1.6 Cromatografía en Concanavalina A.....	40
3.1.7 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en Con-A.....	41
3.1.8 Cromatografía en Aglutinina de Germen de Trigo.....	41
3.1.9 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en WGA.....	43
3.1.10 Cromatografía en Lectina de Lenteja.....	43
3.1.11 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en LcH.....	44
3.2 Caracterización de isoformas de FSH circulantes en la postmenopausia y en la fase folicular de ciclos menstruales normales.....	44
3.2.1 Tratamiento de los sueros.....	44
3.2.2 Cromatografía en Concanavalina A.....	45
3.2.3 Determinación de proteínas.....	45
3.2.4 Determinación de inmunoactividad de FSH.....	45
3.2.5 Determinación de bioactividad de FSH <i>in vitro</i>	46
3.2.6 Determinación de la relación bioactividad / inmunoactividad.....	46
3.2.7 Determinación de esteroides en suero.....	46
3.3 Caracterización de isoformas de FSH circulantes en distintos estadios del desarrollo puberal en el varón	46
3.3.1 Tratamiento de los sueros.....	46
3.3.2 Isoelectroenfoque preparativo.....	47
3.3.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque.....	48

3.3.4 Determinación de proteínas.....	48
3.3.5 Determinación de I-FSH por radioinmunoensayo.....	48
3.3.6 Determinación de bioactividad de FSH <i>in vitro</i>	48
3.3.7 Determinación de la relación bioactividad / inmunoactividad.....	49
3.3.8 Cromatografía en Concanavalina A.....	49
3.3.9 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en Concanavalina A.....	49
3.3.10 Determinación de los niveles de gonadotrofinas séricas FSH y LH, en sueros de niños	49
3.3.11 Determinación de esteroides en suero.....	50
4. Análisis estadístico.....	50
5. Diseño Experimental (Esquemas).....	50
Caracterización de FSH hipofisaria (I).....	51
Caracterización de FSH hipofisaria (II).....	52
Caracterización de FSH en sueros de fase folicular y postmenopausia.....	53
Caracterización de FSH durante la pubertad masculina.....	54
RESULTADOS.....	55
1. Caracterización de isoformas de FSH hipofisaria humana.....	55
1.1 Distribución de FSH inmuno y bioactiva proveniente de extractos hipofisarios humanos de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.....	55
1.2 Distribución de los análogos de carga de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	59
1.2.1 Cromatografía en Concanavalina A.....	59
1.2.2 Cromatografía en Aglutinina de Germen de Trigo.....	72
1.2.3 Cromatografía en Lectina de Lenteja.....	74
2. Caracterización de isoformas de FSH circulantes en la postmenopausia y en la fase folicular de ciclos menstruales normales.....	78
2.1 Perfil hormonal de las mujeres estudiadas.....	78
2.2 Cromatografía de afinidad en Concanavalina A.....	79
2.2.1 Separación de isoformas de FSH circulantes en mujeres postmenopáusicas de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	79
2.2.2 Separación de isoformas de FSH circulantes en mujeres en fase folicular	

de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	82
3. Caracterización de isoformas de FSH circulantes en distintos estadios del desarrollo puberal en el varón.....	84
3.1 Pubertad temprana.....	85
3.1.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico.....	85
3.1.2 Determinación del rango de puntos isoeléctricos de la FSH circulante en la pubertad temprana por isoelectroenfoque preparativo.....	86
3.1.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	87
3.2 Pubertad media.....	88
3.2.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico.....	88
3.2.2 Determinación del rango de puntos isoeléctricos de la FSH circulante en la pubertad media por isoelectroenfoque preparativo.....	89
3.2.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	91
3.3 Pubertad avanzada.....	92
3.3.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico.....	92
3.3.2 Determinación del rango de puntos isoeléctricos de la FSH circulante en la pubertad avanzada por isoelectroenfoque preparativo.....	92
3.3.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	94
3.4 Análisis comparativo de la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas en los distintos estadios de la pubertad en varones.....	95
4. Efecto del factor liberador de gonadotrofinas sobre las isoformas de FSH circulantes en distintos estadios del desarrollo puberal en el varón.....	97
4.1 Pubertad temprana.....	98
4.1.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH.....	98
4.1.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad temprana.....	99
4.1.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	100
4.2 Pubertad media.....	101

4.2.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH.....	101
4.2.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad media.....	102
4.2.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas..	104
4.3 Pubertad avanzada.....	105
4.3.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH.....	105
4.3.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad avanzada.....	105
4.3.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas.....	107
4.4 Análisis comparativo de la distribución de análogos de carga de FSH en los distintos estadíos de la pubertad en varones.....	108
4.5 Análisis comparativo de la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas en los distintos estadíos de la pubertad en varones.....	108
DISCUSION.....	111
CONCLUSIONES.....	136
Posible significado fisiológico de la heterogeneidad de FSH.....	137
BIBLIOGRAFIA.....	140

Introducción

1. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal

El proceso reproductivo en los mamíferos es el resultado de complejas interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y las gonadas. Tanto el ciclo ovárico en la mujer como la espermatogénesis en el hombre están regulados por las hormonas gonadotróficas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). La secreción hipofisaria de LH y FSH depende de la interacción de los componentes del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

1.1 Descripción anatómica y funcional

El hipotálamo y la glándula hipófisis son estructuras anatómica y fisiológicamente muy relacionadas, constituyendo una unidad funcional que ejerce el control sobre la función gonadal y también sobre la actividad de otras glándulas endocrinas (Figura 1).

El principal producto de secreción del hipotálamo relacionado con la reproducción es el factor liberador de gonadotrofinas, GnRH. Este factor, al ser secretado a los vasos del sistema porta hipotálamo-hipofisario que establecen la comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis, estimula la síntesis y secreción de LH y FSH (Schally, 1978).

Este decapeptido es sintetizado por las neuronas secretoras de GnRH, las cuales migran durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, desde la pared media de la placa olfatoria hacia distintas regiones hipotalámicas (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989). Al alcanzar su ubicación definitiva, estas células no constituyen una estructura claramente definida integrada por neuronas adyacentes y fuertemente conectadas, sin embargo, operan de manera sincronizada. Esta red de neuronas acopladas funcionalmente constituye el denominado *generador de pulsos* de GnRH.

Los estudios realizados en primates por Knobil y colaboradores (Knobil, 1980) fueron decisivos para demostrar que el GnRH es secretado a la circulación portal de manera pulsátil y que esta actividad rítmica está localizada en el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal. La pulsatilidad del GnRH produce la liberación episódica de gonadotrofinas hipofisarias que ya había sido descripta por Midgley y Jaffe (1971) en el ciclo menstrual de la mujer y por Santen y Bardin (1973) en el hombre.

La hipófisis es una pequeña glándula situada en la base del cráneo, en la silla turca. Se divide anatómicamente en un lóbulo anterior o adenohipófisis, un lóbulo intermedio

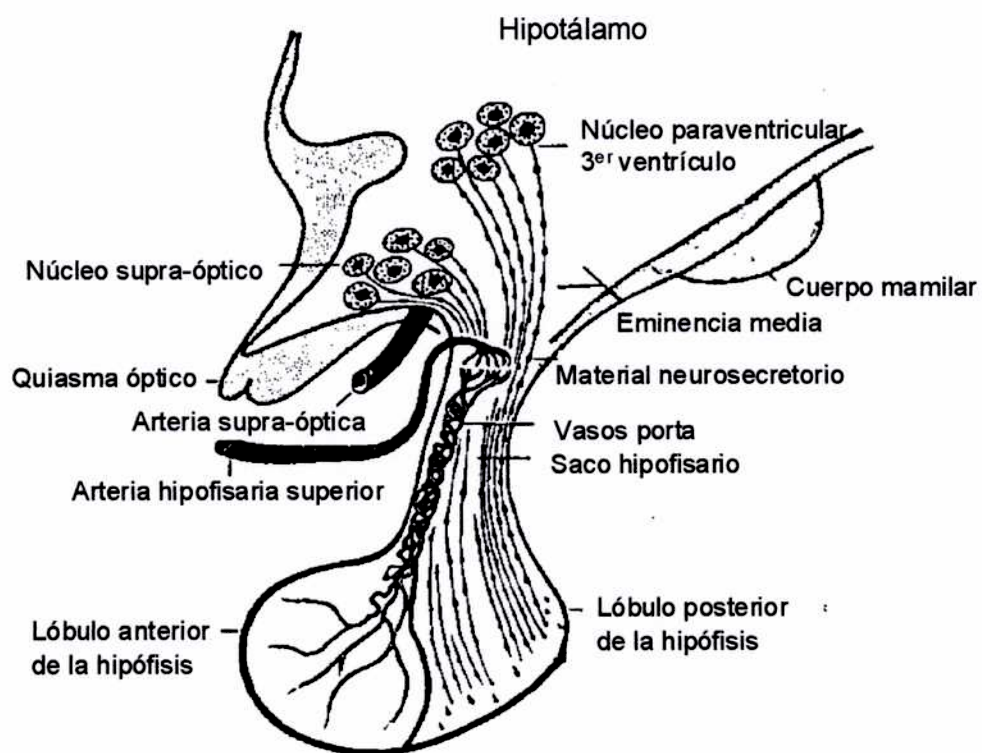


FIGURA 1: Esquema del eje hipotálamo-hipofisario

(pars intermedia) y un lóbulo posterior o neurohipófisis.

El lóbulo posterior de la hipófisis es de origen neural y está constituido por axones y terminaciones de neuronas cuyos cuerpos celulares residen en distintos núcleos del hipotálamo.

La hipófisis anterior constituye los dos tercios de la glándula y está formada por células que se clasifican de acuerdo a sus productos de secreción en: somatotropos (células secretoras de hormona de crecimiento, GH), lactotropos (secretoras de prolactina, PRL), tiotropos (tirotrófina, TSH), corticotropos (secretoras de hormona adenocorticotrófica, ACTH, y péptidos relacionados) y gonadotropos (secretoras de LH y FSH).

FSH y LH regulan el crecimiento, diferenciación y funcionalidad del ovario y del testículo.

El ovario cumple la función de sintetizar estrógenos y progestágenos y la de producir ovocitos fertilizables. La principal promotora de la maduración folicular es la FSH que actúa sobre las células de la granulosa. La LH estimula la producción de andrógenos por las células de la teca y participa en la ovulación, causando la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito. Luego de la ovulación, las células foliculares se luteinizan dando lugar a la formación del cuerpo lúteo.

La función principal del testículo es la producción de espermatozoides y la síntesis de andrógenos. Los testículos están constituidos por dos compartimientos: los túbulos seminíferos, donde se desarrolla la espermatogénesis, y el tejido intersticial, donde se produce la síntesis de andrógenos. En los túbulos seminíferos las células de Sertoli, reguladas por la FSH, constituyen el soporte nutricional y estructural de las células germinales. El adecuado funcionamiento de estas células es el que permite el normal desarrollo de la espermatogénesis. La función de la célula de Sertoli se encuentra así mismo regulada por la testosterona que es producida en las células de Leydig bajo el control de la LH.

1.2 Regulación de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal

La secreción de LH y FSH depende de la interacción de dos componentes regulatorios, el hipotálamo, a través de la secreción de GnRH, y las gonadas, a través de la secreción de péptidos y esteroides (Figura 2).

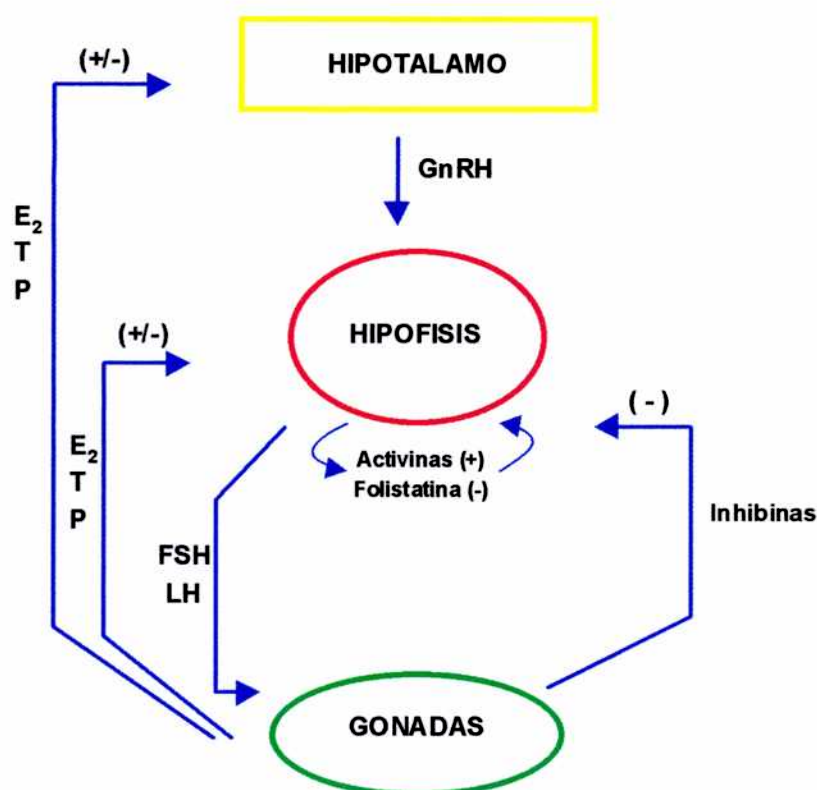


FIGURA 2: Regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal: la secreción del gonadotropo hipofisario es regulada por la integración de la señal del GnRH, de los esteroides y de los péptidos gonadales. E₂: estradiol; T: testosterona; P: progesterona

El GnRH es secretado a la circulación portal y como consecuencia de la interacción con receptores específicos en los gonadotropos hipofisarios, estimula la secreción de LH y FSH. Estas gonadotrofinas promueven la síntesis de esteroides en las gónadas; a su vez, los esteroides gonadales liberados a la circulación sistémica modulan la síntesis y secreción de LH y FSH a través de un sistema de retroalimentación.

Esta regulación es ejercida directamente sobre el gonadotropo y en forma indirecta sobre el hipotálamo, alterando la pulsatilidad de GnRH (Gharib y col., 1990).

Los péptidos gonadales también están involucrados en la regulación específica de la síntesis y secreción de FSH (Burger, 1992).

1.2.1 Control hipotalámico de la secreción de gonadotrofinas

El aislamiento y purificación del GnRH (Schally y col., 1971) permitió demostrar su importancia en la regulación de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

Como se mencionó anteriormente, se requiere una secreción pulsátil de este decapeptido para mantener una adecuada funcionalidad del gonadotropo. Se ha demostrado que la exposición continua al GnRH provoca la desensibilización de la respuesta celular asociada a una disminución en el número de receptores de membrana (Clayton, 1982) y posiblemente, al desacople de los sistemas de transducción en las células productoras de gonadotrofinas.

La amplitud y la frecuencia de la pulsatilidad del GnRH regulan la expresión génica diferencial de las subunidades α y β de las gonadotrofinas (Albanese y col., 1995). En modelos animales se ha demostrado que la expresión del gen de la β LH es altamente dependiente de la amplitud del pulso de GnRH (Papavasiliou y col., 1986), mientras que la expresión del ARN mensajero de la subunidad α común a todas las hormonas glicoproteicas y de la subunidad β de FSH son relativamente independientes de la amplitud del mismo (Marshall y col., 1991).

A su vez, el gonadotropo puede responder en forma diferencial a las variaciones en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH. Frecuencias altas favorecen la expresión del gen de la subunidad β de LH (Papavasiliou y col., 1986), mientras que frecuencias bajas incrementan la expresión del gen de la subunidad β de FSH (Dalkin y col., 1989).

Esta habilidad del GnRH para regular en forma diferencial la síntesis de los ARN mensajeros de las subunidades β de FSH y LH provee un mecanismo por el cual un mismo gonadotropo puede sintetizar LH o FSH en forma preferencial e indica que probablemente existe una frecuencia y una amplitud de pulso de GnRH óptimas para obtener los niveles de las gonadotrofinas requeridos en determinadas situaciones fisiológicas.

Por otra parte, el número de receptores de GnRH también forma parte de este complejo mecanismo de regulación pues se han observado variaciones en el número de receptores de GnRH en distintas condiciones fisiológicas. Por ejemplo, en roedores se ha observado una disminución en el número de estos receptores durante la preñez y la lactancia y un aumento de los mismos antes de la descarga preovulatoria de LH y luego de la castración (Clayton y col., 1980; Clayton y Catt, 1981a).

La activación de los receptores de GnRH inicia una cascada de respuestas

intracelulares que culminan en la liberación de las gonadotrofinas y en el aumento de la expresión de los genes que codifican para la síntesis de sus subunidades. El receptor de GnRH, ubicado en la membrana plasmática de los gonadotropos hipofisarios (Clayton y Catt, 1981b), pertenece a la familia de receptores acoplados a las proteínas G, con siete pasos transmembrana, un dominio extracelular con dos sitios potenciales de glicosilación y un dominio intracelular muy pequeño (Reinhart y col., 1992).

El complejo hormona-receptor se acopla a la proteína G y por este medio activa la fosfolipasa C- β . La activación de esta enzima conduce a la hidrólisis de fosfoinosítidos con la consiguiente liberación de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Estos cambios iniciales determinan la segunda etapa en el sistema de transducción de señales: el IP_3 , luego de unirse a receptores específicos en el retículo endoplásmico, eleva rápidamente los niveles de Ca^{2+} intracelulares. El Ca^{2+} y el DAG activan la proteína quinasa C (PKC). Posteriormente, el Ca^{2+} intracelular y la PKC constituyen señales que interactúan para regular diversas respuestas, incluyendo el control del nivel de Ca^{2+} intracelular, la secreción de gonadotrofinas y la actividad transcripcional.

Las moléculas señal de la vía de la fosfolipasa C también ejercen controles positivos y negativos sobre otros componentes del mecanismo de transducción de señales, incluyendo la regulación de las actividades de la fosfolipasa A_2 y la fosfolipasa D, que también podrían participar en la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (Stojilkovick y Catt, 1995).

1.2.2 Control gonadal de la secreción de gonadotrofinas

Los esteroides gonadales, principalmente el estradiol y la testosterona, actuando a nivel del hipotálamo o directamente sobre la hipófisis regulan la síntesis y secreción de gonadotrofinas.

El aumento de los niveles séricos de FSH y LH que se observa luego de la castración en animales de experimentación, durante la menopausia en la mujer (Judd y col., 1974) y con el envejecimiento en el hombre (Winters y Troen, 1982) demuestra claramente que la gonada ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de gonadotrofinas. Este efecto está mediado principalmente por las hormonas esteroides, ya que la administración exógena de estradiol o testosterona produce una disminución de los

elevados niveles de gonadotrofinas que son característicos de una función gonadal deficiente (Yen y col., 1972; Matsumoto y Bremner, 1984).

Efecto de los estrógenos: Las evidencias obtenidas utilizando modelos experimentales indican que los estrógenos ejercen, en forma dosis dependiente, efectos inhibitorios y estimulatorios sobre la secreción de gonadotrofinas.

En concentraciones bajas el estradiol es capaz de inhibir la secreción de FSH y LH (Knobil, 1974), este efecto inhibitorio se ejercería tanto a nivel del hipotálamo como de la hipófisis.

La acción inhibitoria de los estrógenos a nivel hipotalámico ha sido demostrada por la disminución de la secreción de LH que se produce luego de la administración de una microinyección de estradiol en diferentes áreas hipotalámicas (Ferin y col., 1974). Así mismo se ha observado que la secreción de ambas gonadotrofinas puede ser inhibida luego de la infusión de este esteroide en el fluido cerebroespinal del tercer ventrículo cerebral (Chappel y col., 1981).

La acción inhibitoria del estradiol a nivel hipofisario ha sido demostrada en modelos experimentales en los cuales la administración de estradiol a monas ovariectomizadas con lesiones en el núcleo arcuato del hipotálamo (donde se localizan las neuronas secretoras de GnRH) produjo una disminución de la secreción de gonadotrofinas en respuesta al estímulo de GnRH (Nakai y col., 1978). Por otro lado, la captación específica de estradiol radioactivo por la hipófisis y la presencia de receptores de estradiol en esta glándula constituyen evidencias indiscutibles de la acción directa que los estrógenos ejercerían sobre las células productoras de gonadotrofinas (Anderson y Greenwald, 1969; Kato, 1977).

El efecto estimulatorio de los estrógenos sobre la secreción de gonadotrofinas ha sido observado luego de una exposición prolongada del hipotálamo a concentraciones crecientes de estrógenos. Se ha demostrado que estos esteroides inducen la liberación de GnRH y la consiguiente descarga de ambas gonadotrofinas (Levine y col., 1985).

Un ejemplo característico de este efecto de los estrógenos lo constituye la descarga preovulatoria de gonadotrofinas que se produce en el ciclo menstrual, a pesar de que algunos autores han demostrado que en esta particular situación fisiológica también la progesterona estaría contribuyendo a la estimulación de una descarga masiva de FSH y LH (Hoff y col., 1983).

A pesar de que los efectos estimulatorios e inhibitorios de los estrógenos sobre el hipotálamo han sido consistentemente demostrados, no se han descrito receptores de estrógenos en las neuronas productoras de GnRH y se ha propuesto que el efecto estimulatorio de los estrógenos estaría mediado por cambios en los niveles de los neurotransmisores que modulan la secreción de GnRH (Mahesh y Brann, 1998).

Los efectos inhibitorios y estimulatorios de los estrógenos sobre el gonadotropo han sido confirmados a nivel molecular. La administración de dosis bajas de estrógenos a ratas hembra castradas produce una disminución de los niveles de ARN mensajero que codifican para las subunidades α , β FSH y β LH (Shupnik y col., 1988).

El estradiol a dosis altas produce un aumento en la transcripción del ARN mensajero para la subunidad β de LH (Shupnik y col., 1989). Este estímulo se ejercería a través de la interacción del complejo formado por el estradiol y su receptor, con un elemento respondedor a estrógenos (ERE) presente en el gen que regula la síntesis de subunidad β LH (Shupnik y Rosenzweig, 1991).

Efecto de la progesterona: La acción de la progesterona sobre la secreción de gonadotrofinas es compleja y se ha observado que puede inhibir o facilitar la secreción de gonadotrofinas de acuerdo al tono estrogénico que la acompaña. La primera evidencia del rol estimulatorio de este esteroide en la secreción de FSH y LH fue obtenida por Odell y Swerdloff (1968) quienes observaron una descarga de gonadotrofinas luego de administrarles progesterona a mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos. Esta observación fue confirmada por otros trabajos experimentales posteriores realizados *in vivo* e *in vitro* (Nillius y Wide, 1971; Leadem y Kalra, 1984).

Sin embargo, también se ha demostrado claramente que la progesterona es capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH. Dicho efecto se ha observado durante la fase lútea del ciclo menstrual y se ha propuesto que estaría mediado por una disminución de la frecuencia de pulsos de GnRH (Marshall y Kelch, 1986; Sollenberger y col., 1990).

Efecto de los andrógenos: Si bien la regulación *in vivo* ejercida por los andrógenos es claramente inhibitoria para ambas gonadotrofinas, este efecto es más marcado para LH (Sherins y Loriaux, 1973; Finkelstein y col., 1991).

En el hombre, se ha postulado que el efecto inhibitorio de la testosterona se ejerce

principalmente a nivel hipotalámico, donde produciría una disminución en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH (Matsumoto y Bremner, 1984).

Sin embargo, los andrógenos también podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH a nivel hipofisario. Finkelstein y colaboradores (1991) han observado que los andrógenos pueden disminuir los niveles de gonadotrofinas en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático a los cuales se les administra GnRH en forma exógena.

Se ha propuesto que este efecto inhibitorio de la testosterona sobre la secreción de LH se ejercería, al menos en parte, a través de la conversión de este esteroide a estrógenos (Crowley y col., 1991).

La acción inhibitoria de la testosterona sobre la secreción de LH se acompaña con una disminución de los niveles de ARN mensajero de la subunidad β LH (Gharib y col., 1986).

El mecanismo por el cual los andrógenos regulan la secreción de FSH es complejo. Las evidencias obtenidas en experimentos *in vivo* indican que el efecto es inhibitorio y se ejerce principalmente a nivel hipotalámico (Matsumoto y Bremner, 1984). Sin embargo, en modelos *in vitro* se ha observado que podrían ejercer un efecto estimulador a nivel hipofisario, ya que el agregado de andrógenos a células hipofisarias en cultivo induce un aumento tanto en la síntesis como en la secreción de esta gonadotrofina (Kennedy y Chappel, 1985). Estos efectos se acompañan con un aumento de los niveles del ARN mensajero de la subunidad β de FSH que podría ser debido, al menos en parte, por un aumento en su estabilidad (Paul y col., 1990).

Efectos de los péptidos gonadales: Si bien el mecanismo más importante de regulación de la secreción de gonadotrofinas es ejercido por las hormonas esteroideas, existe otro sistema adicional de regulación que es específico para la secreción de FSH, en el cual interviene una familia de péptidos de origen principalmente gonadal: las inhibinas, activinas y folistatinas.

Las inhibinas son glicoproteínas formadas por dos subunidades α y β , unidas por puentes disulfuro. La subunidad β existe en dos formas altamente homólogas llamadas β A y β B, las cuales dan origen a los heterodímeros inhibina A ($\alpha\beta$ A) e inhibina B ($\alpha\beta$ B), respectivamente (Mason y col., 1985). Las inhibinas son producidas en las células de la granulosa y en las células de Sertoli y ejercen su acción sobre los gonadotropos

hipofisarios inhibiendo la síntesis y secreción de FSH (Burger, 1992). La producción de inhibinas a nivel gonadal, es a su vez, regulada por la FSH y por diversos factores de crecimiento producidos localmente en las gonadas (La Polt y col., 1990; Morris y col., 1988).

Otro miembro de esta familia de péptidos es la activina, la cual está formada por la unión de dos subunidades β , dando origen a dos homodímeros activina A ($\beta A\beta A$), activina B ($\beta B\beta B$) y a un heterodímero activina AB ($\beta A\beta B$). La activina tiene la capacidad de estimular selectivamente la síntesis y secreción de la FSH en células hipofisarias en forma dosis dependiente (Ling y col., 1986).

Finalmente, otro miembro de esta familia de péptidos, la folistatina, tiene la capacidad de inhibir la síntesis y liberación de FSH aunque su potencia es menor que la de las inhibinas (Ueno y col., 1987). La folistatina es una glicoproteína de la cual se han aislado varias isoformas (Shimasaki y col., 1988); no posee semejanzas estructurales con las inhibinas y activinas y tiene la capacidad de unir activina con alta afinidad, por lo que es considerada una proteína moduladora de la actividad biológica de la activina (Nakamura y col., 1990; Shimonaka y col., 1991).

2. Gonadotrofinas y ciclo menstrual

A partir de la pubertad, el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios participan en un complejo mecanismo de regulación que conduce a la gonada femenina a funcionar en forma regularmente cíclica. La resultante de esta compleja interacción de efectos inhibitorios y estimulatorios es la liberación de un ovocito maduro en cada ciclo menstrual.

Yen (1991) ha definido al ciclo menstrual como la manifestación repetida de la interacción del sistema hipotálamo-hipófiso-ovárico, acompañado por cambios estructurales y funcionales en los tejidos blanco del tracto reproductivo.

Cada ciclo presenta una duración aproximada de 28 días y culmina en la descarga menstrual, siendo el primer día de la menstruación el punto de referencia para el comienzo de un nuevo ciclo.

Durante el ciclo menstrual, los niveles circulantes de gonadotrofinas, esteroides y péptidos gonadales se modifican presentando perfiles cíclicos, bien definidos. En base a los cambios estructurales y funcionales del ovario y a la producción de esteroides sexuales,

el ciclo menstrual puede dividirse en cuatro fases funcionales (Baird y Fraser, 1974):

- fase folicular (temprana, media y tardía)
- fase ovulatoria ó transición folículo-luteal
- fase lútea (temprana, media y tardía)
- fase menstrual ó transición lúteo-folicular

2.1 Fase folicular

La fase folicular tiene una duración aproximada de 13 días. Este periodo se caracteriza por el desarrollo de un folículo hasta el estadio ovulatorio mientras que muchos otros inician el proceso de atresia.

Los niveles de ambas gonadotrofinas comienzan a aumentar en la fase lútea tardía, días antes de la menstruación. En este momento se inicia el proceso de foliculogénesis que continúa durante la transición lúteo-folicular. El aumento de la secreción de FSH concomitante con un aumento en la frecuencia de pulsos de LH inicia el reclutamiento folicular que se prolonga durante los 4 o 5 primeros días de la fase folicular. Este proceso continúa con la selección de un folículo único elegido de un conjunto con similar grado de desarrollo, el cual completa su maduración entre los días 8 y 12 del ciclo, y por último se produce la ovulación entre los días 13 y 15.

La selección de un folículo único destinado a la ovulación se caracteriza por una alta capacidad de síntesis y secreción de andrógenos, estrógenos, progesterona (Hillier y col., 1981) y una disminución en la producción de inhibina B (Groome y col., 1996). La síntesis de estas hormonas depende de la interacción entre las células de la teca y las células de la granulosa, mediada por gonadotrofinas y una variedad de factores de crecimiento que operan a través de mecanismos paracrinós y autocrinós (Hsueh y col., 1983). La producción de estradiol e inhibina por el folículo dominante, el cual ha desarrollado una mayor capacidad de respuesta a la gonadotrofina trófica, suprime la secreción de FSH y produce un descenso de los niveles de esta gonadotrofina durante la fase folicular media y tardía (Fritz y Speroff, 1982). La caída en los niveles de FSH produce una disminución de la actividad aromatasa dependiente de FSH en las células de la granulosa limitándose de esta forma la producción de estrógenos en los otros folículos que no han sido seleccionados. En este entorno hormonal, se interrumpe la proliferación de

células de la granulosa y se inicia una secuencia de eventos asociados a un microentorno androgénico inductor del proceso irreversible de atresia folicular.

El folículo seleccionado completa su desarrollo en presencia de niveles plasmáticos de FSH en disminución, por haber adquirido una mayor capacidad de respuesta a la hormona trófica. En este folículo se produce una elevada proliferación de células de la granulosa y, en consecuencia, un aumento del número de receptores de FSH. Este incremento en el número de células de la granulosa se acompaña también por un mayor desarrollo del sistema vascular en el compartimiento tecal.

En estas condiciones, en el folículo dominante se induce la expresión de receptores a LH y éste adquiere la capacidad de responder a esta gonadotropina (Richards, 1980).

2.2 Fase ovulatoria

La elevada producción de estrógenos por el folículo dominante actúa a nivel central, disparando el mecanismo de retroalimentación positivo, produciendo la descarga ovulatoria de gonadotropinas.

Durante los últimos 2 o 3 días previos a la descarga de gonadotropinas se produce un aumento de los niveles de inhibina, progesterona y $17\alpha\text{OH}$ -progesterona. Este aumento en los niveles de progestágenos refleja el proceso de luteinización que se produce en las células de la granulosa, que resulta de la capacidad que adquirió la célula para responder a la acción de la LH (McNatty y col., 1979).

2.3 Fase Lútea

La característica más importante de la fase lútea del ciclo menstrual es el cambio de un entorno hormonal predominantemente estrogénico, característico de la fase folicular, a un entorno donde la hormona predominante es la progesterona. La luteinización de las células de la granulosa y de la teca después de la ovulación, se traduce en una capacidad aumentada para sintetizar progesterona y en menor grado estradiol (McNatty y col., 1979).

La actividad secretoria y funcional del cuerpo lúteo dependen del aporte de LH (Filicory y col., 1984). Los niveles de FSH disminuyen durante la fase lútea hasta alcanzar los niveles más bajos observados durante todo el ciclo menstrual.

Las concentraciones de progesterona y estradiol que se alcanzan en la fase lútea

media preparan al endometrio para una posible implantación del embrión. También se alcanzan en este momento del ciclo los niveles máximos circulantes de inhibina A (Muttukrishna y col., 1994).

2.4 Fase menstrual

La transición lúteo-folicular representa una secuencia de cambios dinámicos que comprende la terminación de la función lútea y la reactivación del sistema GnRH-gonadotrofinas; estos cambios se producen como consecuencia de la desaparición de la acción inhibitoria de los esteroides y de la disminución de los niveles de inhibina segregada por el cuerpo lúteo (Mais y col., 1987). Durante este período, aproximadamente dos días antes de la menstruación, se incrementan los niveles de FSH, asegurando de este modo el reclutamiento folicular para el ciclo siguiente.

3. Gonadotrofinas y pubertad

La pubertad es quizás la etapa más trascendente del proceso de crecimiento y desarrollo del ser humano, ya que durante su transcurso se van perfilando y definiendo las características físicas, psíquicas e intelectuales así como las actitudes, hábitos y comportamientos del individuo (Bergadá, 1986). Estos cambios se producen básicamente como consecuencia de profundas modificaciones del entorno hormonal, las cuales determinarán la función reproductiva futura.

En el varón, el primer signo clínico que marca el comienzo de la pubertad es el aumento del volumen testicular seguido luego de unos meses por la aparición del vello pubiano. A partir de ese momento se producen importantes cambios en los caracteres sexuales secundarios que se acompañan con cambios en el crecimiento, maduración ósea, comportamiento, etc. y variaciones hormonales que, en realidad, son las determinantes de todas estas manifestaciones.

El comienzo de la pubertad y la aparición de los caracteres sexuales secundarios, fue originalmente considerado como el inicio de la secreción hormonal del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en un organismo infantil el cual carecía de toda actividad hormonal previa. Sin embargo, la aparición de técnicas más sensibles que hicieron posible el dosaje de

bajos niveles de hormonas permitió demostrar que la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal no sólo está presente en la edad prepuberal, sino que es funcional desde el período fetal. Los cambios clínicos observados en la pubertad sólo serían la resultante de una etapa de maduración o reactivación de un sistema hormonal preexistente que involucra el sistema nervioso central, en especial el núcleo arcuato del hipotálamo medio ventral, el lóbulo anterior de la hipófisis y las gonadas (Kaplan y col., 1976).

Durante la gestación, los cambios en las concentraciones séricas de gonadotrofinas en el feto reflejan el desarrollo y maduración del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Los niveles de gonadotrofinas circulantes en el feto alcanzan valores comparables a los del adulto castrado durante la mitad de la gestación, coincidiendo con la maduración del sistema porta. Estas concentraciones máximas de hormonas en circulación podrían reflejar la ausencia de un mecanismo inhibitorio de la secreción de gonadotrofinas (Kaplan y Grumbach, 1976).

En el embarazo a término, las concentraciones séricas de gonadotrofinas en el feto disminuyen marcadamente. Esta disminución podría deberse a varios factores; uno de ellos sería un cambio en la sensibilidad del sistema hipotálamo-hipofisario a la acción de los esteroides sexuales circulantes; también podría existir una maduración intrínseca del mecanismo inhibitorio de la secreción de GnRH y por último, también contribuiría la elevación de los estrógenos durante el último período de la gestación (Sklar y col., 1981).

Después del nacimiento, las concentraciones de FSH y LH se elevan significativamente y se mantienen elevadas hasta, aproximadamente, los 6 meses de edad en el varón y 1 o 2 años en la mujer, luego descienden a niveles bajos, manteniéndose así hasta el momento en que se inicia la pubertad (Forest y col., 1976).

Sin embargo, durante la infancia y la niñez se observan pequeñas oscilaciones en estos niveles que no presentan consecuencias clínicas (Bergadá, 1984). Este período de aparente inactividad hormonal se denomina hiatus prepuberal y tiene una duración de 8 a 10 años, hasta el comienzo de la pubertad. Reiter y Grumbach (1982) han sugerido que este período de inactividad estaría determinado por la acción de un sistema inhibidor intrínseco del sistema nervioso central cuyas características aún no han sido claramente establecidas.

Al comienzo de la pubertad, el generador de pulsos de GnRH hipotalámico, cuya actividad estaría suprimida durante la infancia y niñez, se reactiva produciendo un aumento en la amplitud y frecuencia de las descargas pulsátiles de GnRH.

El aumento de la actividad a nivel hipotalámico se produciría por dos mecanismos. Uno de ellos es dependiente de esteroides y consiste en la disminución de la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales. El otro es independiente del factor gonadal y está relacionado con la disminución de la actividad del mecanismo inhibitorio intrínseco del sistema nervioso central. Al llegar a la pubertad, el hipotálamo adquiriría cierto grado de madurez, dejaría de actuar el mecanismo inhibidor del sistema nervioso central y éste, entonces, reconocería como bajos los niveles de esteroides que hasta ese momento circulaban en concentraciones suficientes como para mantener inactivo al mecanismo de secreción de GnRH (Conte y col., 1980; Grumbach y Kaplan, 1990). El proceso madurativo comenzaría a desarrollarse en forma progresiva y el hipotálamo aumentaría, también progresivamente, la secreción de GnRH. Este factor, al estimular a la hipófisis, elevaría la producción de gonadotrofinas y de esteroides gonadales, los cuales iniciarían el proceso puberal y, a su vez, al actuar sobre el hipotálamo y la hipófisis, establecerían un nuevo umbral de sensibilidad que regularía el mecanismo de retroalimentación negativo el cual permanecería hasta la edad adulta. Evidencias obtenidas en niños normales y con distintas patologías han demostrado que ambos mecanismos de regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal coexisten, predominando el mecanismo de retroalimentación negativa en los primeros años de la niñez y, posteriormente dominando el mecanismo independiente de esteroides, intrínseco del sistema nervioso central (Conte y col., 1975, 1980; Grumbach y Styne, 1992).

Diversos factores han sido propuestos como desencadenantes de la reactivación hipotalámica: péptidos opioides endógenos (Wilkes y Yen, 1981), monoaminas cerebrales (Gallo, 1980), secreciones de la glándula pineal (Silman y col., 1979), aminoácidos excitatorios (Ondo y col., 1976) y otros péptidos cerebrales (Grumbach y Kaplan, 1990).

4. Gonadotrofinas y postmenopausia

La menopausia marca el final del período fértil en la mujer. Se define como la desaparición permanente de la menstruación como resultado de la pérdida de la actividad funcional del ovario (World Health Organization, 1981)

La finalización de la función ovárica y de la menstruación no ocurren como eventos

fisiológicos agudos, sino que son el resultado de un proceso lento que se desarrolla durante varios años. En el período de transición entre la función folicular premenopáusica y la postmenopáusica se producen una serie de cambios en los folículos ováricos que conducen a modificaciones en la regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

En la primera etapa de la perimenopausia los niveles de gonadotrofinas plasmáticas son elevados en comparación a los niveles circulantes en ciclos menstruales espontáneos de mujeres más jóvenes (MacNaughton y col., 1992). El aumento en los niveles de la FSH podría interpretarse como una compensación fisiológica por la disminución del número de folículos funcionantes en el ovario (Metcalf y Livesey, 1985), acompañada por la consecuente disminución de la secreción de inhibina (Burger y col., 1995).

El período medio de la perimenopausia se caracteriza por intervalos de tiempo prolongados entre las menstruaciones, aunque también se presentan ciclos de muy corta duración. La ovulación errática de los folículos remanentes sería la responsable de este perfil alterado de los ciclos menstruales (Metcalf y col., 1985). El perfil hormonal se caracteriza por los niveles elevados de FSH durante la fase folicular temprana y niveles disminuidos de progesterona en la fase lútea. Los niveles estrogénicos son variables, pudiendo ser elevados en algunos ciclos y disminuidos en otros.

En la perimenopausia avanzada y durante la postmenopausia los niveles plasmáticos de estradiol disminuyen ya que los folículos ováricos han dejado de sintetizar estrógenos. Los bajos niveles de estradiol circulantes durante este período provienen de la conversión periférica de estrona y testosterona (Judd y col., 1974) y la baja concentración de progesterona en circulación proviene de la glándula adrenal (Judd, 1986). Los niveles de testosterona no difieren de los que se encuentran en circulación en la premenopausia, ya que la producción de andrógenos continúa tanto en las células del hilio ovárico como en células luteínicas del estroma ovárico (Judd, 1986).

5. Estructura molecular y biosíntesis de gonadotrofinas

Al igual que la LH, TSH y gonadotrofina coriónica (CG), la FSH es un heterodímero formado por dos subunidades α y β , asociadas en forma no covalente. Ambas subunidades poseen cadenas de oligosacáridos unidas al polipéptido, constituyendo esta porción carbohidratada entre el 15 y 35% del peso molecular.

Dentro de una misma especie la subunidad α de las cuatro hormonas glicoproteicas mencionadas anteriormente provienen de un único gen (Boothby y col., 1981), localizado en el cromosoma 6 humano (Fiddes y Goodman, 1981), y presenta una secuencia aminoacídica idéntica (Pierce y Parsons, 1981). Esta subunidad α está constituida por una cadena polipeptídica de 92-96 aminoácidos y dos cadenas de oligosacáridos unidas a los aminoácidos asparagina (Asn) que ocupan las posiciones 52 ó 56 y 78 ó 82 de la cadena polipeptídica. Estos sitios de glicosilación conservan la misma ubicación en las subunidades α de todas las especies de mamíferos (Ryan y col., 1987); sin embargo, dentro de una misma especie, las cadenas de oligosacáridos de las subunidades α de las cuatro hormonas glicoproteicas difieren en su estructura (Nilsson y col., 1986).

Las subunidades β de las hormonas glicoproteicas confieren especificidad inmunológica y biológica a los heterodímeros (Moyle y col., 1994), y a pesar de que estas subunidades difieren en sus secuencias aminoacídicas, poseen una alta homología entre sí (Pierce y Parsons, 1981). Las subunidades β de FSH y TSH están codificadas por un único gen, los cuales están localizados en los cromosomas humanos 11 y 1 respectivamente (Watkins y col., 1987; Wondisford y col., 1988). Por el contrario, los genes que codifican las subunidades β LH y β CG están localizados en el cromosoma 19 humano y poseen una organización compleja (Boorstein y col., 1982).

Las subunidades β de las hormonas glicoproteicas poseen además diferente número de oligosacáridos unidos a su cadena peptídica: LH y TSH presentan una única cadena de oligosacáridos mientras que FSH y CG poseen dos cadenas de oligosacáridos ubicadas en las asparaginas que ocupan las posiciones 13 o 30 (LH y TSH) o bien en ambos residuos (FSH y CG). La subunidad β de la gonadotrofina coriónica presenta además 4 oligosacáridos unidos a aminoácidos serina en su porción carboxilo terminal, los cuales no están presentes en las otras hormonas glicoproteicas (Kessler y col., 1979).

En particular, la subunidad β de la FSH posee 110-111 aminoácidos y, como se mencionó anteriormente, contiene dos sitios de glicosilación localizados en las posiciones Asn 6, 7 ó 13 y Asn 23, 24 ó 30 (Pierce y Parsons, 1981; Combarnous, 1992).

Las variaciones en el procesamiento de los oligosacáridos de las dos subunidades que constituyen las glicoproteínas, conducirán a diferencias en la estructura y composición de los carbohidratos unidos a las cadenas aminoacídicas. Esta heterogeneidad en la porción carbohidratada de la molécula de las hormonas glicoproteicas trae como consecuencia que cada hormona exista como un gran número de variantes moleculares

denominadas isoformas, isohormonas o variantes de glicosilación.

Recientemente, Dias y colaboradores (1998) han propuesto un modelo para la estructura molecular de la FSH humana que se muestra en la Figura 3. Este modelo ha sido construido en base al estudio de la estructura molecular de la hCG que se realizó utilizando cristalografía de rayos X y considerando la semejanza que existe entre ambas glicoproteínas.

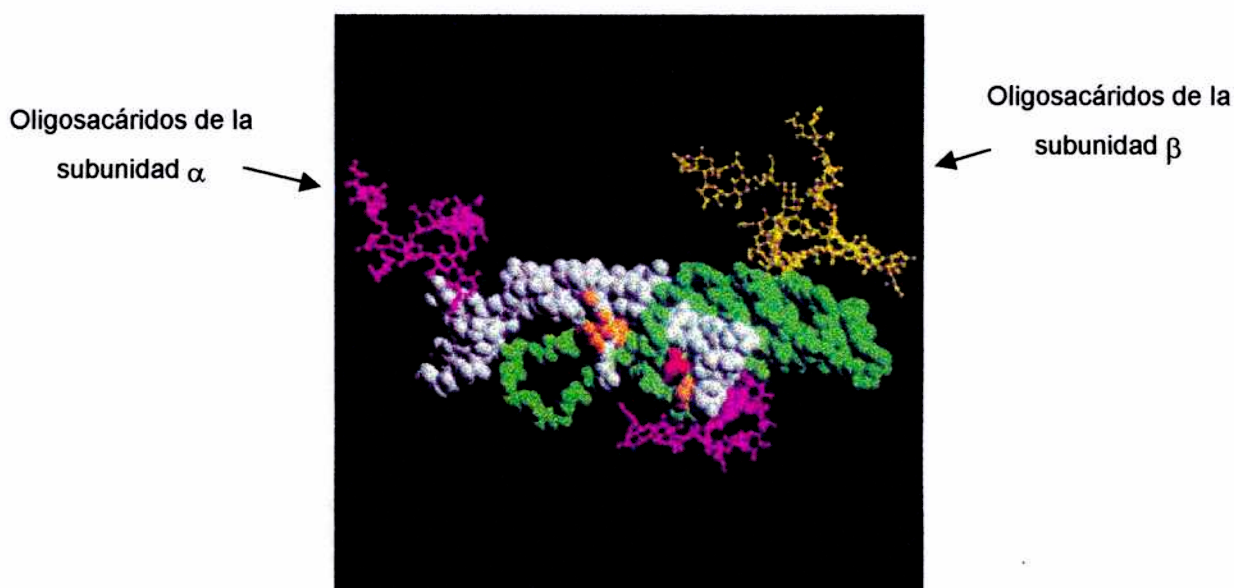


FIGURA 3: Modelo de la estructura molecular de la FSH humana

Los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas están unidos a las cadenas peptídicas a través de dos tipos de enlace covalente: uniones N-glicosídicas y O-glicosídicas, originando dos clases de glicosilproteínas: a) las N-glicosilproteínas, en las que el oligosacárido se une a través de un residuo NAcGlc al grupo amida de la cadena lateral del aminoácido Asn y b) las O-glicosilproteínas, en las que el oligosacárido está unido a través de un residuo N-acetilgalactosamina (NAcGal) a la función hidroxilo de un aminoácido serina (Ser) o treonina (Thr).

Como se mencionó anteriormente, todas las hormonas glicoproteicas presentan estructuras carbohidratadas con enlaces N-glicosídicos a excepción de la molécula de hCG en la cual se encuentran además oligosacáridos con enlaces de tipo O-glicosídicos.

Las diferentes estructuras de oligosacáridos presentes en las hormonas glicoproteicas se forman como resultado de la remoción y de la adición secuencial de distintos residuos de azúcares luego de que un oligosacárido precursor común es transferido en bloque al polipéptido (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Schachter 1984, 1986).

El proceso de glicosilación se inicia en el retículo endoplasmático rugoso (RER) donde el oligosacárido precursor compuesto por 14 residuos de azúcar ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$) es transferido desde el transportador lipídico dolicol a un aminoácido Asn mientras el polipéptido está siendo sintetizado. Esta reacción es catalizada por la oligosacaril transferasa del retículo endoplasmático rugoso (Figura 4, reacción 1), la cual reconoce una secuencia específica Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico. Por acción de las enzimas α -glucosidasa I y II, proteínas integrales de membrana, se remueven del oligosacárido inicial los tres residuos glucosa (Figura 4, reacciones 2 y 3) y luego por acción de una α -manosidasa específica (α -manosidasa del RER) se remueve un residuo manosa terminal (Figura 4, reacción 4).

La formación del heterodímero $\alpha\beta$ tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso como se ha demostrado para LH, TSH y hCG (Hoshina y Boime, 1982; Magner y Weintraub, 1982; Peters y col., 1984). En esta etapa de la biosíntesis los oligosacáridos unidos a las subunidades son, principalmente, aquellos de alto contenido en manosa, $\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ y $\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2$ (Magner y Papaggianes, 1987; Peters y col., 1984). Posteriormente estas moléculas son transportadas a la cisterna cis del aparato de Golgi a través de la formación de vesículas.

5.1 Procesamiento de los oligosacáridos de las glicoproteínas

5.1.1 Etapas iniciales

El polipéptido con la cadena de carbohidratos en formación, $\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2\text{-Asn}$, es traslocado al aparato de Golgi, donde continúa el procesamiento de los oligosacáridos. La α -manosidasa I del compartimiento cis del aparato de Golgi remueve entre uno y tres residuos α 1,2-manosa dando lugar a la estructura $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2\text{-Asn}$ (Figura 4, reacción 5). El polipéptido es transferido al compartimiento medio del Golgi donde la N-acetilglucosaminil transferasa I incorpora un residuo NAcGlc al brazo $\text{Man}_{\alpha}1\text{-3}$ (Figura 4, reacción 6).

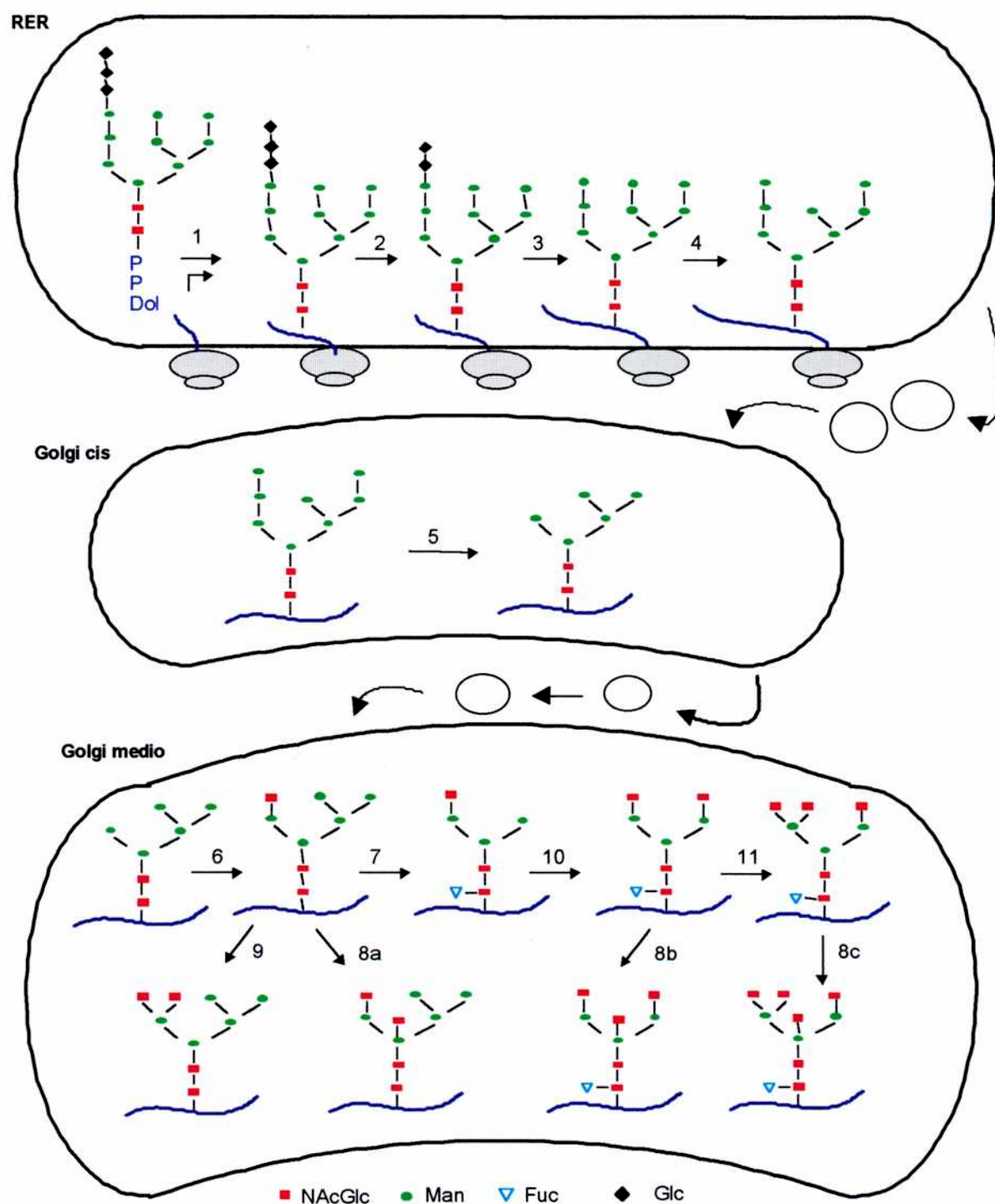


FIGURA 4: Biosíntesis de oligosacáridos complejos N-glicosídicos: transferencia del oligosacárido precursor dentro del retículo endoplasmático rugoso (RER) y primeras etapas del procesamiento de oligosacáridos en el compartimiento cis y medio del aparato de Golgi. 1) Oligosacaril transferasa; 2) α -glucosidasa I; 3) α -glucosidasa II; 4) α -manosidasa del RER, 5) α -manosidasa I; 6) N-acetilglucosaminil transferasa I; 7) α -manosidasa II y fucosiltransferasa; 8a), b) y c) N-acetilglucosaminil transferasa III; 9) N-acetilglucosaminil transferasa IV; 10) N-acetilglucosaminil transferasa II; 11) N-acetilglucosaminil transferasa IV o V.

A partir del producto de esta última reacción pueden obtenerse dos tipos de estructuras carbohidratadas dependiendo de la reacción enzimática que ocurra en la etapa inmediata posterior. Estos dos tipos de estructuras carbohidratadas pueden ser:

- **precursores de oligosacáridos de tipo híbrido** (Figura 4, reacción 8a): si la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III produce el agregado de un residuo NAcGlc por unión β 1,4 al residuo interno β -manosa de la estructura núcleo se impide que la enzima α -manosidasa II elimine los dos residuos terminales α -manosa del brazo $\text{Man}_{\alpha}1-6$, y en consecuencia se formará un oligosacárido de tipo híbrido. Esta estructura podrá o no incorporar en sucesivas etapas de la biosíntesis residuos galactosa y ácido siálico terminal solamente a una de sus ramas.

Se ha sugerido que la abundancia relativa de α -manosidasa II y N-acetilglucosaminil transferasa III en un cierto tejido, será el factor determinante de la síntesis de un oligosacárido de tipo complejo o de tipo híbrido (Harpaz y Schachter, 1980; Allen y col., 1984).

Por otra parte, la acción de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa IV sobre la estructura $\text{NAcGlcMan}_3\text{NAcGlc-Asn}$ dará lugar a la formación de estructuras denominadas híbridos triantenarios (Figura 4, reacción 9). Sobre este tipo de oligosacáridos puede actuar posteriormente la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III originando oligosacáridos de tipo híbrido (no se muestra en la figura).

- **precursor de oligosacáridos complejos**: el agregado del residuo NAcGlc (Figura 4, reacción 6) produce un reordenamiento estérico de los residuos α -manosas unidos al brazo $\text{Man}_{\alpha}1-6$, permitiendo que estos dos residuos terminales sean eliminados por la enzima α -manosidasa II (Figura 4, reacción 7). Si estos dos residuos terminales son eliminados por esta enzima, se formará un oligosacárido con estructura de tipo monoantenaria. Este tipo de estructura $\text{NAcGlcMan}_3\text{NAcGlc}_2\text{-Asn}$ será precursora de la formación de estructuras de tipo complejo, pues permitirá la incorporación de sucesivos residuos NAcGlc por la acción sucesiva de varias N-acetilglucosaminil transferasas (Figuras 4 y 5, reacciones 10, 11 y sucesivas).

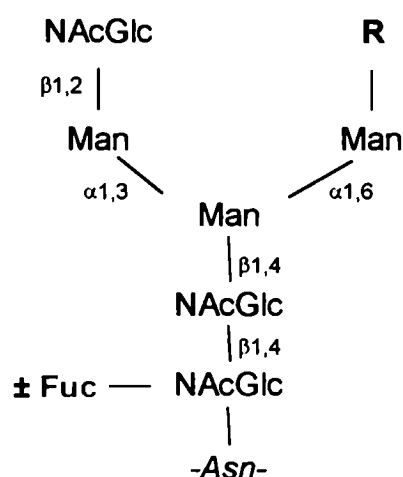
El primer producto es una estructura biantenaria, producida por la acción de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa II, que agrega un residuo NAcGlc al brazo $\text{Man}_{\alpha}1-6$ (Figura 4, reacción 10).

La estructura biantenaria, puede ser convertida en estructuras altamente ramificadas por la incorporación de sucesivos residuos NAcGlc a los brazos $\text{Man}_{\alpha}1-3$ o $\text{Man}_{\alpha}1-6$ mediante la acción de las enzimas N-acetilglucosaminil transferasas IV o V, respectivamente (Figura 4, reacción 11).

A partir de las estructuras biantenarias y triantenarias también se pueden sintetizar estructuras de tipo bisectadas si se incorpora un residuo NAcGlc por unión $\beta 1,4$ con el residuo interno β -manosa de la cadena núcleo (Figura 4, reacciones 8b y 8c, respectivamente).

5.1.2 Incorporación de fucosa

La enzima fucosiltransferasa que se encuentra en el compartimiento medio del Golgi es capaz de transferir un residuo fucosa al residuo NAcGlc unido a la Asn de la estructura que se muestra a continuación (Longmore y Schachter, 1982):



donde R puede ser: H, NAcGlc $\beta 1-2$ o $\text{Man}_{\alpha}1-6(\text{Man}_{\alpha}1-3)$

5.1.3 Etapas finales

Las etapas finales en la síntesis de oligosacáridos complejos tienen lugar en el compartimiento trans del Golgi y consisten en el agregado de los azúcares galactosa y ácido siálico por enzimas específicas.

Cada residuo NAcGlc perteneciente a cualquiera de las estructuras que se muestran en la Figura 5 puede ser aceptor de un residuo galactosa a través de una unión

β 1,4 por acción de la enzima galactosiltransferasa (Figura 5, reacciones 12). Finalmente, la enzima responsable de la sialilación de las cadenas de oligosacáridos, la sialiltransferasa, incorpora un residuo de ácido siálico al residuo β -galactosa terminal (Figura 5, reacciones 13).

En forma alternativa al agregado de galactosa y ácido siálico también es posible la formación de estructuras sulfatadas en un número limitado de glicoproteínas, como consecuencia de la adición de NAcGal en lugar de galactosa, y sulfato en lugar de ácido siálico (Parsons y Pierce, 1980).

Golgi trans

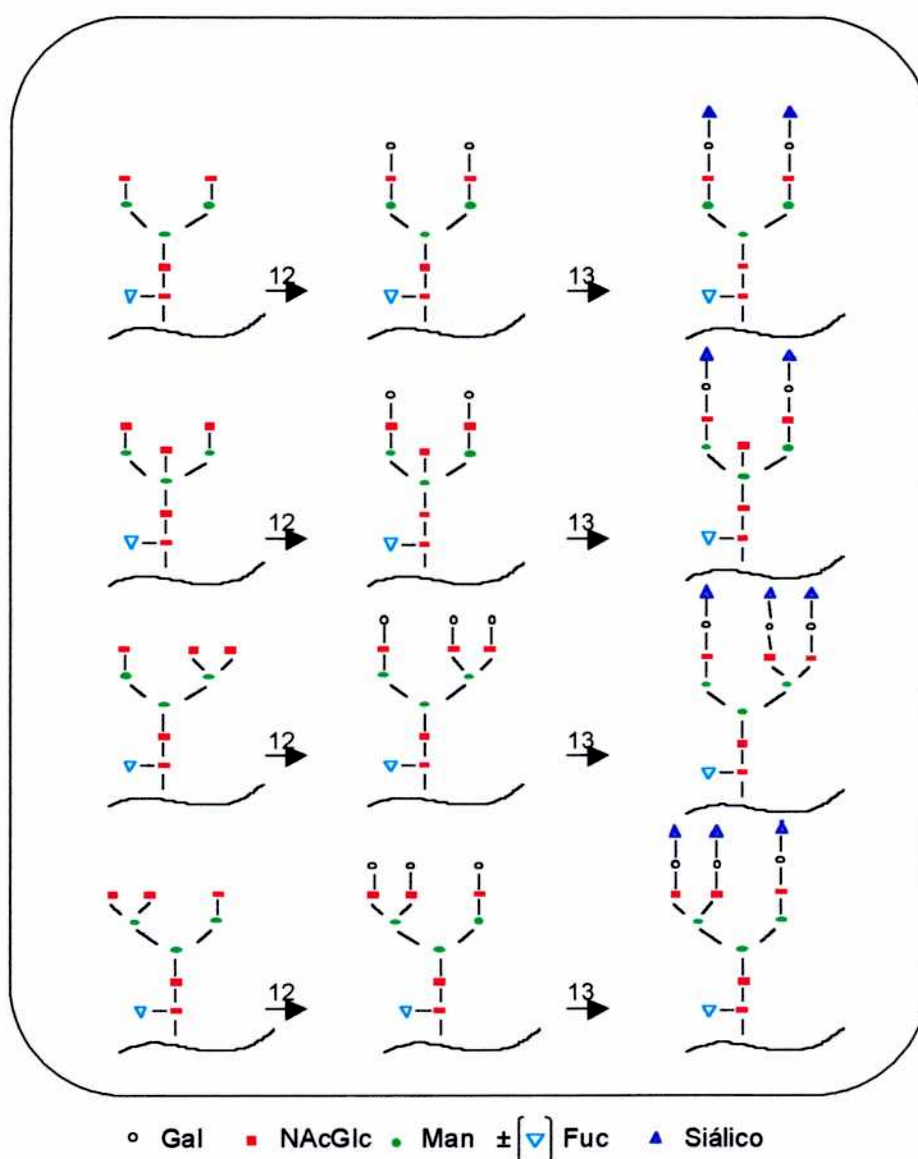


FIGURA 5: Etapas finales en el procesamiento de los oligosacáridos: 12) galactosiltransferasa 13) sialiltransferasa.

5.2 Estructura de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas

Las estructuras de los oligosacáridos unidos al aminoácido Asn de las glicoproteínas maduras pueden agruparse en tres grandes categorías de acuerdo al grado de procesamiento de la cadena carbohidratada unida al pentasacárido núcleo en: a) estructuras de alto contenido en manosa, b) estructuras de tipo híbrido y c) estructuras de tipo complejo.

Las estructuras con alto contenido en manosa y las de tipo híbrido representan estructuras que no han completado las etapas de remoción e incorporación de nuevos azúcares. Por otro lado, las estructuras de tipo complejo son consideradas estructuras que han recibido un mayor grado de procesamiento luego de atravesar las cisternas media y trans del aparato de Golgi (Figura 6)

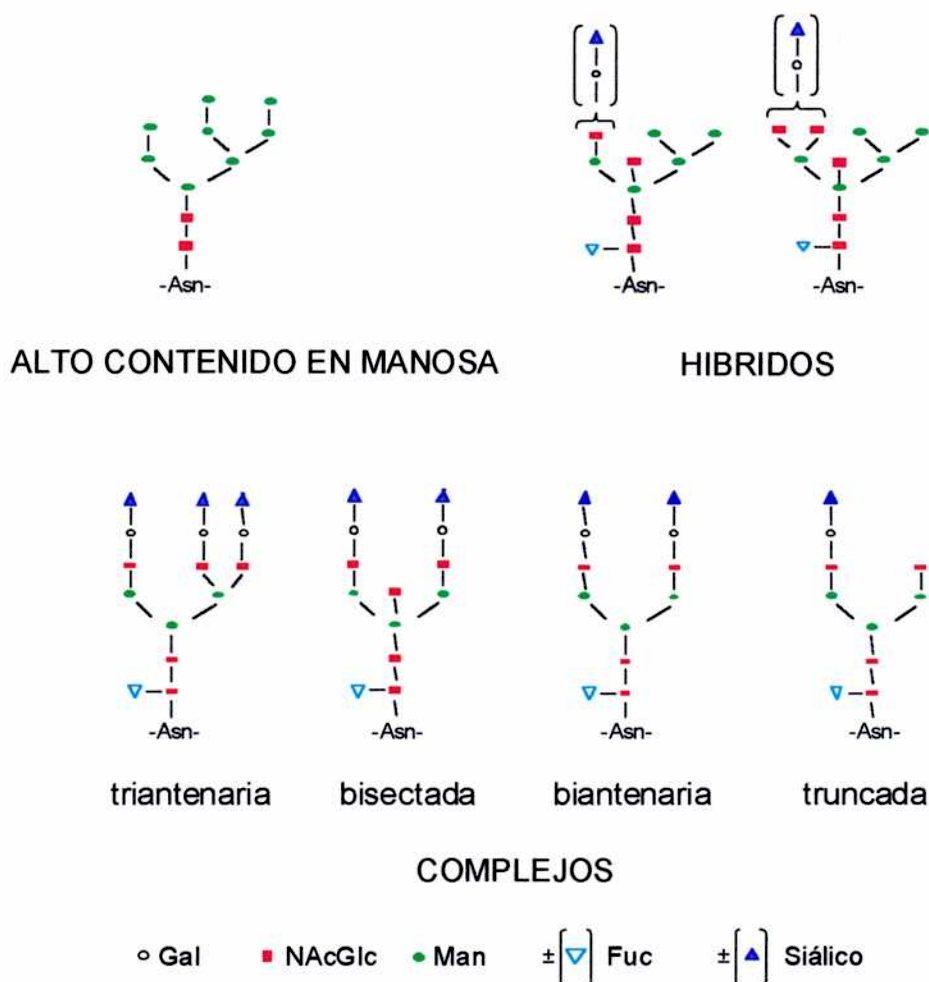


FIGURA 6: Estructura de los oligosacáridos unidos a las N-glicosilproteínas

Los oligosacáridos con estructuras de alto contenido en manosa poseen entre 2 y 6 residuos manosa unidos al pentasacárido núcleo.

Los oligosacáridos de tipo híbrido poseen una rama con número variable de residuos manosa y una rama con NAcGlc, que puede o no haber incorporado residuos galactosa y ácido siálico. En general, estas estructuras presentan un residuo NAcGlc bisectado unido a la β -manosa del pentasacárido núcleo.

Los oligosacáridos de tipo complejo poseen residuos de NAcGlc, galactosa y ácido siálico unidos al núcleo común de azúcares. Estas estructuras complejas pueden incorporar uno o dos residuos NAcGlc a cada una de las α -manosas dando lugar a la formación de oligosacáridos de tipo complejo más ramificados. En base a su morfología y flexibilidad, las ramas sustituyentes de las α -manosas han sido denominadas antenas, constituyendo las estructuras de oligosacáridos con dos o tres ramas, los oligosacáridos biantenarios y triantenarios respectivamente (Montreuil, 1984). Estas estructuras pueden presentarse con un residuo NAcGlc con unión β 1,4 a la β -manosa del núcleo, dando lugar a la formación de oligosacáridos de alto grado de ramificación "bisectados". Si la estructura biantenaria no incorpora galactosa y ácido siálico a una de sus ramas se obtiene la estructura de tipo truncada.

5.3 Estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH humana

Baenziger y Green (1988) han estudiado exhaustivamente la estructura molecular de la porción carbohidratada de la FSH hipofisaria humana utilizando preparaciones de referencia provenientes de hipófisis humanas (NIADDK-hFSH-I-3-AFP-4822B y NIAMDD-hFSH-2). Estos autores analizaron la estructura de los carbohidratos luego de separar los mismos del polipéptido por medio de una N-glicanasa. Utilizaron una combinación de técnicas tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), digestión enzimática con endo y exoglicosidasas y cromatografías de afinidad en lectinas. Las estructuras que caracterizaron estos autores se muestran en la Figura 7 y constituyen el 80% de los oligosacáridos que se encuentran en las moléculas de FSH hipofisaria. El 20% restante correspondería a oligosacáridos con otros tipos de estructura, como los oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa que se mostraron en la Figura 6.

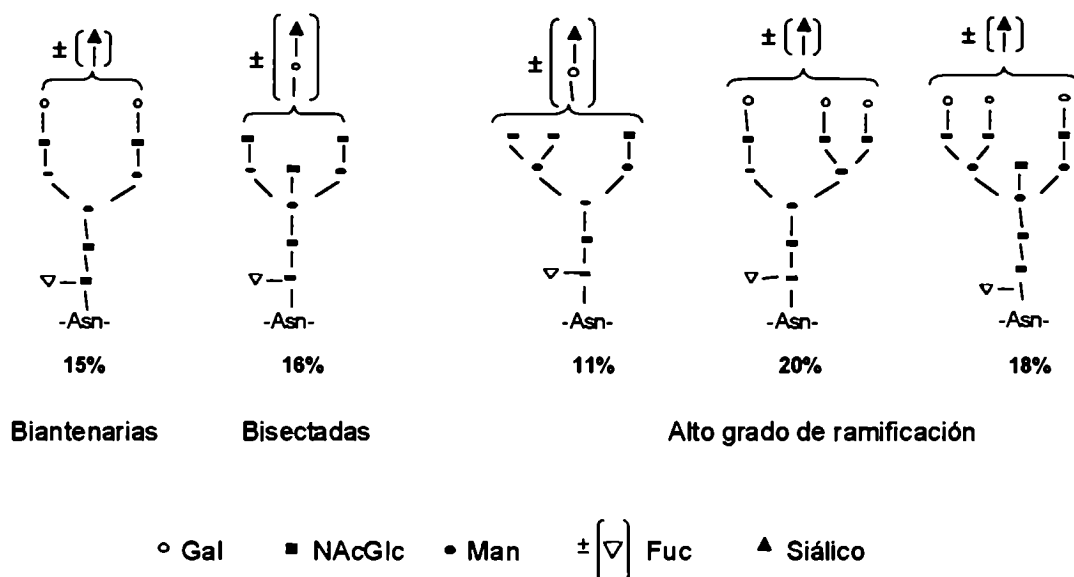


FIGURA 7: Estructura y proporción de los distintos oligosacáridos en la molécula de FSH hipofisaria humana.

Como puede observarse en la figura anterior, las isoformas de FSH pueden presentar diferente contenido en ácido siálico en sus cadenas carbohidratadas. Este residuo le otorga a la isohormona una carga particular determinando un punto isoelectrónico característico. En base a estas diferencias de carga es posible aislar los análogos de carga por diversos métodos de laboratorio tales como el isoelectroenfoque preparativo, el cromatoforfoque y la electroforesis de zona.

6. Función de los oligosacáridos en las glicoproteínas

La importancia de la glicosilación en un variado espectro de fenómenos biológicos ha originado una explosiva expansión de la glicobiología. El procesamiento de los oligosacáridos presentes en una proteína naciente es el proceso más frecuente y más complejo de los eventos post-traduccionales. Estos oligosacáridos pueden presentar estructuras muy simples, como una cadena lineal de residuos azucarados, hasta formas muy complejas como las de cadenas múltiples con alto grado de ramificación; tanto unas como otras pueden presentar una modificación adicional específica incorporando o

removiendo el último componente de la cadena que puede ser un grupo sulfato o ácido siálico.

El mensaje contenido en la porción carbohidratada de una glicoproteína está relacionado con (Montreuil, 1984):

- la protección de la cadena polipeptídica contra el ataque proteolítico
- el alcance y mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína
- la regulación de la inmunogenicidad
- el reconocimiento y asociación con diferentes virus, enzimas y lectinas (particularmente las de membrana)
- el mecanismo de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular

6.1 Función de los oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas

La heterogeneidad molecular constituye una característica común de todas las hormonas proteicas sintetizadas por la hipófisis anterior. Esta heterogeneidad molecular trasciende las diferencias fisicoquímicas entre las moléculas e influencia fuertemente las características biológicas de la hormona: las isohormonas difieren en el tiempo que permanecen en circulación, en la afinidad por el receptor específico de membrana y en la respuesta biológica que inducen en las células blanco (Ulloa-Aguirre y col., 1992a).

Realizando una deglicosilación completa de la hormona glicoproteica se ha podido establecer que la hormona deglicosilada puede acoplar las subunidades α y β (Sairam, 1980); puede reconocer y unirse con alta afinidad al receptor específico de membrana pero es incapaz de desencadenar los mecanismos de transducción del mensaje hormonal en la célula blanco (Sairam y Manjunath, 1982; Manjunath y col., 1982).

En realidad, la deglicosilación de las gonadotrofinas tiene el efecto de convertir a las hormonas de agonistas a antagonistas, pues las formas deglicosiladas, al presentar una mayor afinidad por el receptor específico que la hormona nativa, ocupan los sitios receptores pero no inducen ningún tipo de respuesta biológica en la célula blanco (Dahl y Stone, 1992).

El ácido siálico terminal de la cadena carbohidratada de la molécula de las hormonas proteicas está directamente involucrado en la determinación del tiempo de permanencia de la hormona en circulación (vida media) y por lo tanto de la que se ha denominado biopotencia *in vivo* (Morell y col., 1971; Wide y Wide, 1984; Wide, 1986, 1989).

La razón por la cual la presencia de ácido siálico determina el aumento en la vida media es que las isohormas sialiladas no son reconocidas por el receptor hepático de asialoglicoproteínas (Ashwell y Harford, 1982).

También se ha postulado que el contenido en ácido siálico modula la biopotencia *in vitro* de la hormona pues las isohormonas con mayor contenido en ácido siálico presentan una menor afinidad por el receptor de membrana y producen una menor respuesta biológica en las células blanco. Por el contrario, aquellas isohormonas con menor contenido de ácido siálico en sus cadenas de carbohidratos han mostrado mayor actividad biológica *in vitro* debido principalmente a la mayor afinidad de unión al receptor (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982).

Trabajos recientes realizados utilizando técnicas de mutagénesis dirigida sugieren que las cadenas de carbohidratos presentes en la subunidad α estarían fuertemente relacionados con la inducción de la respuesta biológica en la célula blanco (Valove y col., 1994); el ácido siálico presente en las cadenas carbohidratadas de las subunidad β estaría directamente relacionado con la permanencia de la hormona en circulación (Bishop y col., 1995).

6.2 Significado fisiológico de la heterogeneidad de FSH

La existencia de numerosas isoformas de FSH producidas por la hipófisis anterior que surgen de la variación en el contenido de ácido siálico y por las diferencias en la estructura interna de las cadenas carbohidratadas unidas al polipéptido se conoce como heterogeneidad o polimorfismo de la hormona.

Para poder otorgarle un significado fisiológico al polimorfismo de FSH debería demostrarse que (Ulloa-Aguirre y col., 1995):

- las isoformas sintetizadas son secretadas a la circulación y alcanzan el tejido blanco
- la producción de las isoformas está regulada hormonalmente
- las isoformas pueden diferenciarse funcionalmente.

Existen numerosas evidencias en la literatura que demuestran que todas las isoformas de FSH que han sido sintetizadas en el gonadotropo son secretadas. Como ejemplo, utilizando el hamster dorado como modelo experimental se ha demostrado que el perfil de isoformas de FSH aisladas por isoelectroenfoque a partir de hipófisis es idéntico al observado en el medio de cultivo de células hipofisarias (Ulloa-Aguirre y col., 1983).

La regulación hormonal de la heterogeneidad de la FSH puede ser inferida por los cambios observados en los perfiles de isoformas séricas o hipofisarias asociados al sexo y la edad y en distintas condiciones fisiológicas (Wide, 1982, 1985, 1989). Este punto será desarrollado con mayor detalle en la próxima sección.

El tercer punto, el cual requiere que las distintas isoformas de la hormona puedan inducir efectos biológicos específicos en las células blanco, se ha comenzado a analizar y han sido obtenidas las primeras evidencias que muestran que diferentes isohormonas son capaces de desencadenar diferentes respuestas biológicas (Schaaf y col., 1997; Arey y col., 1997).

6.3 Regulación hormonal de la heterogeneidad de FSH

Las diferencias en el perfil de isoformas que se observan en distintas situaciones fisiológicas que involucran cambios tanto en los niveles de esteroides gonadales como en las características de los pulsos de GnRH indican que la heterogeneidad de la FSH está regulada por estos factores. Un ejemplo de regulación hormonal del polimorfismo se observa durante el ciclo menstrual de la mujer en el cual, durante la fase folicular temprana y durante la fase lútea predominan las isoformas más ácidas, con mayor contenido de ácido siálico, mientras que en la fase folicular tardía y en la mitad del ciclo menstrual se incrementa selectivamente la proporción de isoformas de FSH más básicas, con menor contenido de ácido siálico (Padmanabhan y col., 1988a).

Las variaciones de la heterogeneidad de la FSH observadas durante el ciclo menstrual sugieren que los estrógenos estarían regulando la incorporación de azúcares a los oligosacáridos de la FSH sintetizada y secretada durante la primera mitad del ciclo menstrual.

Evidencias directas del efecto de los estrógenos han sido obtenidas en pacientes con disgenesia gonadal a las cuales se les ha suministrado dietilelbestrol como terapia sustitutiva. Durante el tratamiento, las isoformas de FSH circulantes presentaron una disminución significativa en su contenido de ácido siálico (Padmanabhan y col., 1988a). Este mismo efecto fue observado en mujeres postmenopáusicas bajo tratamiento prolongado con estrógenos (Wide y Naessén, 1994).

En un modelo experimental, utilizando cultivo de células hipofisarias de rata, Ulloa-

Aguirre y colaboradores (1992b) confirmaron el efecto inhibitorio que ejerce el 17β -estradiol sobre la incorporación de ácido siálico a las cadenas carbohidratadas de FSH.

El desarrollo sexual es también una de las situaciones fisiológicas en la cual el aumento de la actividad hipotálamo-gonadal induce cambios en la heterogeneidad molecular de la FSH sintetizada por la hipófisis anterior. En consecuencia, las variaciones en los niveles circulantes de gonadotrofinas que acompañan el desarrollo puberal no se limitan sólo a la cantidad sino también a la calidad de la hormona secretada; de esta forma, la hipófisis regula la biopotencia del estímulo gonadotrófico que impacta en la gonada.

Las primeras evidencias que describen cambios en la heterogeneidad de la FSH hipofisaria durante el desarrollo sexual fueron obtenidas en animales de experimentación: Chappel y Ramaley (1985) observaron que en la rata macho de 29 días de vida, coincidentemente con una elevación significativa del contenido de GnRH hipotalámico, se elevaba en la hipófisis la proporción de isoformas con menor contenido en ácido siálico. Estos resultados sugieren que los cambios en la heterogeneidad de la FSH estarían regulados por la acción del GnRH y de los esteroides gonadales, los cuales inducirían cambios co- y post-traduccionales en el procesamiento de los oligosacáridos presentes en las moléculas de FSH.

El estudio de los cambios en la heterogeneidad de FSH secretada durante el desarrollo puberal humano ha arrojado resultados discordantes. Beitins y colaboradores (1990) y Kletter y colaboradores (1993) no han encontrado cambios en la bioactividad de la FSH sérica medida a través del desarrollo puberal en niñas y varones normales. Sin embargo, Philips y colaboradores (1997) han hallado modificaciones en la carga (directamente relacionada con el contenido de ácido siálico de la hormona) de la FSH circulante en varones normales en las primeras etapas del desarrollo puberal.

Durante la pubertad masculina los niveles de andrógenos en aumento probablemente sean en parte responsables de los cambios en el polimorfismo de FSH. Las primeras evidencias sobre la modificación de las características moleculares de la FSH por acción de los andrógenos fueron obtenidas por Bogdanove y colaboradores, quienes observaron que la administración de andrógenos a ratas macho castradas aumentaba la actividad biológica de la FSH (Diebel y col., 1973; Bogdanove y col., 1974).

Más recientemente, Dahl y Stone (1992) administrando altas dosis de testosterona a hombres normales confirmaron el aumento de la bioactividad de la FSH circulante por acción del andrógeno. El incremento de la actividad biológica *in vitro* de la gonadotrofina se

acompañó con la disminución del contenido de ácido siálico. Por el contrario, la administración de un antagonista de GnRH a hombres normales produjo una rápida y marcada disminución de la bioactividad de la FSH sérica también determinada en un ensayo *in vitro* (Dahl y col., 1986).

Estas observaciones sugieren que los andrógenos regulan la bioactividad de la FSH disminuyendo la incorporación de ácido siálico a la molécula de gonadotrofina.

Sin embargo los trabajos realizados por Kennedy y Chappel (1985) contradicen estas observaciones pues han demostrado que el agregado de testosterona a cultivo de células hipofisarias provenientes de ratas macho adultas aumenta la síntesis y secreción de isoformas con mayor contenido de ácido siálico.

Durante la pubertad se producen asimismo modificaciones en la pulsatilidad de GnRH que podrían modificar el polimorfismo de FSH. Los efectos del GnRH han sido demostrados tanto en cultivos de células hipofisarias (Ulloa-Aguirre y col., 1992b) como en varones y mujeres normales y niñas con síndrome de Turner (Phillips y Wide, 1994; Wide y Albertsson-Wikland, 1990) a los cuales se les administró una dosis única de factor liberador que produjo la aparición de isoformas de FSH menos sialiladas luego de los 60 minutos de administrado.

No solamente se han descrito cambios en el polimorfismo de la FSH por acción de su factor liberador. Magner y colaboradores (1992) han descrito que la administración del factor liberador de tirotrofina (TRH) modifica la estructura de las cadenas carbohidratadas unidas al polipéptido de la TSH. Es interesante señalar que este efecto del factor liberador de tirotrofina está regulado por la presencia de hormonas tiroideas (Schaff y col., 1995).

Todos los estudios mencionados han analizado la heterogeneidad molecular de la FSH en base a los cambios en el contenido del último azúcar de la cadena carbohidratada de las isoformas y los han relacionado con la bioactividad de la hormona determinada *in vitro*. Sin embargo, no se ha establecido aún si los cambios en el polimorfismo de la FSH observados cuando se producen variaciones en el entorno hormonal se limitan al contenido de ácido siálico de la molécula o involucran la totalidad de la estructura de la cadena carbohidratada.

7. Mecanismo de acción de la FSH

La FSH interactúa con receptores específicos en la membrana plasmática de las células de la granulosa en el ovario (Midgley, 1973) y de las células de Sertoli en el testículo (Means y Huckins, 1974). El clonado del receptor de FSH ha permitido establecer que pertenece a la familia de receptores acoplados a la proteína G (Sprengel y col., 1990). La unión de la FSH con su receptor promueve el acoplamiento del complejo hormona-receptor a una proteína G_s (proteína G estimuladora), la cual estimula la adenilato ciclasa provocando un incremento en los niveles intracelulares de AMPc. Como consecuencia de la activación del nucleótido cíclico se produce la activación de la proteína quinasa A. La fosforilación específica por PKA origina cambios en la estructura y función de enzimas, factores regulatorios o proteínas estructurales (Griswold, 1993).

Además de la participación del AMP cíclico como segundo mensajero de la acción de la FSH, se ha demostrado que la FSH produce un incremento de la concentración de calcio intracelular en células de Sertoli de rata (Gorczyńska y Handelsman, 1991).

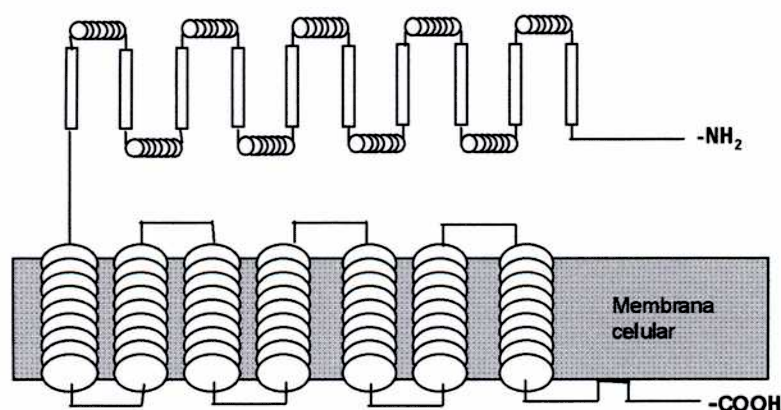


FIGURA 8: Esquema del receptor de FSH

Objetivos

El polimorfismo de FSH ha sido estudiado hasta el presente, en base a las diferencias que presentan las variantes glicosiladas en el contenido de ácido siálico, residuo terminal de las cadenas de oligosacáridos unidas al polipéptido. Sin embargo, la influencia de la estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico sobre las características biológicas de la gonadotrofina no ha sido establecida aún. Tampoco se ha analizado la posible regulación que el entorno hormonal podría ejercer sobre el procesamiento de los oligosacáridos presentes en la molécula.

Los objetivos de esta Tesis fueron los siguientes:

- Determinar la relación que existe entre la biopotencia de la hormona *in vitro*, el contenido de ácido siálico terminal y la estructura interna de la porción carbohidratada de la molécula.
- Identificar isoformas de FSH con estructuras carbohidratadas específicas cuya actividad biológica *in vitro* fuera modificada por el contenido de ácido siálico presente en las mismas y diferenciarlas de aquellas que mantuvieran su biopotencia en forma independiente del contenido de este residuo terminal.
- Determinar el perfil de distribución y la potencia biológica *in vitro* de las isoformas de FSH aisladas de acuerdo a la estructura interna de las cadenas carbohidratadas, circulantes en mujeres jóvenes durante la fase folicular de ciclos menstruales espontáneos y en la postmenopausia.
- Determinar el perfil de distribución de variantes glicosiladas de FSH circulantes de acuerdo al contenido de ácido siálico terminal y a la estructura interna de las cadenas carbohidratadas en la pubertad temprana, media y avanzada en el varón.
- Determinar la biopotencia de la hormona en los distintos estadios del desarrollo puberal.
- Estudiar el efecto del factor liberador de gonadotrofinas sobre las características del polimorfismo de FSH determinado en condiciones basales.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES BIOLOGICOS

La caracterización molecular y biológica de la FSH se realizó en extractos provenientes de hipófisis humanas y en sueros de individuos con diferente entorno hormonal: mujeres durante la fase folicular de ciclos menstruales espontáneos, mujeres postmenopáusicas y niños en distintos estadios del desarrollo puberal.

1.1 Extractos hipofisarios humanos

Los extractos hipofisarios corresponden a la fracción glicoproteica total de hipófisis humanas, provenientes de donantes de diferente sexo y edad, obtenida luego de una extracción etanólica al 10% de acuerdo al método de Jones y col. (1979). Los extractos se mantuvieron a -70°C hasta el momento de ser analizados.

1.2 Suero de mujeres postmenopáusicas (SPM)

Las muestras de suero provinieron de 10 voluntarias postmenopáusicas sanas (55-68 años de edad). Estas mujeres habían interrumpido sus ciclos menstruales por lo menos cinco años antes de su inclusión en este estudio. Ninguna de las voluntarias estudiadas recibía tratamiento hormonal o se encontraba bajo medicación alguna cuando se realizaron las extracciones.

La caracterización de la FSH proveniente de estos sueros se realizó en forma individual en 5 muestras. Las restantes 5 muestras se combinaron y la muestra combinada resultante se estudió siguiendo los mismos procedimientos utilizados en las muestras individuales.

1.3 Suero de mujeres en fase folicular (SFF)

Las muestras de suero fueron obtenidas en la fase folicular de ciclos menstruales espontáneos (día 13) de 10 voluntarias jóvenes (20-28 años de edad). Ninguna de las voluntarias estudiadas recibía tratamiento hormonal o se encontraba bajo medicación alguna cuando se realizaron las extracciones. La caracterización de la FSH proveniente de estos sueros se realizó en forma individual en 5 muestras. Las restantes 5 muestras se combinaron y

la muestra combinada resultante se estudió siguiendo los mismos procedimientos que en las muestras individuales.

1.4 Sueros de niños en distintos estadios del desarrollo puberal

Se seleccionaron 30 varones entre 7 y 18 años de edad que concurren a consulta al Servicio de Endocrinología del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" de la ciudad de Buenos Aires, los cuales no presentaban ninguna alteración desde el punto de vista del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.

Los niños fueron agrupados de acuerdo al estadio de desarrollo puberal descriptos por Tanner (Marshall y Tanner, 1970) en: pubertad temprana (PT; estadio de Tanner I-II, n=10), pubertad media (PM; estadio de Tanner III, n=13) y pubertad avanzada (PA; estadio de Tanner IV-V, n=9), teniendo en cuenta la edad cronológica (EC), el volumen testicular (VT), el vello pubiano (VP), los niveles de testosterona plasmática (T) y de las gonadotrofinas séricas, FSH y LH. La evaluación clínica fue realizada por la Dra. Silvia Gottlieb y el Dr. César Bergadá.

La determinación de los niveles de FSH y LH se realizó sobre las muestras séricas tomadas en condiciones basales y a los 20, 30 y 60 minutos posteriores a un estímulo agudo con 25 µg de GnRH en los niños en pubertad temprana o 50 µg de GnRH en los niños en pubertad media y avanzada. La caracterización de la FSH circulante en estos niños se realizó en sueros obtenidos en condiciones basales y en sueros obtenidos 60 minutos después de la administración de GnRH.

Los sueros fueron separados por centrifugación a 700xg y fueron mantenidos en condiciones de esterilidad a -70°C hasta el momento de su análisis.

2. DROGAS Y REACTIVOS

El buffer de cromatofoco Polybuffer-74, la resina de intercambio PBE-94, los anfolitos Pharmalyte, rango de pH 4.0-6.5, Sephadex G-25 y las microcolumnas de Sephadex G-25, PD-10, fueron provistos por Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia.

Los anfolitos Iso-Lyte, rango de pH 3-10, fueron obtenidos en ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA.

Las lectinas utilizadas, Concanavalina A conjugada a Sepharosa 4B, Lectina de Lenteja (Lens Culinaris) conjugada a Sepharosa 4B y Aglutinina de Germen de Trigo (Triticum Vulgaris) conjugada a Sepharosa 6MB, así como las membranas de diálisis de celulosa, con un tamaño de poro de 12.000 y el detergente CHAPSO (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2- hidroxi-1-propano sulfonato) fueron provistos por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Las membranas concentradoras Centriprep, con un tamaño de poro de 10.000, fueron provistas por Amicon, Beverly, MA, USA.

Las placas de cultivo fueron provistas por Limbro, Flow Laboratories, McLean, VA, USA.

El kit comercial para la determinación de FSH por radioinmunoensayo de doble anticuerpo fue obtenido en Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, CA, USA. El estándar de referencia utilizado en este radioinmunoensayo fue el W.H.O., 2nd International Reference Preparation, IRP 78/549.

Los estándares de referencia de FSH, LER 907 y hFSH-2, el estándar de FSH utilizado para marcación, hFSH-I-SIAFP-1, el anticuerpo de FSH, anti-hFSH-6, y el anticuerpo de LH, anti-hLH-3 fueron gentilmente donados por el National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, NIDDK, Bethesda, MD, USA.

Los estándares de referencia de FSH y LH, 1st International Reference Preparation, IRP 69/104 y 68/40 respectivamente, fueron donados por la Organización Mundial de la Salud, W.H.O.

Los esteroides radioactivos [2,4,6,7-³H(N)]-estradiol, [1,2,6,7-³H(N)]-progesterona y [1,2,6,7-³H(N)]-testosterona fueron provistos por New England Nuclear, Boston, MA, USA.

Los esteroides no radioactivos se adquirieron en Steraloids, Wilton, NH, USA.

Los anticuerpos específicos utilizados en la determinación de esteroides plasmáticos fueron provistos por Immunocorp, Montreal, PQ, Canadá.

Todos los demás reactivos, medios de cultivo y las drogas utilizadas fueron provistas por Sigma.

El isoelectroenfoque preparativo se realizó utilizando una celda con capacidad para 60 ml de muestra Rotofor Cell (Bio Rad, Hercules, CA, USA), una fuente de poder de potencia constante (ECPS 2000/300, Pharmacia) y un baño refrigerante (Forma Scientific Inc, Marietta, OH, USA).

3. METODOS

3.1 CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH HIPOFISARIA HUMANA

3.1.1 Cromatoenfoque

La fracción glicoproteica total obtenida de las hipófisis humanas fue sometida a cromatoenfoque siguiendo la técnica descrita por Ulloa-Aguirre y col. (1990).

El cromatoenfoque permite la separación de una proteína en sus componentes microheterogéneos. Esta separación se realiza en base a los puntos isoeléctricos y la técnica es considerada el análogo cromatográfico del isoelectroenfoque. Este procedimiento fue descrito originalmente en 1978 por Sluyterman y Elgersma, y utiliza una resina de intercambio iónico eluída con un buffer apropiado. La resina posee grupos cargados con capacidad buffer, que al ser titulados con el buffer de elución originan un gradiente de pH en el interior de la columna. Las proteínas eluyen de la columna a un pH igual a su punto isoeléctrico.

Los extractos hipofisarios fueron equilibrados en el buffer de elución del cromatoenfoque (Polybuffer-74, diluido 1:8 en agua deionizada, pH 4.0) mediante una cromatografía previa en microcolumnas (7.0 x 0.6 cm) de Sephadex G-25.

La columna de cromatoenfoque (30 x 1 cm) conteniendo resina de intercambio iónico PBE-94, fue equilibrada con 15 volúmenes de buffer Imidazol-HCl 0.025 M, pH 7.4. Antes de la siembra de los extractos hipofisarios, se aplicaron a la columna de cromatoenfoque 5 ml de buffer de elución de pH 4.0 con el objeto de evitar someter a las proteínas de la muestra a un cambio extremo de pH al ingresar a la columna. Luego se sembraron los extractos hipofisarios los cuales contenían entre 80 y 95 µg de FSH inmunoreactiva (hFSH-2). Se recogieron entre 110 y 130 fracciones de 2 ml cada una a una velocidad de flujo de 15 ml/h. Se midió el pH de cada una de las fracciones y cuando se alcanzó un pH igual a 4.0, el buffer de elución fue reemplazado por una solución de NaCl 1 M con el objeto de recuperar el material que no hubiera eluído en el rango de pH 7.4-4.0. A los análogos de carga eluídos con NaCl 1 M se les asignó arbitrariamente un valor de punto isoeléctrico de 3.8. Todos los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados a 4°C. Se determinó el contenido inmunológico de FSH por radioinmunoanálisis en todas las fracciones del cromatoenfoque. Se agruparon las fracciones eluidas, las cuales se denominaron análogos de carga I a V, correspondientes a los

siguientes rangos de pH: I: pH:7.4-6.6; II: pH:6.2-5.5; III: pH: 5.3-5.0; IV: pH: 4.7-4.0; V: pico de sal.

Con el objeto de obtener una cantidad de FSH suficiente para su posterior análisis en cada uno de los rangos de pH se combinaron los análogos de carga de idéntico pH provenientes de cuatro cromatoenfoques de extractos hipofisarios humanos, los cuales fueron procesados siguiendo el mismo procedimiento y sembrando la misma cantidad de FSH inmunológica en cada columna de cromatoenfoque. El material así obtenido fue almacenado a -70°C hasta su posterior análisis. La recuperación de FSH luego de la separación varió entre 60 y 80% de la cantidad total originalmente sembrada en la columna.

3.1.2 Tratamiento de los análogos de carga I a V obtenidos por cromatoenfoque

Los análogos de carga obtenidos en el cromatoenfoque fueron dializados exhaustivamente con el objeto de eliminar el buffer de elución del cromatoenfoque. La diálisis se llevó a cabo a 4°C contra agua destilada durante 24 hs. y posteriormente contra carbonato de amonio, para facilitar la liofilización, durante 24 hs.; en ambos casos en una relación de volúmenes de 8 ml de muestra/4 l de solución de diálisis. Luego de la diálisis las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a -70°C.

El material liofilizado se resuspendió posteriormente en un volumen apropiado de buffer fosfato salino (PBS; fosfato de sodio 0.05 M, NaCl 0.150 M, pH 7.4), conteniendo 1% de albúmina sérica bovina.

Se separaron diferentes alícuotas para la determinación del contenido de FSH inmuno y bioactiva y para la cromatografía seriada en lectinas.

3.1.3 Determinación de I-FSH por radioinmunoensayo

Sobre los análogos de carga I a V obtenidos en el cromatoenfoque se determinó el contenido de I-FSH mediante el empleo de un radioinmunoensayo de doble anticuerpo.

La iodinación de la hormona proteica se realizó siguiendo el método de cloramina-T y la posterior purificación se efectuó a través de una columna de Sephadex G-25 (Greenwood y col., 1963). La incubación con el primer anticuerpo y el trazador se realizó a temperatura ambiente durante 24 hs. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo incubando durante 2 hs. a 4°C. Se separó la fracción libre de la unida con el agregado de polietilenglicol al 6% y

posterior centrifugación, determinándose la radioactividad presente en los precipitados que contenían la fracción unida. El estándar de FSH utilizado fue LER 907. La sensibilidad del ensayo fue de 9.2 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores que 9 y 12%, respectivamente.

3.1.4 Determinación de bioactividad de FSH *in vitro*

Sobre los análogos de carga I a V aislados en el cromatofoco se determinó también la actividad biológica de FSH (B-FSH). Para ello se utilizó el método descrito por Padmanabhan y colaboradores (1987) el cual se basa en la estimulación de la actividad aromataza que produce la FSH en células de Sertoli provenientes de ratas de la cepa Sprague-Dawley de 8 días de edad.

Los testículos fueron decapsulados y se incubaron en medio de cultivo conteniendo 0.03% de colagenasa y 0.003% de inhibidor de tripsina de soja por 5 minutos a temperatura ambiente. El medio de cultivo consistió en una mezcla 1:1 de medio Ham F10 y medio Dulbecco modificado por Eagle, suplementado con 14.3 mM de bicarbonato de sodio, 100 U/I de penicilina y 1.1 μ M de anfotericina B. Luego de la dispersión inicial con colagenasa, los túbulos seminíferos sedimentaron y se descartó el sobrenadante conteniendo las células intersticiales. Los túbulos seminíferos se lavaron repetidamente y se realizó un segundo tratamiento con colagenasa. Los túbulos fueron incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de colagenasa 0.03%, inhibidor de tripsina 0.003% y desoximibonucleasa 0.03%. La preparación celular así obtenida se lavó varias veces y se resuspendió en el medio de cultivo anteriormente descrito con el agregado de hidrocortisona 8.3 nM, vitamina E 9.3 μ M, insulina 0.9 μ M, transferrina 60 nM y metilisobutilxantina 0.1 mM. Se determinó el contenido de ADN del preparado siguiendo el método de Labarca y Paigen (1980). Este preparado celular fue cultivado a una densidad de 33 μ g ADN/pozo en placas de 24 pozos a 34°C bajo una atmósfera de 5% CO₂ : 95% aire. Se cultivaron las células durante 72 hs. y luego se removió el medio. Las monocapas celulares se lavaron una vez con medio y se incubaron nuevamente con el medio antes mencionado conteniendo 10 μ g/l de Factor de Crecimiento Epidérmico, albúmina sérica bovina 1%, 19-hidroxiandrostenediona 2 μ M y el estándar de FSH o la muestra a analizar. El estándar empleado fue hFSH-2. Luego de 18 hs. de incubación, se aspiró el medio y se centrifugó. Los sobrenadantes resultantes se almacenaron a -70°C hasta la determinación de los niveles de estradiol (E₂) producidos por radioinmunoanálisis (Escobar y col., 1976).

La sensibilidad del bioensayo fue de 0.04 ng/ml (hFSH-2), y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 15 y 18% respectivamente.

3.1.5 Determinación de la relación bioactividad / inmunoactividad

Para determinar la relación existente entre la bioactividad e inmunoactividad de FSH expresadas en hFSH-2 y LER 907 respectivamente, se determinó la inmunopotencia del hFSH-2 en el RIA utilizado y se corrigieron los niveles de bioactividad considerando que 1 ng hFSH-2 equivale a 95 ng LER 907.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN LECTINAS

El estudio de la estructura de los oligosacáridos unidos a las glicoproteínas presenta la dificultad de la gran variabilidad en el número y tipo de residuos sustituyentes de la cadena núcleo de carbohidratos y la escasa cantidad de material, que en general se dispone, para obtener especies puras por fraccionamiento.

La cromatografía de afinidad en lectinas constituye un método simple y posee la resolución necesaria para el fraccionamiento de varias isoformas de una glicoproteína con diferentes estructuras en sus cadenas carbohidratadas.

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que poseen la capacidad de aglutinar células y precipitar oligosacáridos complejos. Cada lectina se une a una secuencia específica de azúcares presentes en un oligosacárido unido a la glicoproteína. El uso de diferentes lectinas inmovilizadas en un soporte inerte con especificidades de unión perfectamente establecidas, permite fraccionar e identificar estructuralmente las diferentes isoformas o variantes de glicosilación de una glicoproteína.

En el presente estudio se utilizaron las lectinas Concanavalina A (Con-A), Aglutinina de Germen de Trigo (WGA) y Lectina de Lenteja (LCH) en forma seriada, con el objeto de caracterizar las cadenas carbohidratadas internas al ácido siálico terminal de los análogos de carga I a V de las variantes glicosiladas de FSH humana, aislados de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.

3.1.6 Cromatografía en Concanavalina A

La Concanavalina A ha sido ampliamente usada para la separación de isoformas de diversas proteínas, entre las que se encuentran FSH (Chappel, 1981; Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982; Foulds y Robertson, 1983; Papandreou y col., 1993), hCG (Blithe, 1990), LH (Dufau y col., 1972) y la proteína ligadora de esteroides sexuales (SHBG) (Danzo y Black, 1990).

Esta lectina posee alta afinidad de unión a residuos manosa o glucosa terminales, o a residuos glucosa o manosa internos sustituidos únicamente en la posición C-2 por otro azúcar (Ogata y col., 1975).

Teniendo en cuenta la especificidad de unión de esta lectina se pueden separar tres tipos de estructuras siguiendo el esquema de elución propuesto por Narasimhan y colaboradores (1979):

- las que no son retenidas por la lectina (NR), que corresponden a polipéptidos con cadenas de carbohidratos muy ramificadas y cadenas biantenarias complejas con un residuo NAcGlc bisectado;
- las que son débilmente retenidas por la lectina (DR), que corresponden a variantes glicosiladas con cadenas biantenarias completas y truncadas con residuos galactosa unidos a NAcGlc.
- las que son fuertemente retenidas por la lectina (FR), que corresponden a isoformas con cadenas con alto contenido en manosa o cadenas del tipo híbrido.

Los análogos de carga I a V de la FSH obtenidos luego del cromatoenfoco fueron sometidos a cromatografía de afinidad en Con-A, separándose de esta manera tres grupos de isoformas con diferentes estructuras en sus cadenas carbohidratadas. Se muestran las diferentes estructuras de oligosacáridos mencionadas previamente en el esquema de diseño experimental de la página 51-54.

La cromatografía en Concanavalina A se realizó de acuerdo al método descripto por Cheng y colaboradores (1984) y Danzo y Black (1990).

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Se utilizaron columnas de 0.6 cm de diámetro por 15 cm de alto conteniendo 2.5 ml de gel de lectina inmovilizada. La columna fue equilibrada con buffer de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM,

MnCl₂ 1 mM, pH 7.4).

Entre 0.3 y 10 µg de FSH (hFSH-2), provenientes de los análogos de carga I a V aislados en el cromatoenfoque, fueron sembrados en Concanavalina A. Se dejó ingresar el material a la columna. Se añadió 1 ml de buffer de equilibrio y luego de que el mismo entrara a la columna se interrumpió el flujo durante una hora para permitir la interacción de la muestra con la lectina. Luego de este período de incubación, se agregaron a la columna 10 ml de buffer de equilibrio y se recogieron las isoformas no retenidas (NR).

Se añadió luego 1 ml de buffer de equilibrio conteniendo metil αD-glucopiranosido 10 mM (glucósido) y se interrumpió el flujo por una hora. Se agregaron 10 ml del mismo buffer y se recogieron las isoformas débilmente retenidas (DR).

Finalmente, se añadió 1 ml de buffer de equilibrio conteniendo metil αD-manopiranosido 100 mM (manósido) y se dejó interactuar por una hora. Se agregaron 10 ml adicionales de manósido y se recogieron las isoformas de FSH fuertemente retenidas por la lectina (FR). Se comprobó que no era necesario utilizar una mayor concentración de azúcar en el buffer de equilibrio pues toda la I-FSH había sido eluida. El flujo de la columna se mantuvo en 14 ml/h. La recuperación varió entre 75-90%.

3.1.7 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en Con-A

Los eluidos cromatográficos conteniendo las isoformas de FSH no retenidas, débilmente retenidas y fuertemente retenidas por la lectina provenientes de los análogos de carga I a V se concentraron hasta un volumen inferior a 1 ml utilizando membranas Centriprep. Estos concentrados se diluyeron hasta 6 ml con solución fisiológica y se concentraron nuevamente. Este procedimiento, que fue repetido 2 veces, tuvo como objetivo disminuir la concentración de sales y azúcares de la muestra. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. Los concentrados se almacenaron a -70°C hasta que se realizó la determinación del contenido de FSH inmunológica y biológica y el aislamiento de isoformas por cromatografía en las sucesivas lectinas.

3.1.8 Cromatografía en Aglutinina de Germen de Trigo

La cromatografía en Aglutinina de Germen de Trigo ha sido utilizada en forma seriada con la cromatografía en Concanavalina A para el análisis de variantes glicosiladas

que han sido fuertemente retenidas en Con-A (Cummings y Kornfeld, 1982). La Aglutinina de Germen de Trigo reconoce las cadenas de oligosacáridos que poseen residuos NAcGlc unidos a la manosa β del pentasacárido núcleo (Yamamoto y col., 1981). En consecuencia, posibilita la separación de isoformas con cadenas de oligosacáridos de alto contenido en manosa, que no son retenidas por la lectina (NR) de las isoformas con cadenas de oligosacáridos de tipo híbrido con residuos NAcGlc expuestos que quedan retenidas en WGA (R). Los requerimientos estructurales para la unión de los oligosacáridos a esta lectina no permiten la separación de las isoformas que constituyen el grupo no retenido en Con-A, con cadenas de oligosacáridos triantenarias y bisectadas, o de las isoformas débilmente retenidas en Con-A, con cadenas de oligosacáridos biantenarias y truncadas (Yamamoto y col., 1981). Por estos motivos solamente se procesaron en esta lectina las isoformas fuertemente retenidas en Con-A, provenientes de las isoformas de FSH contenidas en los análogos de carga II a V, con cadenas de oligosacáridos con estructuras de tipo híbrido y de alto contenido en manosa. La baja cantidad de FSH contenida en los eluidos de Con-A del grupo I de análogos de carga, no permitió su análisis en esta segunda cromatografía.

Se muestran las diferentes estructuras de oligosacáridos mencionadas en el esquema de diseño experimental en la página 52.

La cromatografía en WGA se realizó siguiendo el método descrito por Yamamoto y colaboradores (1981).

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Se utilizaron columnas de 0.6 cm de diámetro por 15.0 cm de alto conteniendo un volumen de gel de 2.5 ml. La columna fue equilibrada con buffer fosfato salino (PBS; fosfato de sodio 0.05 M, NaCl 0.150 M, pH 7.4). Se sembraron entre 0.5 y 1 μ g de I-FSH (hFSH-2) y se dejó ingresar el material en la columna. Se añadió 1 ml de PBS y luego de que el mismo entrara a la columna, se interrumpió el flujo durante una hora para permitir la interacción de la muestra con la lectina. Luego de este período de incubación, se agregaron a la columna 7 ml de PBS y se recogieron las isoformas no retenidas (NR).

Se añadió luego 1 ml de PBS conteniendo NAcGlc 200 mM y se interrumpió el flujo de la columna por una hora. Se agregaron 7 ml del mismo buffer con NAcGlc y se recogieron las isoformas retenidas (R). No fue necesario utilizar una mayor concentración de azúcar en el buffer PBS para eluir el material de la columna. El flujo de la columna se mantuvo en 5 ml/h. La recuperación varió entre 70-80%.

3.1.9 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en WGA

Los eluidos conteniendo las isoformas de FSH no retenidas y retenidas por la lectina se concentraron como se describió en 3.1.7. Los concentrados se almacenaron a -70°C hasta la posterior determinación de FSH inmuno y bioactiva.

3.1.10 Cromatografía en Lectina de Lenteja

La cromatografía de afinidad en Lectina de Lenteja ha sido utilizada para el fraccionamiento de isoformas séricas de hCG, ya sea en forma independiente de otras lectinas (Skarulis y col., 1992), o luego de una cromatografía en Concanavalina A (Blithe, 1990). Esta lectina permite la separación de glicoproteínas conteniendo un residuo fucosa en su cadena carbohidratada (R), de aquellas proteínas que no lo poseen (NR) (Cummings y Kornfeld, 1982). La especificidad de unión a esta lectina ha sido descrita por Kornfeld y colaboradores (1981), quienes sostienen que la presencia de un residuo fucosa unido al azúcar NAcGlc más interno de la cadena carbohidratada, próximo al aminoácido asparagina, es esencial para que exista alta afinidad de unión.

Además de la fucosa, para una unión con alta afinidad a la LcH, se requiere la presencia de dos residuos manosa. Si uno de estos residuos se encontrara sustituido por otros azúcares en sus carbonos 2 y 4, no sería posible la unión a la lectina. En cambio, si la sustitución fuera en los carbonos 2 y 6 de la manosa, la interacción de la estructura carbohidratada con la lectina no se encontraría impedida. Es decir, en un grupo de isoformas previamente separado por la cromatografía en Concanavalina A que no hubiera sido retenido, cuya estructura de cadena carbohidratada fuese triantenaria, no sería posible dilucidar con certeza si la falta de unión a la LcH se debería a la ausencia del residuo fucosa en los oligosacáridos o a dicha estructura triantenaria particular que impediría la unión con la lectina.

Las isoformas contenidas en los análogos de carga II a V que fueron débilmente y fuertemente retenidos en la cromatografía en Con-A fueron sometidos a cromatografía de afinidad en Lectina de Lenteja. El bajo contenido de FSH presente en los eluidos de Con-A del grupo I de análogos de carga, no permitió su análisis en LcH. Se muestran las diferentes estructuras de oligosacáridos mencionadas en el esquema de diseño experimental en la página 52.

La técnica utilizada para la cromatografía en LcH fue descrita por Kornfeld y col. (1981).

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Se utilizaron columnas de 0.6 cm de diámetro por 15.0 cm. de alto conteniendo un volumen de gel de 2.5 ml. La columna fue equilibrada con buffer Tris 50 mM, conteniendo 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, pH 7.0 (Buffer de equilibrio).

Se sembraron entre 0.5 y 1 µg de FSH inmunoactiva (hFSH-2). Se dejó ingresar el material a la columna. Se añadió 1 ml de buffer de equilibrio y luego de que el mismo entrara a la columna, se interrumpió el flujo durante una hora para permitir la interacción de la muestra con la lectina. Luego de este período de incubación, se agregaron a la columna 7 ml de buffer de equilibrio y se recogieron las isoformas no retenidas (NR).

Se añadió luego 1 ml de buffer de equilibrio conteniendo metil αD-manopiranososa 100 mM (manósido) y se interrumpió el flujo por una hora. Se agregaron 7 ml del mismo buffer y se recogieron las isoformas retenidas (R). No fue necesario utilizar una concentración de azúcar mayor en el buffer de equilibrio para eluir el material de la columna. El flujo de la columna se mantuvo en 12 ml/h. La recuperación varió entre el 70-75%.

3.1.11 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en LcH

Los eluidos conteniendo las isoformas de FSH no retenidas y retenidas por la lectina se concentraron como se describió en 3.1.7. Los concentrados se almacenaron a -70°C hasta la posterior determinación de FSH inmuno y bioactiva.

3.2 CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTES EN LA POSTMENOPAUSIA Y EN LA FASE FOLICULAR DE CICLOS MENSTRUALES NORMALES

3.2.1 Tratamiento de los sueros

Los sueros a analizar por cromatografía de afinidad en Con-A fueron dializados con el objeto de eliminar los esteroides endógenos y disminuir la fuerza iónica. La diálisis se llevó a cabo a 4°C, durante toda la noche contra buffer fosfato 10 mM, pH 7.4, en una relación de

volúmenes de 1 ml de suero/ 300 ml de buffer.

3.2.2 Cromatografía en Concanavalina A

Se sembraron aproximadamente 0.35 ml de suero dializado conteniendo un máximo de 21 mg de proteína total. La técnica utilizada fue idéntica a la descrita en 3.1.6, con la única diferencia de que en esta ocasión se recogieron fracciones individuales de los eluidos de la cromatografía. De esta manera se obtuvieron 10 fracciones de 1 ml, constituyendo las isoformas no retenidas, 10 fracciones de 1 ml, constituyendo las isoformas débilmente retenidas y 10 fracciones de 1 ml, constituyendo las isoformas fuertemente retenidas. En cada una de las fracciones se determinaron proteínas totales.

Los niveles altos de I-FSH que contenían los sueros provenientes de mujeres postmenopáusicas permitieron la determinación de FSH inmunológica en las fracciones individuales eluidas de la cromatografía en Con-A. Por otro lado, dado que los niveles de FSH en los sueros de mujeres en fase folicular son bajos, fue necesario sembrar alícuotas idénticas de suero, individuales o combinados, en cuatro columnas que se corrieron en forma paralela para obtener una cantidad suficiente de FSH en cada grupo de isoformas. Para este fin, las fracciones NR, DR y FR provenientes de las cuatro columnas fueron combinadas y se concentraron como se describió en 3.1.7.

Los concentrados fueron almacenados a -70°C hasta la posterior determinación de FSH inmuno y bioactiva.

3.2.3 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas sobre los sueros y sobre las fracciones cromatográficas de Con-A se realizó siguiendo el método descrito por Lowry y colaboradores (1951) utilizando albúmina bovina como estándar.

3.2.4 Determinación de inmunoreactividad de FSH

La actividad inmunológica de FSH presente en los sueros, en las fracciones de cromatografía en Con-A y en los concentrados obtenidos posteriormente fue determinada por radioinmunoanálisis utilizando un ensayo de preparación comercial de doble anticuerpo. El

estándar utilizado fue el W.H.O., 2nd International Reference Preparation, IRP 78/549. La sensibilidad de este ensayo fue 0.7 UI/l y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores que el 10%.

3.2.5 Determinación de bioactividad de FSH *in vitro*

La actividad biológica de FSH presente en los sueros de mujeres y en los concentrados obtenidos luego de la cromatografía en Con-A fue determinada como se describió en 3.1.4.

3.2.6 Determinación de la relación bioactividad / inmunopotencia

Para determinar la relación existente entre la bioactividad e inmunopotencia de FSH expresadas en hFSH-2 y 2ndIRP 78/549 respectivamente, se determinó la inmunopotencia del hFSH-2 en el RIA utilizado y se corrigieron los niveles de bioactividad considerando que 1 ng de hFSH-2 equivale a 2 mUI del 2nd IRP 78/549.

3.2.7 Determinación de esteroides en suero

Los niveles de estradiol y progesterona en los sueros de las mujeres en fase folicular y mujeres postmenopáusicas fueron determinados por radioinmunoanálisis, previa extracción con éter etílico, según los métodos descriptos por Escobar y colaboradores (1976) y Rey y colaboradores (1995), respectivamente.

3.3 CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTES EN DISTINTOS ESTADÍOS DEL DESARROLLO PUBERAL DEL VARÓN

3.3.1 Tratamiento de los sueros

Los sueros a analizar por isoelectroenfoque preparativo fueron dializados para reducir la fuerza iónica de estas muestras y adecuarla al isoelectroenfoque. La diálisis se llevó a cabo a 4°C durante 2 hs. 30 minutos en una relación de volúmenes de 1 ml de suero/250 ml de NaCl 10 mM, realizando dos cambios de la solución salina en el transcurso de la misma, para

acelerar el proceso.

3.3.2 Isoelectroenfoque preparativo

El aislamiento de los análogos de carga de FSH (moléculas con distinto punto isoeléctrico) presentes en los sueros de los niños en distintos estadios del desarrollo puberal se realizó mediante la utilización de isoelectroenfoque preparativo.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una celda preparativa que permite el procesamiento de muestras con un elevado contenido proteico, pudiéndose en este caso utilizar hasta un volumen máximo de 10 ml de suero. La celda de isoelectroenfoque posee una cámara de enfoque de forma cilíndrica con una varilla cerámica de refrigeración ubicada en forma longitudinal en el centro de la celda. La cámara de enfoque está dividida en compartimientos determinados por membranas de poliéster de 6 μm de espesor ubicadas en forma paralela, transversal al eje de la celda. Estas membranas determinan 20 compartimientos, cada uno de los cuales corresponde a una fracción con un pH determinado. La separación de la muestra ocurre dentro del espacio que se establece entre la cámara y la varilla cerámica. El diseño de esta celda permite realizar todo el procedimiento de separación de isoformas en fase líquida, conservando de esta manera la actividad biológica en la muestra analizada.

Antes de efectuar el enfoque, se realizó un pre-enfoque para establecer el gradiente de pH, con una combinación de anfolitos Iso-Lyte al 3.5% con un rango de pH 3-10 y Pharmalyte al 0.5% con un rango de pH 4.0-6.5 con el objeto de reforzar este último rango en el gradiente de pH donde enfoca la FSH. Para el enfoque, la concentración total de anfolitos utilizada fue entonces de 4%, con 1% de detergente no iónico CHAPSO. Se sembraron en la celda de isoelectroenfoque entre 3 y 10 ml de suero y el enfoque se llevó a cabo durante 4 hs. a potencia constante de 12 W, manteniendo refrigerada la celda. Luego de realizado el enfoque, el contenido de cada compartimiento fue aspirado mediante un sistema de recolección simultánea. Se recogieron 20 fracciones de 2 ml cada una.

Se separaron diferentes alícuotas de las fracciones recogidas para la determinación del pH y del contenido de proteínas totales.

3.3.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque

Luego de determinar el pH, las fracciones se dializaron exhaustivamente en forma individual para eliminar los anfolitos y el detergente. La diálisis se llevó a cabo durante 36 hs. a 4°C en una relación de volúmenes de 2 ml de muestra/l de solución de NaCl 1 M. Se realizaron cambios de la solución salina cada 8 hs. durante un período de 24 hs. y posteriormente, se realizaron cambios cada 3 hs. con solución fisiológica hasta completar un total de 36 hs. de diálisis. Este procedimiento fue necesario para lograr la total eliminación de los restos de anfolitos y detergente en las muestras, ya que tanto los anfolitos como el detergente interfieren en forma significativa en el radioinmunoensayo. En una alícuota adecuada de las muestras así tratadas se determinó el contenido de FSH inmunológica por RIA y el resto del material se almacenó a -70°C hasta su posterior análisis.

3.3.4 Determinación de proteínas

El contenido de proteínas totales en las fracciones del isoelectroenfoque preparativo fue determinado midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 280 nm. Los valores de absorbancia fueron interpolados en una curva estándar realizada con albúmina sérica bovina.

3.3.5 Determinación de I-FSH por radioinmunoensayo

La determinación del contenido de FSH inmunológica sobre los concentrados de las fracciones del isoelectroenfoque preparativo se realizó mediante el empleo del radioinmunoensayo descrito en 3.1.3. Con el objeto de obtener niveles adecuados de FSH para su posterior análisis en Concanavalina A, las fracciones conteniendo actividad inmunológica de FSH fueron combinadas y concentradas en membranas Centriprep y fueron almacenadas a -70°C hasta la determinación de actividad biológica y su análisis en cromatografía en Concanavalina A.

3.3.6 Determinación de bioactividad de FSH *in vitro*

La actividad biológica de FSH presente en los concentrados provenientes del

isoelectroenfoque fue determinada como se describió en 3.1.4.

3.3.7 Determinación de la relación bioactividad / inmunoactividad

Para determinar la relación existente entre la bioactividad e inmunoactividad de FSH se procedió como se describió en 3.1.5.

3.3.8 Cromatografía en Concanavalina A

Se reunieron los concentrados provenientes de las fracciones del isoelectroenfoque preparativo que contenían FSH. Esta preparación, la cual reunió todos los análogos de carga, fue concentrada, y este último material fue sembrado en una columna de Con-A. La técnica utilizada para realizar la cromatografía fue descrita en 3.1.6. Se recogieron los eluidos correspondientes a las fracciones que contenían las isoformas no retenidas, débilmente retenidas y fuertemente retenidas por la lectina.

3.3.9 Tratamiento del material obtenido por cromatografía en Con-A

Los eluidos cromatográficos conteniendo las isoformas de FSH NR, DR y FR provenientes de la cromatografía en Con-A fueron concentrados hasta un volumen menor que 1 ml utilizando membranas Centriprep. Estos concentrados se diluyeron hasta 6 ml con solución fisiológica y se concentraron nuevamente. Con el objeto de disminuir la concentración de sales y azúcares de la muestra este procedimiento fue repetido 2 veces. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. Los concentrados se almacenaron a -70°C hasta la determinación del contenido de FSH inmunológica (descrito en 3.3.5).

3.3.10 Determinación de los niveles de gonadotrofinas séricas, FSH y LH, en sueros de niños

El contenido de FSH y LH inmunológicas en las muestras séricas obtenidas en condiciones basales y 20, 30 y 60 minutos posteriores a la administración de GnRH fue determinado por radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando los estándares W.H.O., FSH 1stIRP 69/104 y LH 1stIRP 68/40. La técnica utilizada fue descrita en 3.1.3.

3.3.11 Determinación de esteroides en suero

Los niveles de testosterona sérica de los niños en distintos estadios puberales fueron determinados por radioinmunoanálisis siguiendo el método descrito por Rey y colaboradores (1995).

4. ANALISIS ESTADISTICO

La sensibilidad de los radioinmunoensayos descritos en 3.3.10 no permitió detectar los niveles de gonadotrofinas en niños en pubertad temprana. Por este motivo, para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó la tabla de números aleatorios de Linder (1969). El límite inferior del rango de números considerado fue el valor más frecuente de gonadotrofinas séricas en niños entre 7 y 13 años de edad, determinados por un inmunoensayo fluorométrico de mayor sensibilidad desarrollado recientemente en este Centro. Se tomaron números al azar mayores de 0.3 y menores de 1.

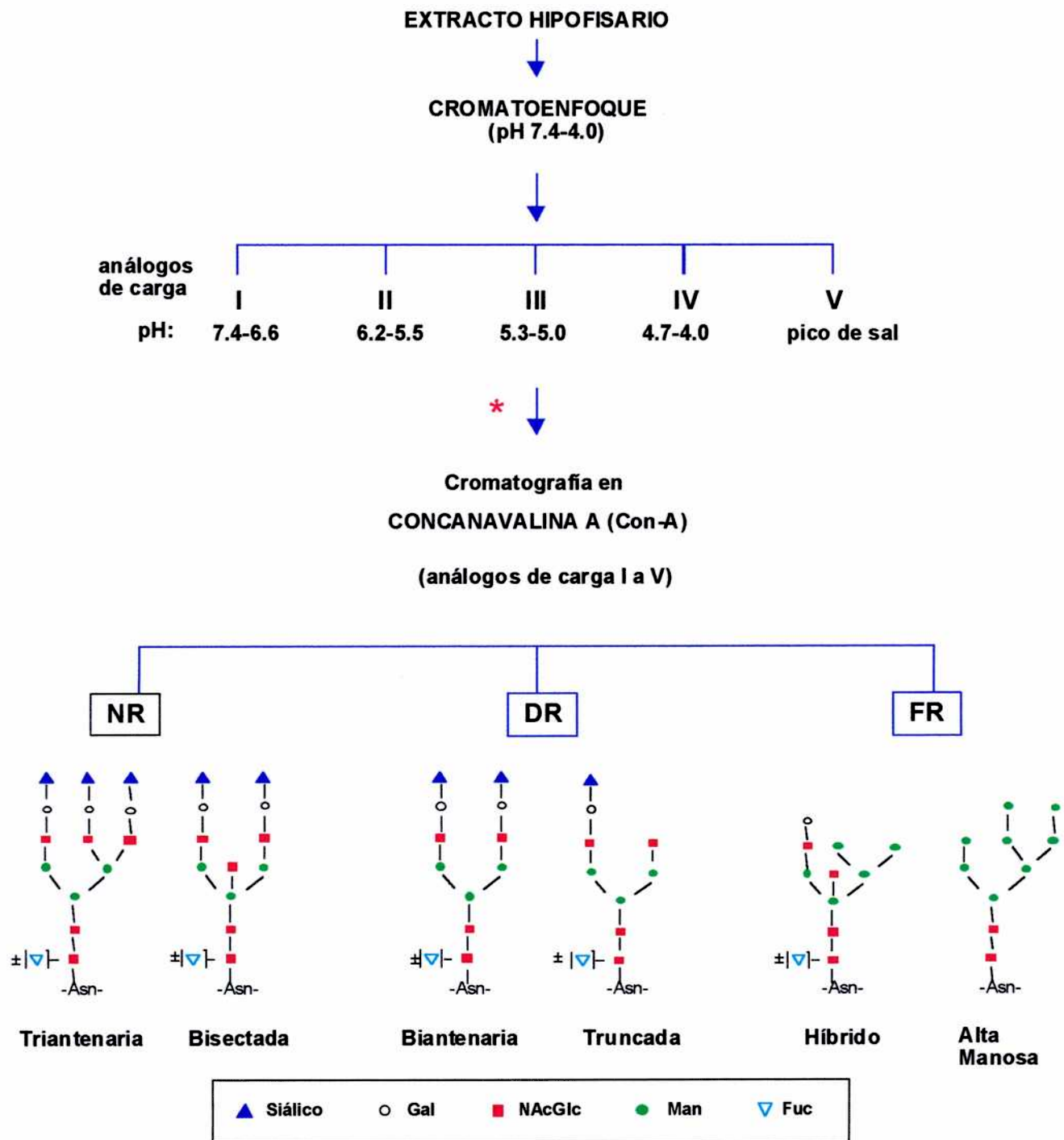
Para el análisis estadístico de resultados expresados en porcentaje se utilizó la transformación $\arcsen(p)^{1/2}$, siendo p la proporción ($0 < p < 1$). Las restantes variables a analizar fueron transformadas a logaritmo decimal.

Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron utilizando la prueba t de Student no apareada cuando se compararon dos grupos. Para las comparaciones múltiples se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Los coeficientes de correlación entre dos variables fueron determinados mediante el análisis de correlación lineal de Pearson.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de computación InStat, versión 2.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. DISEÑO EXPERIMENTAL (Esquemas, págs. 51-54)

Caracterización de FSH hipofisaria (I)

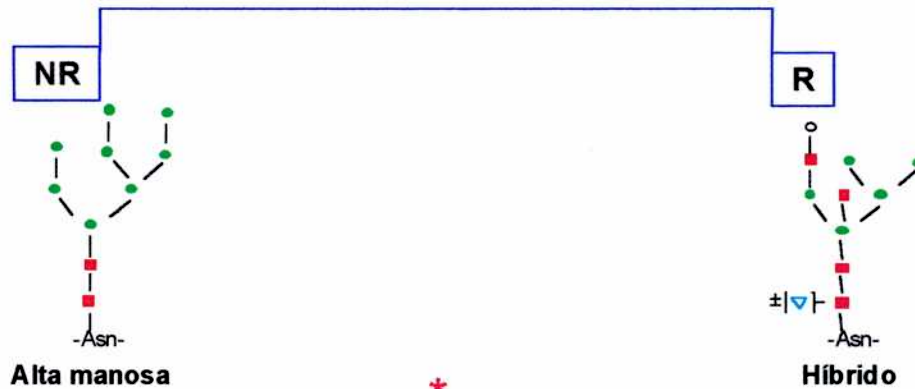


* Inmuno y bioactividad de FSH

Caracterización de FSH hipofisaria (II)

Fracción FR proveniente de Con-A (análogos de carga II a V)

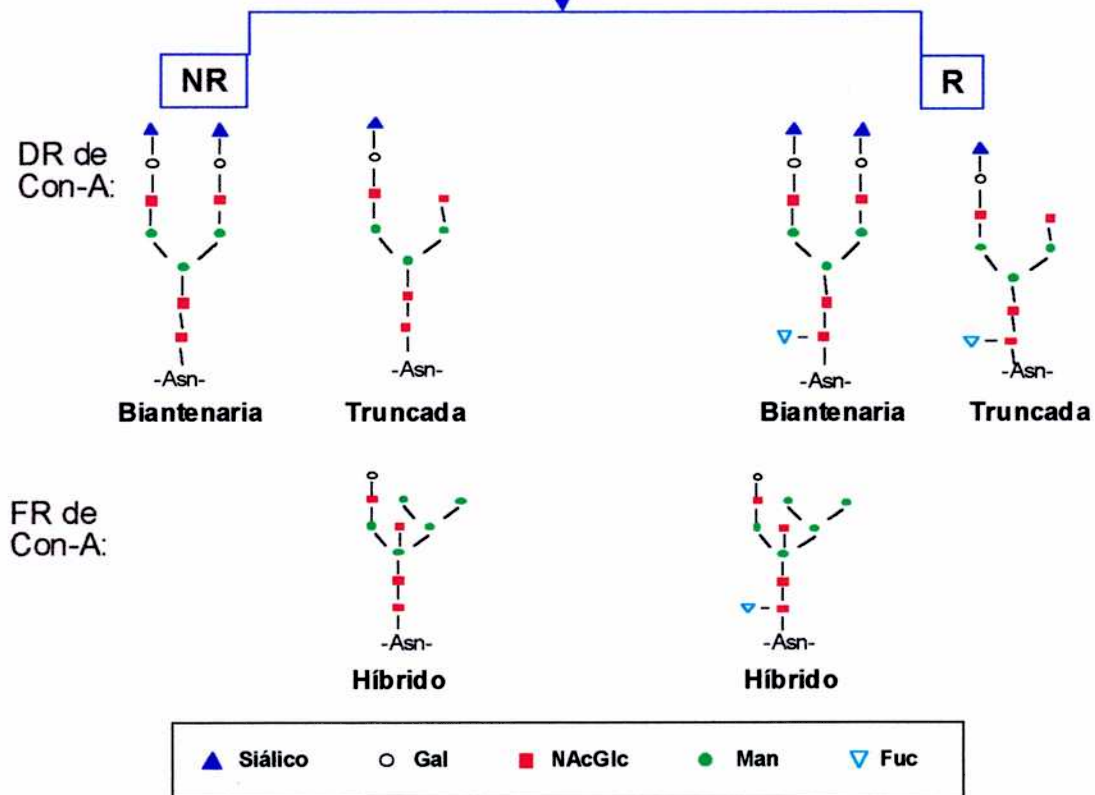
Cromatografía en AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO (WGA)



Fracciones DR y FR provenientes de Con-A

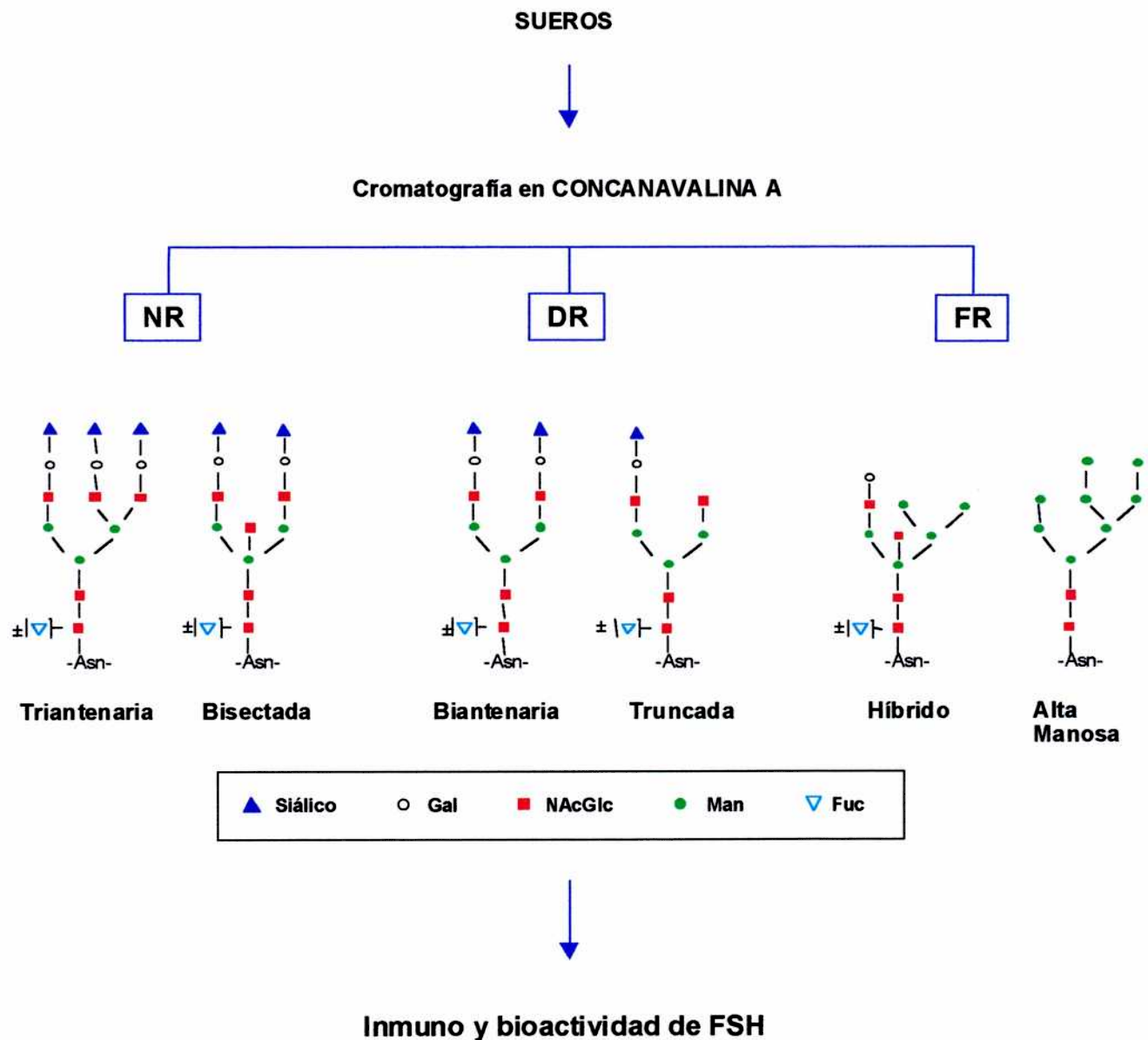
(análogos de carga II a V)

Cromatografía en LECTINA DE LENTEJA (LcH)

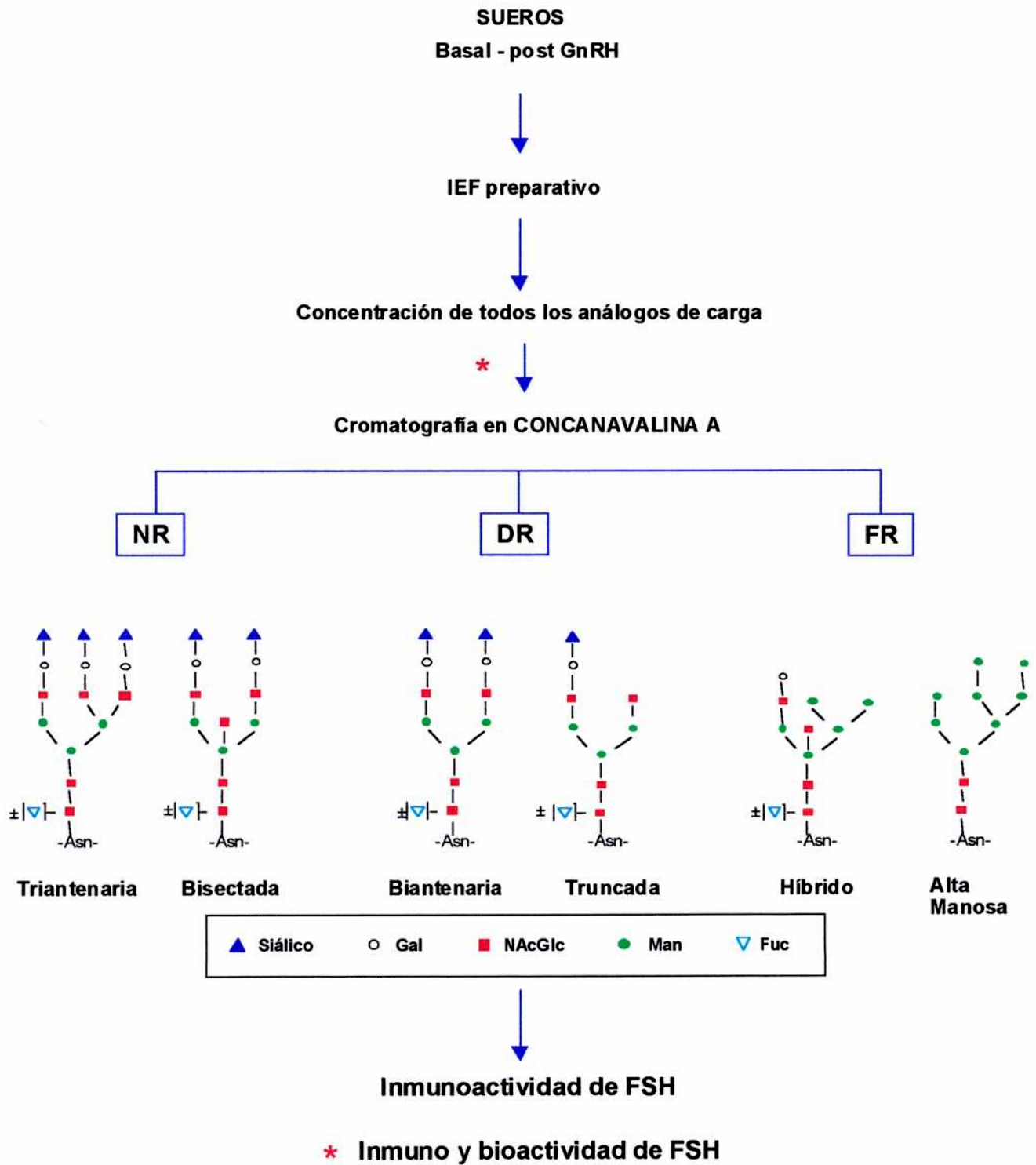


* Inmuno y bioactividad de FSH

Caracterización de FSH en sueros de fase folicular y post menopausia



Caracterización de FSH sérica durante la pubertad masculina



Resultados

1. CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH HIPOFISARIA HUMANA

1.1 Distribución de FSH inmuno y bioactiva proveniente de extractos hipofisarios humanos de acuerdo a sus puntos isoeléctricos: cromatoenfoque de extractos hipofisarios

Con el propósito de aislar los análogos de carga de FSH hipofisaria humana con distinto contenido de ácido siálico en sus cadenas carbohidratadas, se utilizó una columna de cromatoenfoque que permite la separación de proteínas de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.

La Figura 9 muestra un perfil representativo de la FSH inmunoreactiva obtenida en el cromatoenfoque a lo largo del gradiente de pH. Numerosos picos de inmunoreactividad de FSH fueron hallados en el rango de pH 7.4-4.0, así como también un pico adicional recuperado luego del agregado de NaCl 1M a la columna de cromatoenfoque (pico de sal). Se separaron cinco grupos de análogos de carga, I a V, correspondientes a los siguientes rangos de pH: I: pH:7.4-6.6; II: pH:6.2-5.5; III: pH: 5.3-5.0; IV: pH: 4.7-4.0; V: pico de sal.

La Tabla 1 muestra los niveles de I-FSH encontrados en los distintos intervalos de pH considerados, y los mismos resultados expresados como porcentaje del total de I-FSH que eluyó de la columna para cada grupo. Los resultados fueron obtenidos procesando cuatro columnas de cromatoenfoque bajo idénticas condiciones.

TABLA 1: DISTRIBUCION DE FSH INMUNOLOGICA LUEGO DEL CROMATOENFOQUE DE EXTRACTOS HIPOFISARIOS EN GRADIENTE DE pH 7.4-4.0.

Análogos de carga	I	II	III	IV	V
pH	7.4-6.6	6.2-5.5	5.3-5.0	4.7-4.0	pico de sal
I-FSH (µg)	1.0±0.1	3.9±1.3	6.5±1.9	31.9±5.9	37.2±3.5
%I-FSH	1.4±0.2	6.0±2.4	9.4±3.6	38.4±10.7	44.7±16.2

Los resultados se expresan en µg de hFSH-2 como media ± DE (n=4 cromatoenfoques) de los niveles de I-FSH en los análogos de carga I a V.

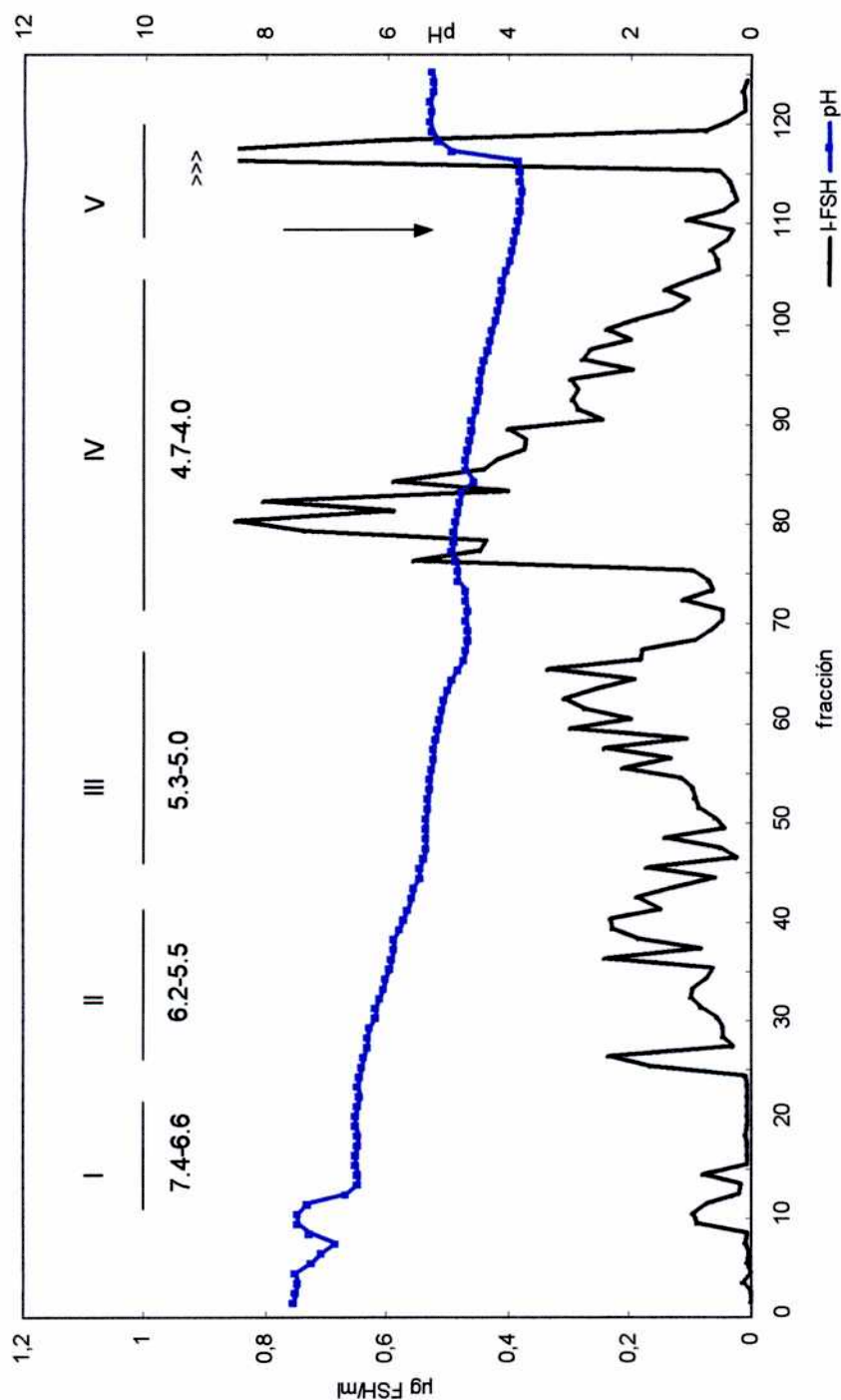


FIGURA 9: Perfil representativo de la distribución de FSH inmunoreactiva proveniente de hipófisis humanas luego del cromatografía. Las fracciones fueron agrupadas en los siguientes rangos de pH: I: pH: 7.4-6.6; II: pH: 6.2-5.5; III: pH: 5.3-5.0; IV: pH: 4.7-4.0; V: pH: 3.7-3.0. Los niveles de FSH se expresan en $\mu\text{g/ml}$ de hFSH-2.

En la Tabla 2 se muestran los niveles de FSH bioactiva en los distintos análogos de carga I a V: las proporciones de FSH bioactiva correspondientes a cada uno de los grupos respecto del total recuperado en el cromatoenfoco, así como también la relación de bio a inmunoreactividad (B/I). Los resultados fueron obtenidos procesando cuatro columnas de cromatoenfoco bajo idénticas condiciones.

TABLA 2: DISTRIBUCION DE FSH BIOLOGICA LUEGO DEL CROMATOENFOQUE DE EXTRACTOS HIPOFISARIOS. B/I: RELACION DE BIO A INMUNOACTIVIDAD.

Análogos de carga	I	II	III	IV	V
pH	7.4-6.6	6.2-5.5	5.3-5.0	4.7-4.0	pico de sal
B-FSH (µg)	3.8±1.3	24.2±5.8	20.1±6.4	73.4±13.8	69.5±17.9
%B-FSH	2.0±0.5	11.8±4.1	10.6±3.9	38.8±12.4	36.7±18.7
B/I	4.0±0.9	6.3±0.4	3.1±0.3	2.3±0.2	1.9±0.5

Los resultados se expresan en µg de hFSH-2 como media ± DE (n=4 cromatoenfocos) de los niveles de B-FSH en los análogos de carga I a V.

Los resultados presentados en las Tablas 1 y 2 se reúnen en la Figura 10. Puede observarse que más del 80% de los análogos de carga presentes en extractos hipofisarios corresponden a los grupos IV y V que representan isoformas ácidas, con puntos isoeléctricos menores de 4.7. En ambos grupos de análogos de carga se observó una baja actividad biológica expresada como la relación B/I: IV: 2.3 ± 0.2 ; V: 1.9 ± 0.5 . La relación B/I más alta hallada en estos extractos hipofisarios correspondió a isoformas básicas con puntos isoeléctricos entre 7.4 y 5.5. Cuando se relacionó el punto isoeléctrico de los análogos de carga con la relación B/I se encontró que esta relación aumenta a medida que aumenta el punto isoeléctrico. El coeficiente de correlación obtenido considerando todos los grupos de análogos de carga fue $r = 0.8268$ ($p < 0.0001$).

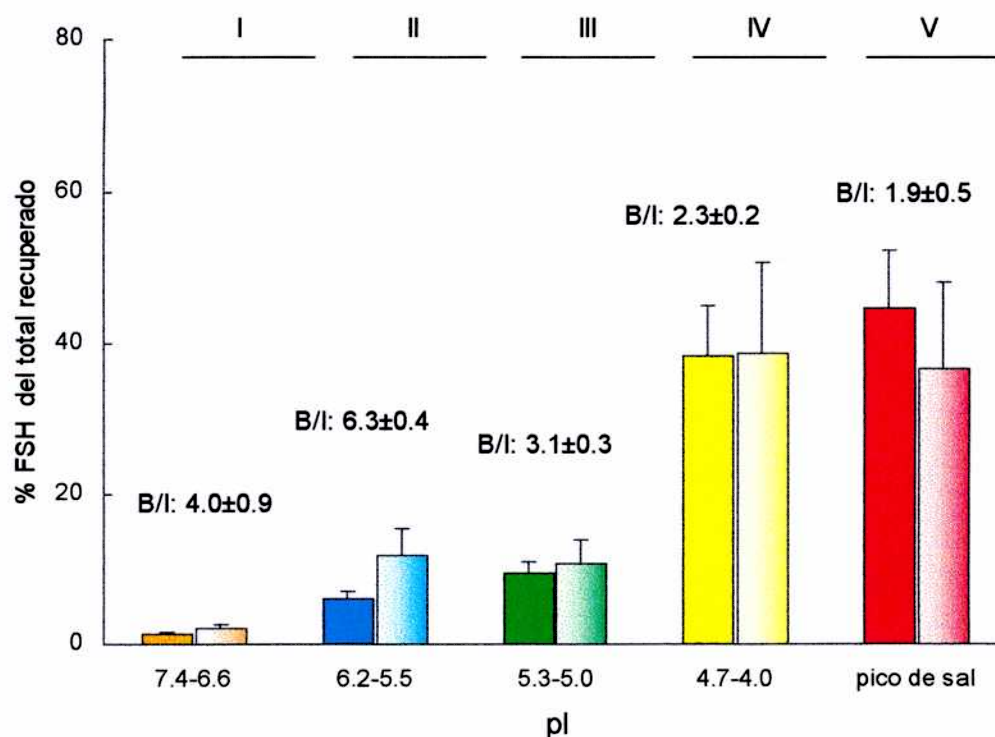


FIGURA 10: Proporción de I-FSH (barras llenas) y B-FSH (barras sombreadas) en los análogos de carga I a V aislados en los cromatofocos de extractos hipofisarios humanos. B/I: Relación de bio a inmunoreactividad.

1.2 Distribución de los análogos de carga de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas: Cromatografía de afinidad en lectinas

Luego de la separación de grupos de análogos de carga de FSH hipofisaria de acuerdo a su punto isoeléctrico se determinó, en cada uno de estos grupos, la estructura molecular de las cadenas carbohidratadas internas al azúcar terminal, ácido siálico. Con este propósito se realizaron cromatografías de afinidad en lectinas, utilizando Concanavalina A, Aglutinina de Germen de Trigo y Lectina de Lenteja, las cuales poseen afinidades específicas de unión a las diferentes estructuras de cadenas carbohidratadas (Esquemas de Diseño experimental, págs. 51 y 52).

En todos los casos en la separación de isoformas las cromatografías se repitieron tres veces en idénticas condiciones.

1.2.1 CROMATOGRAFIA EN CONCAVALINA A

Cromatografía en Con-A de análogos de carga de FSH con puntos isoeléctricos entre 7.4 y 6.6 (Grupo I)

El grupo I de análogos de carga representa la menor proporción de FSH encontrada en los extractos hipofisarios ($1.4 \pm 0.2\%$). Como se mostró en la Figura 10, la relación de bio a inmunoreactividad hallada en este grupo fue 4.0 ± 0.9 .

Los resultados obtenidos en el análisis de los análogos de carga del grupo I en Concanavalina A se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS DE CARGA DE FSH HIPOFISARIA PERTENECIENTES AL GRUPO I DE CROMATOENFOQUE (pH 7.4-6.6) LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A.

Isoformas	NR	DR	FR
I-FSH (ng)	7.5±3.0	49.4±6.8	137.6±18.5
B-FSH (ng)	16.4±5.6	190.9±33.7	671.5±42.3

Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

En la Figura 11 puede observarse el porcentaje de I-FSH recuperado en cada uno de los grupos de isoformas aislados en la cromatografía de acuerdo a la estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico terminal y la relación de bioactividad a inmunoactividad (B/I) encontrada. El 75% de la FSH total recuperada en la columna correspondió a la fracción fuertemente retenida que contiene isoformas con cadenas carbohidratadas incompletas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa. Asimismo se recuperó una proporción importante de isoformas débilmente retenidas con cadenas de oligosacáridos biantenarias completas y truncadas (20%), siendo notable la escasa proporción de isoformas con cadenas complejas, de alto grado de ramificación contenidas en este grupo de análogos de carga. Las isoformas débilmente y fuertemente retenidas por la lectina fueron las que presentaron mayor bioactividad (5.1 ± 1.0 y 4.5 ± 0.4 vs 1.9 ± 0.4 ; $p < 0.01$)

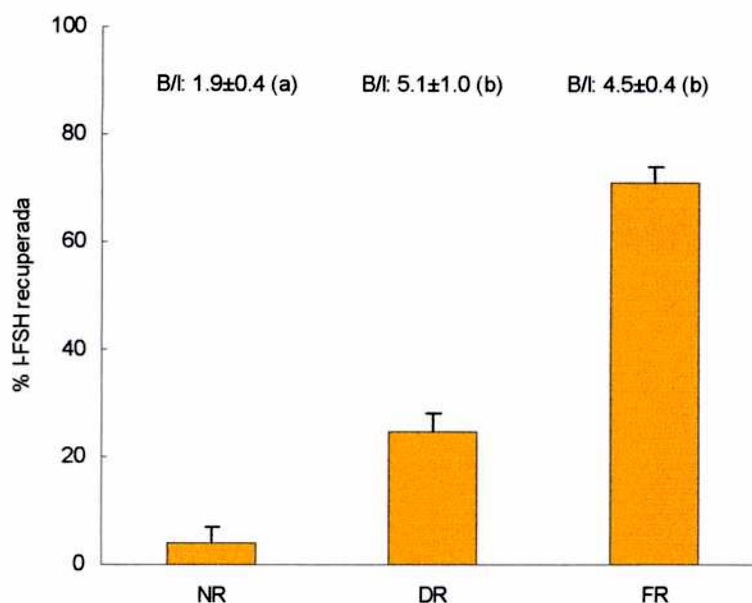


FIGURA 11: Distribución de los análogos de carga pertenecientes al grupo I del cromatoenfoco (pH 7.4-6.6) luego de la cromatografía en Con-A. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías realizadas. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas de la relación de la bioactividad a inmunoreactividad entre las isoformas de FSH; $p < 0.01$.

Cromatografía en Con-A de análogos de carga de FSH con puntos isoelectrónicos entre 6.2 y 5.5 (Grupo II)

La FSH contenida en estos análogos de carga representa, al igual que lo observado con el grupo I), una baja proporción de la hormona total contenida en la hipófisis humana. Como se mostró en la Figura 10, la relación B/I en estos análogos de carga fue 6.3 ± 0.4 . Los resultados obtenidos en el análisis del grupo II de análogos de carga en la cromatografía en Con-A se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS DE CARGA DE FSH HIPOFISARIA PERTENECIENTES AL GRUPO II DE CROMATOENFOQUE (pH 6.2-5.5) LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A.

Isoformas	NR	DR	FR
I-FSH (ng)	94.6±16.0	267.1±37.5	467.2±54.1
B-FSH (ng)	226.1±39.8	1478.2±514.5	1789.4±233.7

Los resultados se expresan en ng de FSH-2 como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

La distribución de análogos de carga en Con-A fue similar a la obtenida en el grupo anterior ya que se mantuvo el predominio de isoformas con cadenas carbohidratadas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (56%). Las isoformas con cadenas de carbohidratos biantenarias completas y truncadas fueron halladas en considerable proporción (33%). Sin embargo, las isoformas de cadenas carbohidratadas con alto grado de ramificación, casi ausentes en el grupo I de análogos de carga, representaron el 11% del total en este caso (Figura 12).

La mayor bioactividad dentro de este grupo de análogos de carga estuvo asociada a las isoformas con cadenas carbohidratadas biantenarias completas y truncadas con una relación B/I = 5.3 ± 1.6 , aunque este valor se diferenció estadísticamente sólo con el correspondiente B/I de las isoformas con cadenas carbohidratadas triantenarias y bisectadas ($p < 0.01$).

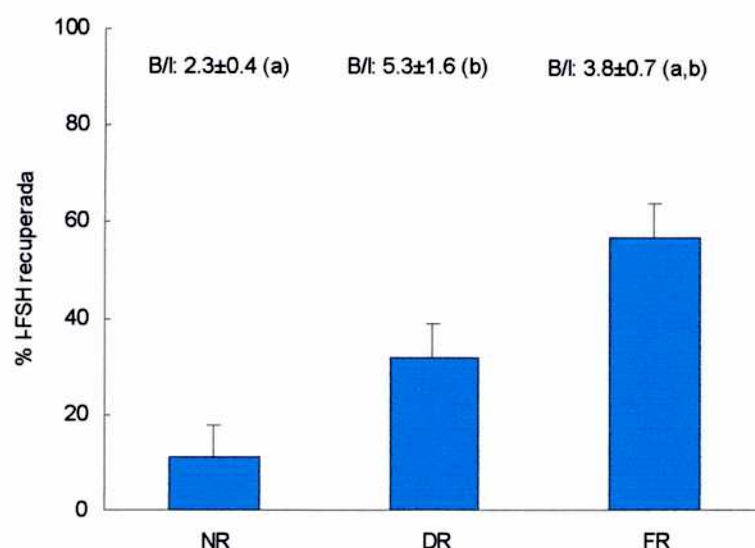


FIGURA 12: Distribución de los análogos de carga pertenecientes al grupo II de cromatoenfoco (pH 6.2-5.5) luego de la cromatografía en Con-A. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías realizadas. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas de la relación de la bioactividad a inmunoreactividad de las isoformas de FSH; $p < 0.01$.

Cromatografía en Con-A de análogos de carga de FSH con puntos isoelectricos entre 5.3 y 5.0 (Grupo III)

La cantidad de FSH inmunoreactiva contenida en este grupo de análogos de carga representa el $9.4 \pm 3.6\%$ de la FSH total recuperada en el cromatoenfoco. Como se mostró en la Figura 10, las isoformas halladas en este grupo poseen una relación B/I más baja que la del grupo anterior ($B/I: 3.1 \pm 0.3$ vs 6.3 ± 0.4).

Los resultados obtenidos en el análisis del grupo III de análogos de carga en la cromatografía en Con-A se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS DE CARGA DE FSH HIPOFISARIA PERTENECIENTES AL GRUPO III DE CROMATOENFOQUE (pH 5.3-5.0) LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A.

Isoformas	NR	DR	FR
I-FSH (ng)	207.6±26.3	487.4±20.7	603.2±23.9
B-FSH (ng)	349.3±12.0	1763.3±93.5	1608.3±74.2

Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

El perfil de distribución de los análogos de carga en Con-A mostró que la mayor proporción de isoformas presentes en este grupo corresponde a aquellas que poseen cadenas carbohidratadas incompletas, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR; 47%) aunque esta proporción es menor a la observada en los grupos I y II. Además, se observó un aumento en la proporción de isoformas con cadenas más ramificadas (NR; 16%) y de tipo biantenarior (DR; 37%) respecto de los grupos anteriores (Figura 13).

Las isoformas que poseen cadenas de carbohidratos biantenarias completas y truncadas mostraron la relación B/I más alta (3.5 ± 0.3 vs 2.7 ± 0.1 y 1.7 ± 0.2 ; $p < 0.05$).

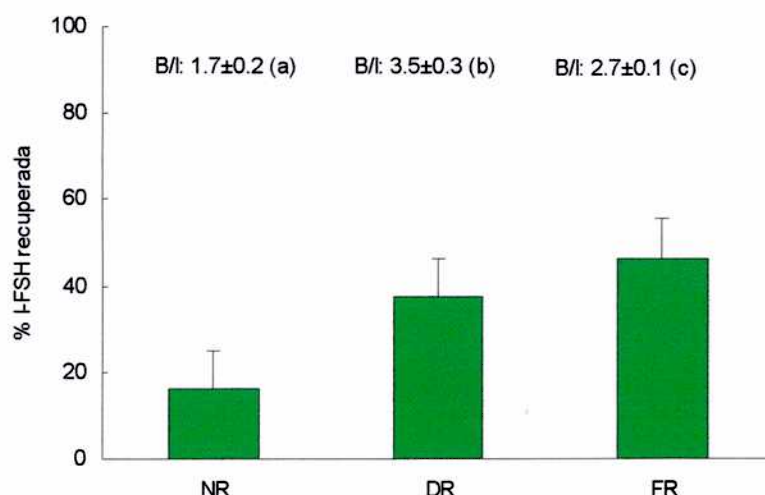


FIGURA 13: Distribución de los análogos de carga pertenecientes al grupo III de cromatoenfoco (pH 5.3-5.0) luego de la cromatografía en Con-A. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías realizadas. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas de la relación de la bioactividad a inmunoreactividad de las isoformas de FSH; $p < 0.05$.

Cromatografía en Con-A de análogos de carga de FSH con puntos isoelectricos entre 4.7 y 4.0 (Grupo IV)

El grupo IV de análogos de carga contiene el 38.4% de la cantidad total de FSH inmunoreactiva recuperada en el cromatoenfoco.

La actividad biológica de este grupo de análogos de carga fue más baja que la de los grupos I y II descriptos anteriormente (B/I: 2.3 ± 0.2 vs 4.0 ± 0.9 y 6.3 ± 0.4)

Los resultados obtenidos en el análisis del grupo IV de análogos de carga en cromatografía en Con-A se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS DE CARGA DE FSH HIPOFISARIA PERTENECIENTES AL GRUPO IV DE CROMATOENFOQUE (pH 4.7-4.0) LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A.

Isoformas	NR	DR	FR
I-FSH (ng)	358.3±44.9	749.3±106.1	520.9±14.1
B-FSH (ng)	527.9±60.2	1462.8±165.2	541.8±159.7

Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

El perfil de distribución de isoformas de FSH contenidas en el grupo IV de análogos de carga después de la cromatografía en Con-A fue diferente al observado en los grupos I, II y III. La diferencia más importante es que predominan en este grupo las isoformas de FSH con cadenas biantenarias completas o truncadas (DR, 46%), mientras que las isoformas fuertemente retenidas en la lectina conteniendo cadenas de carbohidratos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR), disminuyen significativamente su proporción (Figura 14).

La mayor bioactividad estuvo asociada a las isoformas con cadenas de oligosacáridos biantenarias y truncadas con una relación B/I = 1.9 ± 0.2 , aunque este valor se diferenció estadísticamente sólo con el correspondiente B/I de las isoformas con cadenas carbohidratadas híbridas y de alto contenido en manosa ($p < 0.01$).

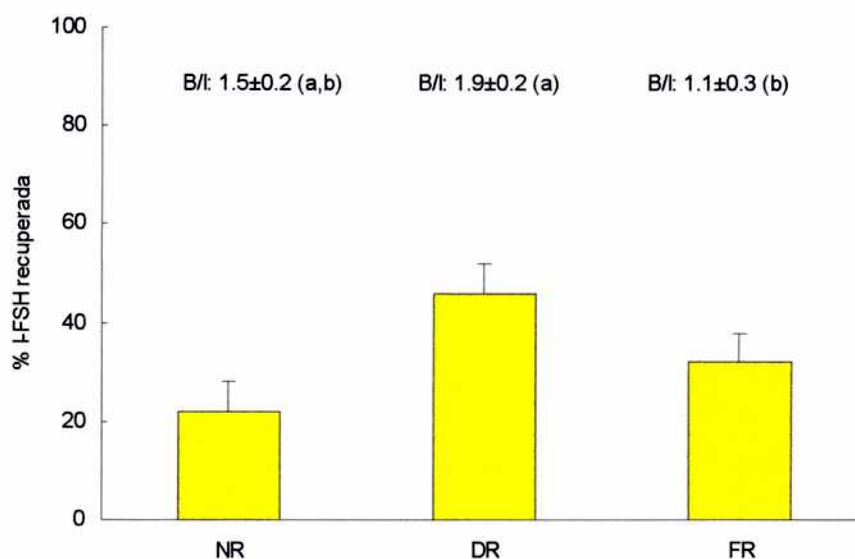


FIGURA 14: Distribución de los análogos de carga pertenecientes al grupo IV del cromatoenfoco (pH 4.7-4.0) luego de la cromatografía en Con-A. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías realizadas. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas de la relación de la bioactividad a inmunoactividad entre las isoformas de FSH; $p < 0.05$.

Cromatografía en Con-A de análogos de carga de FSH pertenecientes al grupo V (pico de sal)

La proporción de FSH inmunoreactiva contenida en este grupo de análogos de carga representa el 44.7% del material total recuperado luego del cromatoenfoco. Los análogos de carga eluidos con una alta concentración salina (NaCl 1 M), serían aquellos con puntos isoeléctricos menores de 4.0 que no fueron previamente eluidos de la columna de cromatoenfoco.

La bioactividad de este grupo de análogos de carga fue baja ($B/I: 1.9 \pm 0.5$) y similar a la correspondiente al grupo IV (2.3 ± 0.2).

Los resultados obtenidos en el análisis del grupo V de análogos de carga en cromatografía en Con-A se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7: DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS DE CARGA DE FSH HIPOFISARIA PERTENECIENTES AL GRUPO V DE CROMATOENFOQUE (PICO DE SAL) LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A.

Isoformas	NR	DR	FR
I-FSH (ng)	412.1±13.7	598.8±90.8	200.0±12.6
B-FSH (ng)	763.3±35.1	1173.0±78.8	378.6±16.7

Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

Las isoformas de FSH predominantes en este grupo de análogos de carga son las que poseen cadenas de carbohidratos biantenarias completas o truncadas (DR, 49%). Este grupo, además, contiene una alta proporción de isoformas con cadenas de carbohidratos con alto grado de ramificación (NR, 34%).

La proporción más baja de isoformas corresponde a aquellas con cadenas de carbohidratos más incompletas, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR, 17%).

La relación de bioactividad a inmunoactividad de los tres grupos de isoformas separados por Con-A fue baja y no se observaron diferencias significativas al compararlas entre sí (Figura 15).

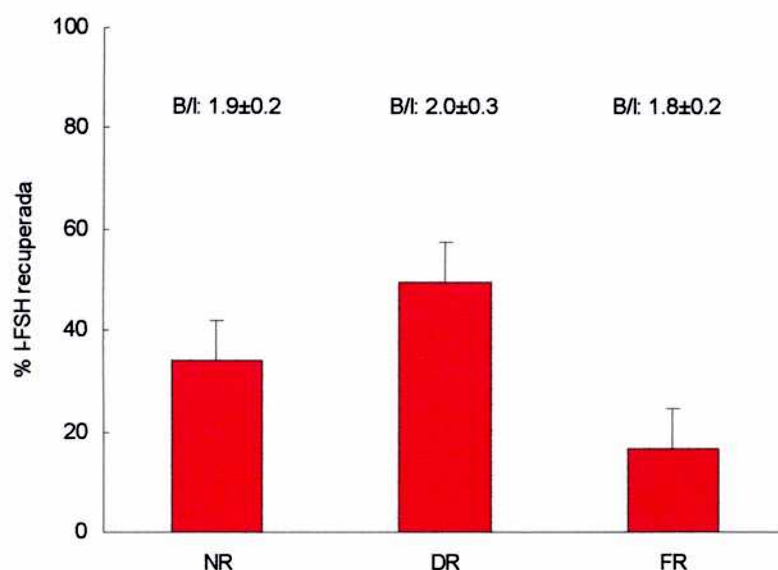


FIGURA 15: Distribución de los análogos de carga pertenecientes al grupo V del cromatoenfoco (pico de sal) luego de la cromatografía en Con-A. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Los resultados se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías realizadas.

Distribución relativa de las isoformas de FSH hipofisaria humana luego de la cromatografía en Con-A de los distintos grupos de análogos de carga aislados en el cromatoenfoco

En la Tabla 8 se muestran en conjunto las proporciones de isoformas separadas en Concanavalina A provenientes de los distintos grupos de análogos de carga. Se incluye el porcentaje de I-FSH de cada uno de los grupos aislados y la relación B/I.

Se analizó la posible relación entre la proporción de isoformas de FSH inmunológica con una determinada estructura de cadena carbohidratada interna al ácido siálico y el punto isoelectrico. Este mismo análisis se realizó también entre la relación B/I asociada a una determinada estructura de oligosacáridos y el punto isoelectrico.

La proporción de isoformas con cadenas de oligosacáridos triantenarias y bisectadas (NR) correlacionó en forma inversa con el punto isoelectrico (%I-FSH vs pI: $r = -0.9665$, $p < 0.0001$).

No se observó correlación entre la relación B/I de isoformas no retenidas en Con-A y el punto isoelectrico.

La proporción de isoformas con cadenas de carbohidratos biantenarias completas y truncadas (DR), correlacionó en forma inversa con el punto isoelectrico (%I-FSH vs pI:

$r = -0.9541$; $p < 0.0001$). En cuanto a la variación de la bioactividad, se observó una correlación estadísticamente significativa de la relación B/I de isoformas débilmente retenidas en Con-A con el punto isoeléctrico (B/I vs pI: $r = 0.8935$; $p < 0.0001$).

Las isoformas más bioactivas aisladas en este estudio fueron isoformas con este tipo de estructura de cadena de carbohidratos que a su vez pertenecen a los grupos I y II de análogos de carga, es decir, corresponden a isoformas con puntos isoeléctricos más altos.

La proporción de isoformas con cadenas de carbohidratos más incompletas, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR) correlacionó en forma directa con el punto isoeléctrico (%I-FSH vs pI: $r = 0.9682$; $p < 0.0001$). En cuanto a la bioactividad, estas isoformas mostraron una correlación estadísticamente significativa de la relación B/I con el punto isoeléctrico (B/I vs pI: $r = 0.8333$; $p < 0.001$).

TABLA 8: PROPORCIONES DE ISOFORMAS INMUNOREACTIVAS DE FSH HIPOFISARIAS LUEGO DE CROMATOGRAFIA EN CON-A DE LOS ANALOGOS DE CARGA I A V. B/I: RELACION DE BIO A INMUNOACTIVIDAD.

Isoformas	NR		DR		FR	
	%I-FSH	B/I	%I-FSH	B/I	%I-FSH	B/I
I 7.4-6.6	4±2	1.9±0.4	25±4	5.1±1.0	71±3	4.5±0.4
II 6.2-5.5	11±2	2.3±0.4	32±5	5.3±1.6	57±6	3.8±0.7
III 5.3-5.0	16±2	1.7±0.2	37±2	3.5±0.3	47±2	2.7±0.1
IV 4.7-4.0	22±4	1.5±0.2	46±5	1.9±0.2	32±2	1.1±0.3
V pico de sal	34±1	1.9±0.2	49±3	2.0±0.3	17±2	1.8±0.2

Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media ± DE de tres corridas cromatográficas independientes (isoformas no retenidas, NR; isoformas débilmente retenidas, DR; isoformas fuertemente retenidas, FR).

En la Figura 16 se muestran en conjunto las proporciones de isoformas aisladas luego de Con-A en los distintos grupos de análogos de carga I a V. Esta Figura permite visualizar los cambios de las proporciones de isoformas con distinto tipo de cadena carbohidratada a medida que varía el punto isoeléctrico del grupo.

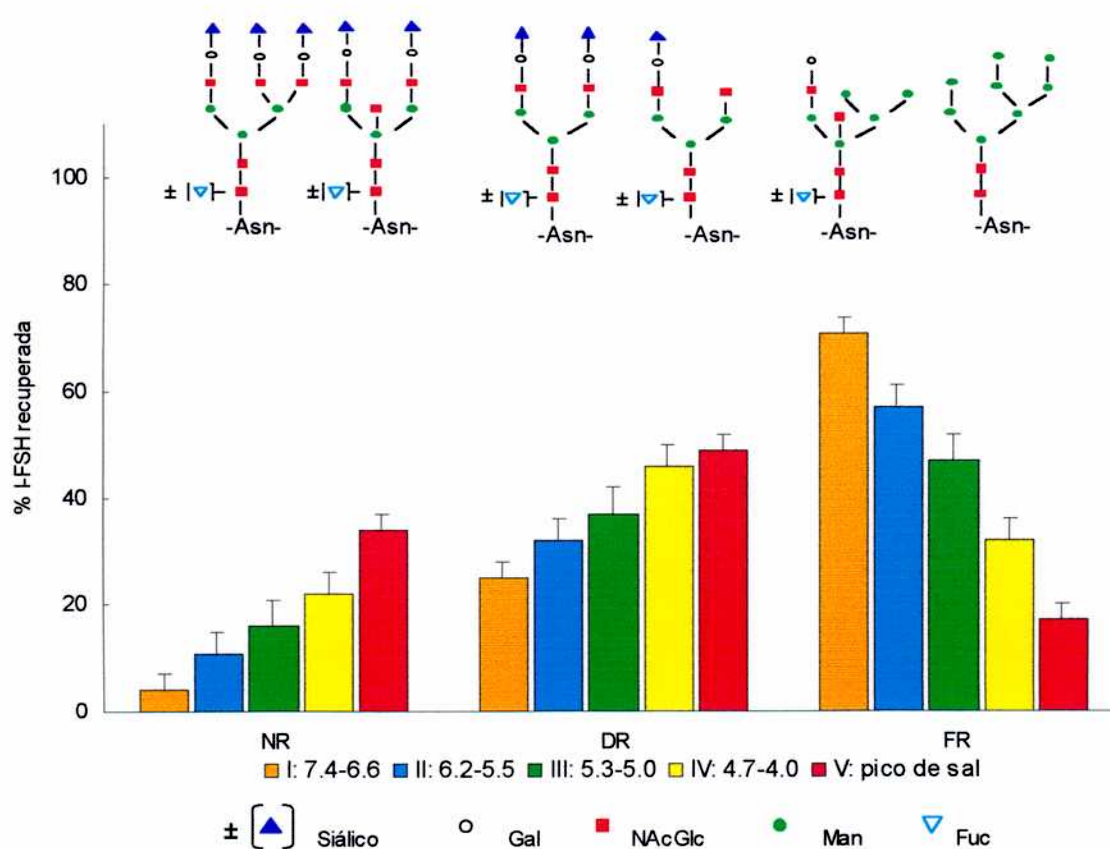


FIGURA 16: Distribución de isoformas de FSH hipofisaria luego de cromatografía en Con-A de los análogos de carga I a V del cromatoenfoque. Estructura de las cadenas carbohidratadas correspondientes a las isoformas no retenidas (NR), débilmente retenidas (DR) y fuertemente retenidas (FR) por la lectina

1.2.2 CROMATOGRAFIA EN AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO

Cromatografía en WGA de los análogos de carga de los grupos II, III, IV y V con cadenas de oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR en Con-A)

Con el objeto de determinar la proporción de isoformas de FSH con cadenas de carbohidratos de tipo híbrido y las que poseían oligosacáridos de alto contenido en manosa se realizó la cromatografía en WGA de las isoformas fuertemente retenidas en Con-A provenientes de los análogos de carga II a V. Estos resultados se muestran en la Tabla 9. El grupo I de análogos de carga no fue incluido en este análisis por las razones que se explicaron en Materiales y Métodos (3.1.8).

TABLA 9: CROMATOGRAFIA EN WGA DE LAS ISOFORMAS FUERTEMENTE RETENIDAS EN CON-A: ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LAS ISOFORMAS DE FSH

Isoformas	NR		R	
	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)
II 6.2-5.5	4.8±1.2	10.6±2.1	43.0±3.9	163.4
III 5.3-5.0	12.5±2.1	24.6±4.0	258.9±5.2	404.3±96.5
IV 4.7-4.0	3.9±0.5	ND	21.4±5.2	15.8±3.6
V pico de sal	10.5±1.6	19.5±2.0	63.7±2.0	61.9±4.1

Isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por WGA. Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media ± DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes. ND: no detectable

En la Figura 17 se puede observar que en todos los grupos de análogos de carga analizados existe un marcado predominio de isoformas con cadenas de carbohidratos de tipo híbrido (isoformas retenidas por la lectina, R, grupos II a V, %I-FSH > 80%). Las isoformas con estructuras carbohidratadas de alto contenido en manosa presentes en estos extractos hipofisarios estuvieron presentes en muy pequeña proporción.

En las isoformas retenidas por la lectina se encontró una correlación significativa entre la relación B/I y el punto isoeléctrico ($r = 0.8411$; $p < 0.001$), similar a la hallada entre la relación B/I y el punto isoeléctrico de las isoformas fuertemente retenidas en Con-A (FR) de la cual provenía el material analizado. Por el contrario, no se encontró correlación alguna entre la relación B/I y el punto isoeléctrico de las isoformas no retenidas en WGA (isoformas con cadenas de oligosacáridos de alto contenido en manosa).

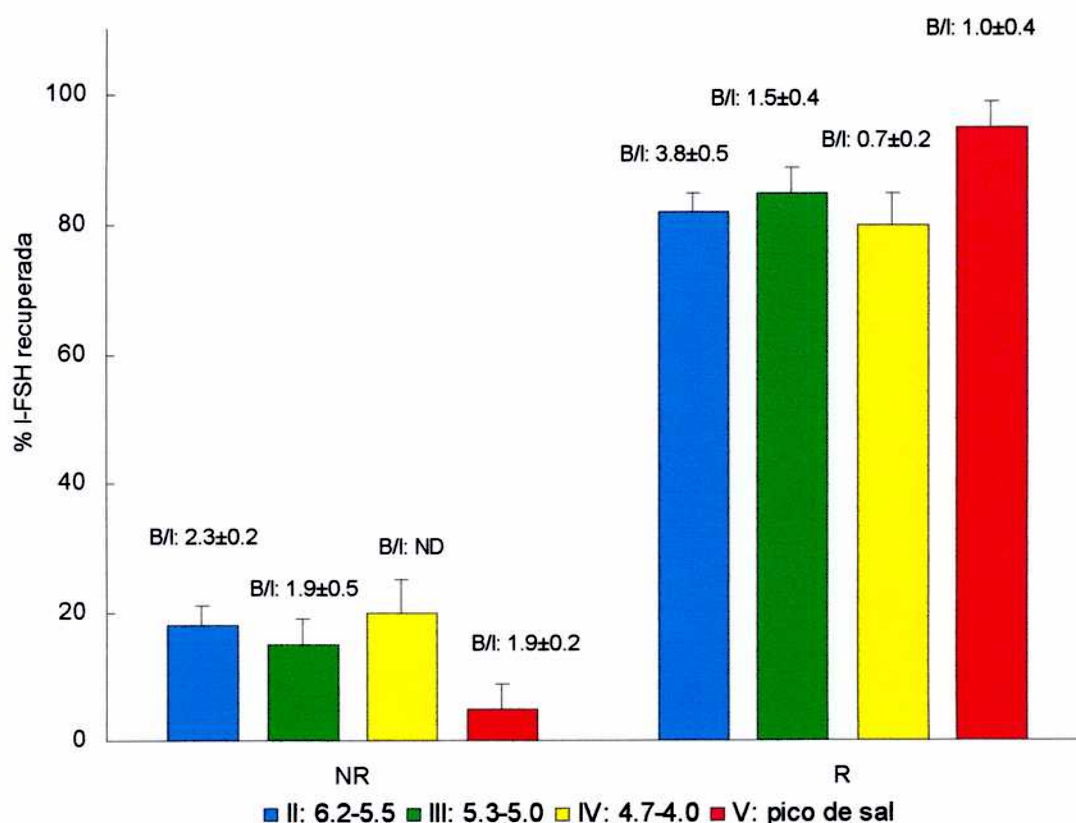


FIGURA 17: Distribución de las isoformas de FSH hipofisaria fuertemente retenidas en Con-A (provenientes de los análogos de carga I a V) luego de cromatografía en WGA. La relación de bio a inmmunoactividad, B/I, de los grupos de isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por la lectina se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías independientes.

1.2.3 CROMATOGRAFIA EN LECTINA DE LENTEJA

Cromatografía en LcH de los análogos de carga de los grupos II, III, IV y V con cadenas de oligosacáridos biantenarias completas y truncadas (DR en Con-A)

La Tabla 10 muestra los resultados que se obtuvieron al analizar en LcH las isoformas débilmente retenidas en Con-A provenientes de los análogos de carga de los grupos II, III IV y V. El grupo I de análogos de carga y las isoformas no retenidas en Con-A (NR) no fueron incluidos en este análisis por las razones que se explicaron en Materiales y Métodos (3.1.10).

TABLA 10: CROMATOGRAFIA EN LcH DE LAS ISOFORMAS DEBILMENTE RETENIDAS EN CON-A: ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LAS ISOFORMAS DE FSH

Isoformas	NR		R	
	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)
II 6.2-5.5	48.3±5.2	220.8±23.7	29.6±8.3	264.0±19.8
III 5.3-5.0	78.4±2.3	160.9±14.8	153.2±9.8	528.2±50.4
IV 4.7-4.0	193.0±13.8	360.8±23.5	146.7±35.2	169.3±16.0
V pico de sal	218.1±15.1	450.5±12.0	46.4±2.9	80.1±18.7

Isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por LcH. Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media ± DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

La proporción de isoformas conteniendo un residuo fucosa en las cadenas carbohidratadas biantenarias completas y truncadas fue distinta en cada uno de los grupos de análogos de carga analizados. En las isoformas provenientes de los grupos de análogos de carga II, IV y V se observó un predominio de isoformas que no contenían el residuo fucosa en sus cadenas. Por el contrario, en las isoformas provenientes del grupo III de análogos de carga se observó una mayor proporción de isoformas que contenían este residuo (Figura 18).

Tanto en las isoformas retenidas por la lectina como en las isoformas no retenidas se encontró una correlación positiva entre la relación B/I y el punto isoeléctrico ($r = 0.9095$; $p < 0.0001$ y $r = 0.7891$; $p < 0.05$, respectivamente)

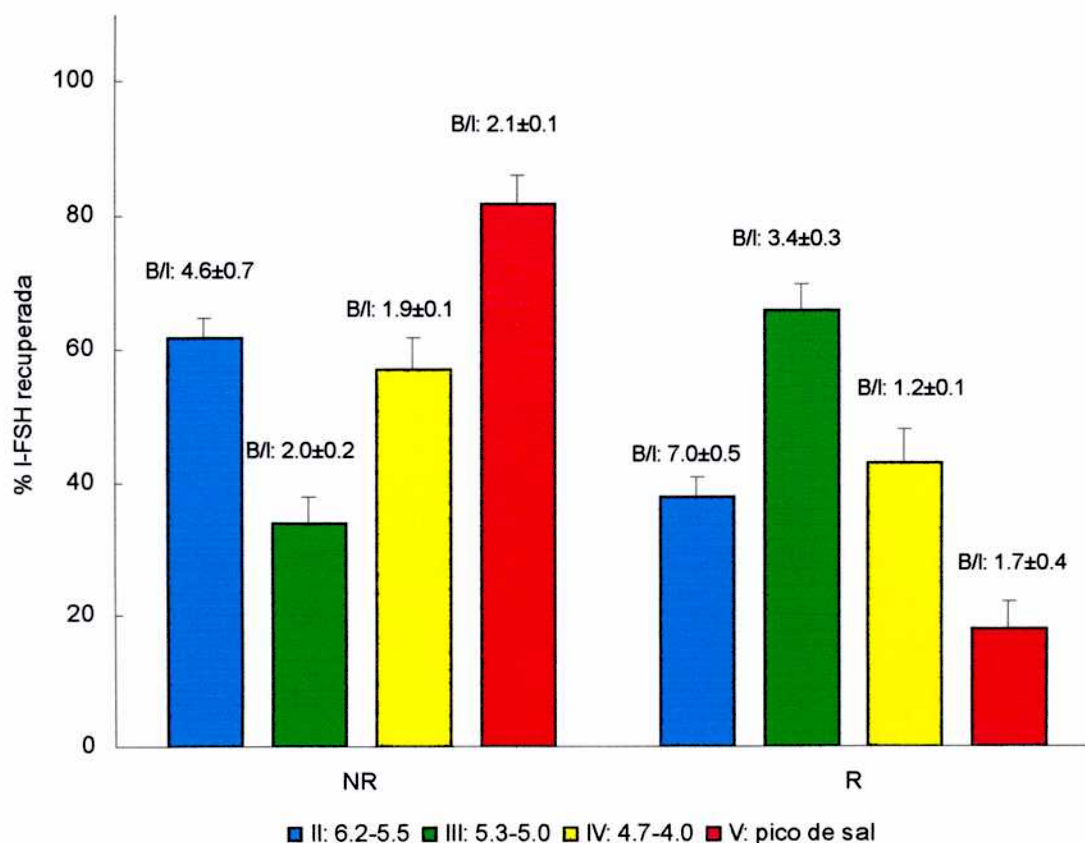


FIGURA 18: Distribución de las isoformas de FSH hipofisaria débilmente retenidas en Con-A (provenientes de los análogos de carga I a V) luego de cromatografía en LCH. La relación de bio a inmutactividad, B/I, de los grupos de isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por la lectina se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías independientes.

Cromatografía en LcH de los análogos de carga de los grupos II, III, IV y V con cadenas de oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR en Con-A)

La Tabla 11 muestra los resultados que se obtuvieron al analizar en LcH las isoformas fuertemente retenidas en Con-A provenientes de los análogos de carga de los grupos II, III IV y V. El grupo I de análogos de carga no fue incluido en este análisis por las razones que se explicaron en Materiales y Métodos (3.1.10).

TABLA 11: CROMATOGRAFIA EN LcH DE LAS ISOFORMAS FUERTEMENTE RETENIDAS EN CON-A: ACTIVIDAD INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA DE LAS ISOFORMAS DE FSH

Isoformas	NR		R	
	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)	I-FSH (ng)	B-FSH (ng)
II 6.2-5.5	209.3±6.4	213.7±61.4	93.4±11.1	351.7±32.1
III 5.3-5.0	90.3±2.3	217.0±29.6	99.4±4.1	306.6±13.6
IV 4.7-4.0	67.7±13.8	53.8±18.0	54.6±11.3	57.9±4.1
V pico de sal	44.4±7.8	75.7±8.5	18.3±2.1	26.7±4.4

Isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por LcH. Los resultados se expresan en ng de hFSH-2 como media ± DE de los valores obtenidos en tres corridas cromatográficas independientes.

También en este caso, la proporción de isoformas conteniendo el residuo fucosa en sus cadenas de oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa fue distinta en cada uno de los grupos de análogos de carga analizados (fracción FR, proveniente de grupos II a V) (Figura 19).

En las isoformas retenidas por la lectina se encontró una correlación significativa entre la relación B/I y el punto isoeléctrico ($r = 0.8845$; $p < 0.0001$).

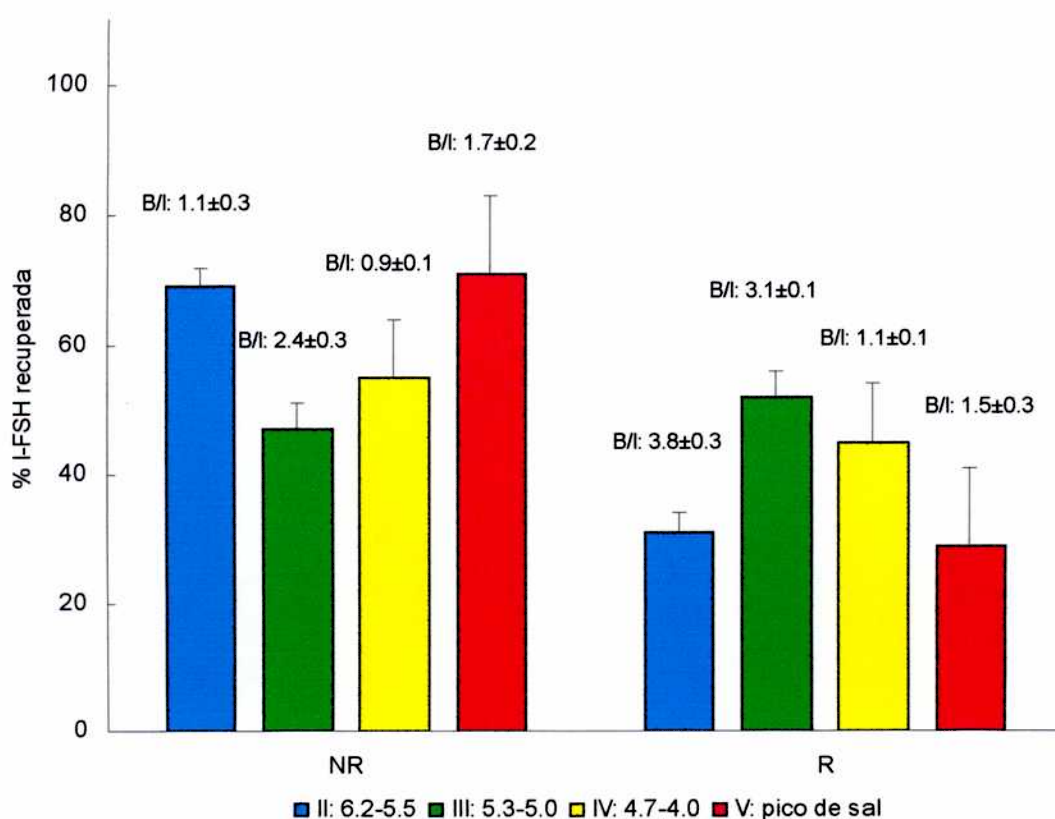


FIGURA 19: Distribución de las isoformas de FSH hipofisaria fuertemente retenidas en LcH (provenientes de los análogos de carga I a V) luego de cromatografía en LcH. La relación de bio a inmutactividad, B/I, de los grupos de isoformas no retenidas (NR) y retenidas (R) por la lectina se expresan como media $\pm$ DE de los valores obtenidos en tres cromatografías independientes.

2. CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTES EN LA POSTMENOPAUSIA Y EN LA FASE FOLICULAR DE CICLOS MENSTRUALES NORMALES

El objetivo de este estudio fue determinar el polimorfismo de FSH circulante en distintos entornos endocrinos de la vida reproductiva de la mujer.

2.1 Perfil hormonal sérico de las mujeres estudiadas

Los perfiles hormonales séricos determinados en muestras individuales y combinadas, se muestran en la Tabla 12. Los niveles elevados de actividad inmunológica y biológica de FSH y los niveles bajos de estradiol y progesterona hallados en las mujeres postmenopáusicas son característicos de este estado endocrino.

Por otro lado, los niveles de estradiol, progesterona y de inmuno y bio FSH hallados en el suero de mujeres en fase folicular fueron los esperados para este momento del ciclo.

TABLA 12: NIVELES DE FSH INMUNOLOGICA Y BIOLOGICA, ESTRADIOL (E₂) Y PROGESTERONA (P) EN MUESTRAS SERICAS.

Muestra		I- FSH (UI/l)	B-FSH (UI/l)	B/I	E ₂ (nmol/l)	P (nmol/l)
SPM	individual (n=5)	41.0 ± 9.2	47.4 ± 9.9	1.2 ± 0.3	55.1 ± 10.3	1.1 ± 0.6
	combinada	42.0	46.2	1.1	48.5	0.9
SFF	individual (n=5)	5.5 ± 1.9	0.5 ± 0.9	0.6 ± 0.3	425.7 ± 101.8	1.9 ± 0.5
	combinada	5.4	3.7	0.7	382.7	1.7

Los resultados se expresan como media ± DE de los valores obtenidos en las determinaciones individuales. Los niveles de FSH inmuno y bioactiva se expresan en UI/l de 2nd IRP 78/549. SPM: suero de postmenopáusicas; SFF: Suero de mujeres en fase folicular

2.2 Cromatografía de afinidad en Concanavalina A

Luego de realizada la cromatografía en Concanavalina A se determinaron los niveles de proteínas en cada fracción recogida. La Figura 20 muestra el perfil cromatográfico obtenido con los sueros de mujeres postmenopáusicas y mujeres en fase folicular. En la Figura 20A se muestran los resultados obtenidos usando muestras combinadas y en la Figura 20B se muestran los resultados obtenidos usando muestras procesados en forma individual. Los perfiles de proteínas totales obtenidos con suero de mujeres postmenopáusicas y suero de mujeres en fase folicular fueron idénticos. Aproximadamente el 72% del total de proteínas presentes en los sueros analizados no interactuaron con la lectina. Sólo una pequeña proporción de las mismas fue retenida y eluída con concentraciones crecientes de azúcar.

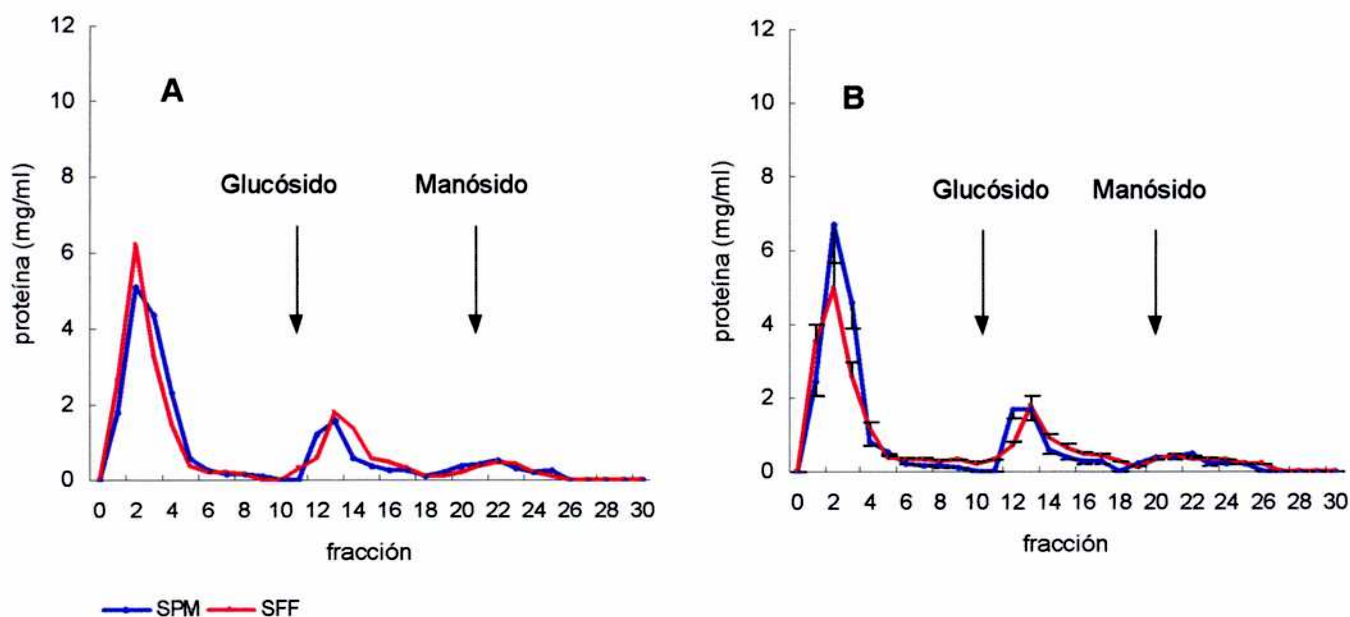


FIGURA 20: Perfil de proteínas totales determinado en sueros de mujeres postmenopáusicas (SPM) y sueros de mujeres en fase folicular (SFF) luego de la cromatografía en Concanavalina A. Los sueros fueron analizados en forma combinada (panel A) y en forma individual (panel B). Los resultados del análisis de muestras individuales se expresan como media $\pm$ DE (n=5).

2.2.1 Separación de isoformas de FSH circulantes en mujeres postmenopáusicas de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Los altos niveles de FSH circulantes en las mujeres postmenopáusicas permitieron determinar la FSH inmunológica en cada una de las fracciones recogidas de la columna (Figura

21). A pesar de que la mayor parte de las proteínas totales eluyeron con el buffer de equilibrio (ver figura 20 de perfil proteico), no se detectó actividad inmunológica de FSH en las fracciones no retenidas por la lectina (NR). Estas fracciones fueron reunidas y se realizó un procedimiento de concentración de la muestra (x10). En el concentrado tampoco se detectó FSH inmunoreactiva, lo que confirmó que en el suero de mujeres postmenopáusicas están ausentes las isoformas de FSH con cadenas triantenarias y bisectadas.

Luego del agregado de buffer con baja concentración de azúcar, se recuperó un gran porcentaje (85-95%) de inmuno FSH. Estas isoformas, débilmente retenidas por la lectina (DR), poseen cadenas de oligosacáridos biantenarias completas y truncadas. Cuando se eluyó con buffer conteniendo una alta concentración de azúcar, se recuperó un pequeño porcentaje (5-15%) de FSH inmunoreactiva correspondiente a isoformas con cadenas de carbohidratos incompletas, de alto contenido en manosa y de tipo híbrido (FR).

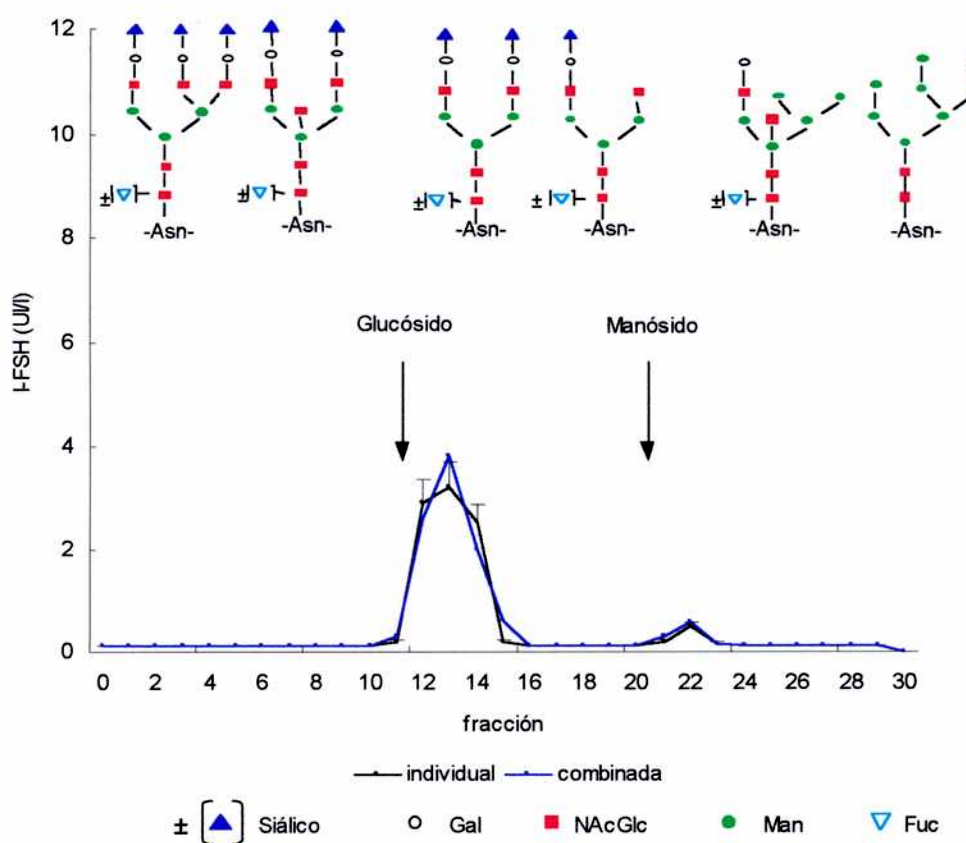


FIGURA 21: Cromatografía en Con-A de suero de mujeres postmenopáusicas (SPM): perfil de actividad inmunológica de FSH determinada en cada una de las fracciones. Los resultados del análisis de muestras individuales se expresan como media $\pm$ DE. Los niveles de I-FSH se expresan en UI/I de 2nd IRP 78/549. Se muestra la estructura de cadena de oligosacáridos presente en las isoformas de FSH eluidas con buffer de equilibrio (NR), glucósido 10 mM (DR) y manósido 100 mM (FR).

La Figura 22 muestra la distribución de las isoformas de FSH expresada en porcentaje del total recuperado en la columna, en mujeres postmenopáusicas. En el panel superior de la figura se pueden observar los resultados obtenidos con los sueros combinados mientras que en el panel inferior se muestran los resultados obtenidos con las muestras analizadas en forma individual. La mayor proporción de FSH inmuno (90%) y bioactiva (82%) correspondió a isoformas débilmente retenidas por la lectina (DR). Estas isoformas poseen cadenas de carbohidratos biantenarias completas y truncadas. La relación bio a inmutioactividad, B/I, de las isoformas con este tipo de estructura de cadena carbohidratada fue 0.9 ± 0.2 .

El 10% de la FSH inmunológica y el 18% de la bioactividad correspondieron a isoformas fuertemente retenidas por la lectina. Estas isoformas poseen cadenas de oligosacáridos de alto contenido en manosa y de tipo híbrido. La relación bio a inmutioactividad de las mismas fue 3.3 ± 0.6 .

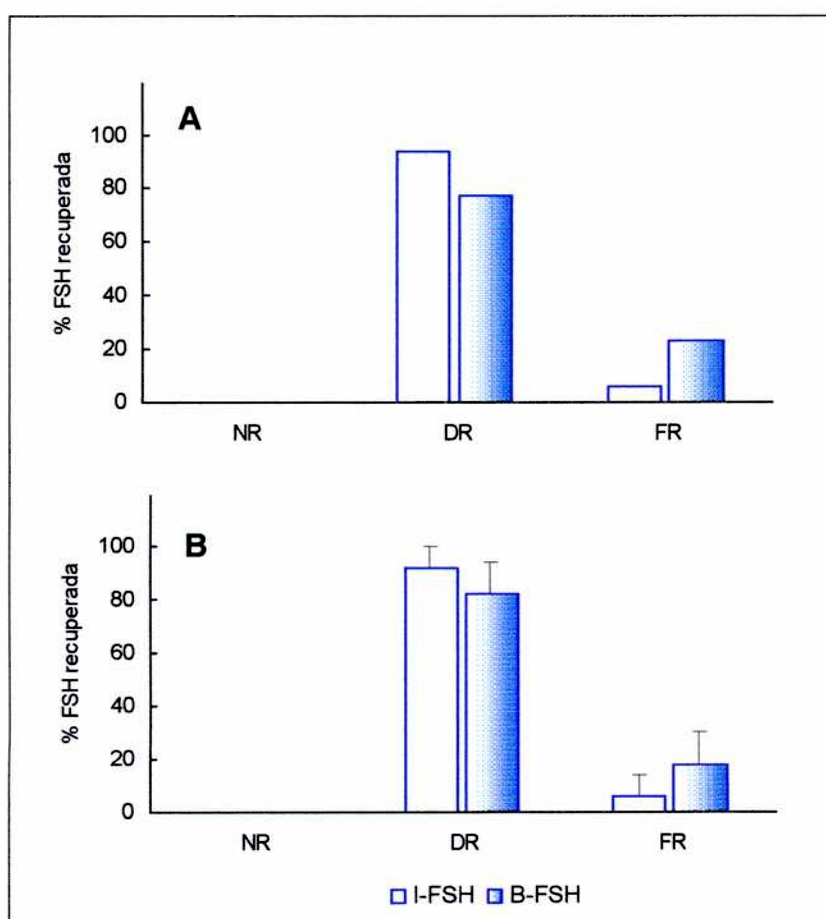


FIGURA 22: Distribución de las isoformas de FSH presentes en sueros de mujeres postmenopáusicas (SPM). Los sueros fueron procesados en forma combinada (panel A) o en forma individual (panel B). Los resultados del análisis de muestras individuales se expresan como media $\pm$ DE (n=5).

2.2.2 Separación de isoformas de FSH circulantes en mujeres en fase folicular de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Debido a que los niveles circulantes de FSH durante la fase folicular de la mujer son muy bajos, para analizar las características de las cadenas carbohidratadas internas al ácido siálico de las isoformas de FSH presentes en estos sueros fue necesario correr simultáneamente cuatro columnas con idénticas alícuotas de cada muestra. A su vez, los eluidos cromatográficos correspondientes a cada grupo de isoformas aislado fueron concentrados para posibilitar una precisa determinación de inmuno y bioactividad de FSH.

La Figura 23 muestra la distribución de isoformas de FSH circulantes presentes en la fase folicular de ciclos menstruales normales. En el panel superior se pueden observar los resultados obtenidos en la muestra combinada y en el panel inferior los resultados obtenidos en las muestras analizadas en forma individual. La FSH se distribuyó en proporciones semejantes entre isoformas no retenidas (NR) e isoformas débilmente retenidas (DR) por la lectina. El 47% de la inmunoactividad y el 44% de la bioactividad de FSH correspondieron a isoformas con estructuras de cadenas carbohidratadas triantenarias y bisectadas (NR). La relación bio a inmunoactividad, B/I, de las mismas fue 0.6 ± 0.2 .

El 53% de la inmunoactividad y el 66% de la bioactividad de FSH correspondieron a isoformas débilmente retenidas por la lectina (DR), las cuales poseen estructuras de oligosacáridos biantenarias completas y truncadas. La relación bio a inmunoactividad, B/I, de las mismas fue 0.8 ± 0.1 .

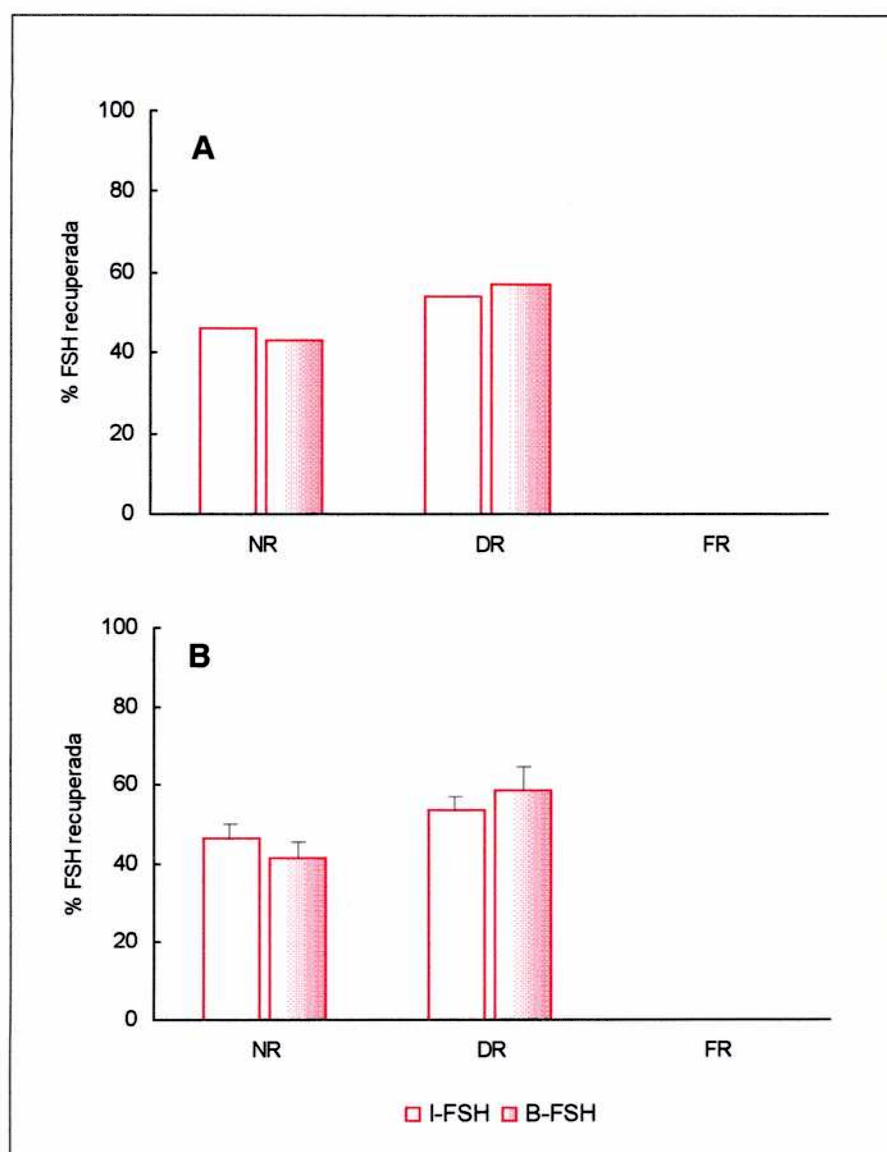


FIGURA 23 Distribución de isoformas de FSH presentes en sueros de mujeres en fase folicular (SFF). Los sueros fueron procesados en forma combinada (panel A) o en forma individual (panel B). Los resultados del análisis de muestras individuales se expresan como media $\pm$ DE (n=5).

3. CARACTERIZACION DE ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTES EN DISTINTOS ESTADIOS DEL DESARROLLO PUBERAL EN EL VARON

El objetivo de este estudio fue determinar el polimorfismo de FSH circulante en las distintas etapas del desarrollo puberal del varón.

Se agruparon los niños a estudiar de acuerdo al estadio de desarrollo puberal según Tanner en pubertad temprana (PT), pubertad media (PM) y pubertad avanzada (PA), como se describió en Materiales y Métodos. En la Tabla 13 se muestran los datos obtenidos en el examen clínico y el perfil hormonal de los niños en los distintos estadios puberales estudiados. Los parámetros evaluados fueron: la edad cronológica (EC), el volumen testicular derecho e izquierdo (VT_D ; VT_I), el vello pubiano (VP), los niveles de testosterona plasmática (T) y gonadotrofinas séricas, FSH y LH.

Los niveles de testosterona en PM y PA fueron significativamente más elevados que en PT. No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de testosterona entre la pubertad media y avanzada. Los niveles de FSH plasmática no presentaron diferencias significativas en los tres grupos estudiados. Los niveles de LH sérica se encontraron significativamente aumentados en la pubertad avanzada respecto de los niveles encontrados en la pubertad temprana.

TABLA 13: DATOS CLINICOS Y NIVELES HORMONALES DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS

	EC (años)	VT_D (ml)	VT_I (ml)	VP	T (nmol/l)	FSH (UI/l)	LH (UI/l)
PT	10.9±1.7	2.9±1.3	2.7±1.1	1.4±0.5	1.4±0.5 _a	0.9±0.3 _a	1.2±0.7 _a
PM	13.1±1.1	10.3±4.8	8.1±3.0	3.1±0.5	10.6±5.0 _b	2.0±1.8 _a	2.0±1.4 _{a,b}
PA	15.1±1.6	19.7±4.2	18.6±4.6	4.3±0.5	15.0±5.7 _b	1.7±1.2 _a	3.6±1.5 _b

Pubertad temprana (PT, n=12, estadios de Tanner I-II), pubertad media (PM, n=9, estadio de Tanner III) y pubertad avanzada (PA, n=9, estadios de Tanner IV-V). Los valores se expresan como media ± DE. Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40. Diferentes letras en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

La primera etapa en la caracterización de la FSH consistió en aislar los análogos de carga presentes en cada estadio del desarrollo puberal de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. Posteriormente, se determinó la bioactividad *in vitro* de estos análogos y, finalmente, se analizó la estructura molecular de las cadenas de carbohidratos internas al ácido siálico.

3.1 PUBERTAD TEMPRANA

3.1.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico

Los niños entre 7 y 13 años de edad fueron clasificados de acuerdo a los estadios de Tanner I y II en base al examen clínico (Tabla 14).

TABLA 14: DATOS CLINICOS Y NIVELES HORMONALES DE LOS NIÑOS EN PUBERTAD TEMPRANA

Pacientes	EC (años)	VT _D (ml)	VT _I (ml)	VP	T (nmol/l)	FSH (UI/l)	LH (UI/l)
A.J.	11.3	3	2-3	2	1.9	0.7	1.2
W.N.	11.0	3	3	2	1.6	1.2	3.0
C.M.	10.0	2	1-2	1	0.8	1.6	1.9
L.M.	12.4	4	3	1	0.8	0.8	1.4
L.D.	10.6	2-3	2-3	1	1.4	0.5	0.5
A.H.	12.0	1-2	2	1	0.7	0.8	1.6
E.P.	12.7	3	3	2	1.8	0.8	1.0
T.A.	10.7	6	5	2	1.1	0.5	0.9
G.M.	10.7	3	3	1-2	1.5	0.9	0.4
M.L.	13.0	4	4	1	2.2	1.0	0.4
Z.N.	7.0	1	1-2	1	1.2	0.7	1.0
I.D.	9.1	2	1	1	1.7	0.8	0.8

Edad cronológica (EC), volumen testicular derecho (VT_D) e izquierdo (VT_I), vello pubiano (VP) y niveles de testosterona (T), FSH y LH. Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1^{er} IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1^{er} IRP 68/40.

3.1.2 Determinación del rango de puntos isoelectricos de la FSH circulante en la pubertad temprana por isoelectroenfoque preparativo

El volumen total de suero (21 ml) proveniente de los niños en pubertad temprana fue sembrado en tres isoelectroenfoques preparativos en alícuotas de 7 ml por corrida.

En las fracciones individuales de los tres isoelectroenfoques se determinaron las proteínas totales y el pH. Las fracciones con idéntico pH provenientes de los mismos fueron combinadas. Estas fracciones combinadas fueron concentradas y en ellas se determinó la FSH inmunoreactiva presente. En la Figura 24 se muestra un ejemplo representativo del perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenidos en los isoelectroenfoques realizados. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica en las preparaciones que resultaron de la combinación de fracciones con idéntico pH de los tres isoelectroenfoques.

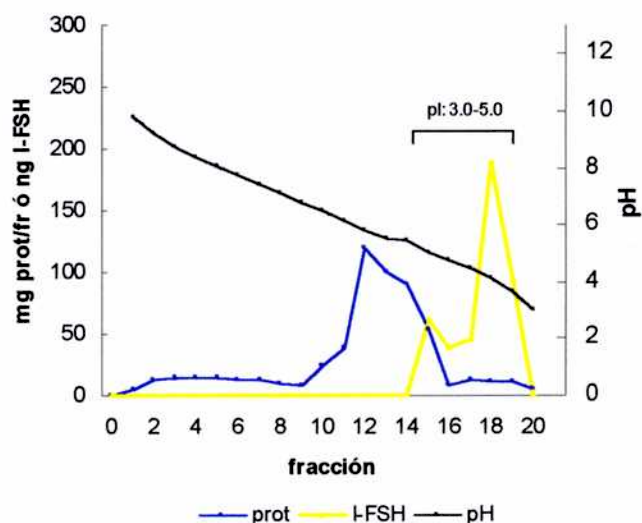


FIGURA 24: Pubertad temprana: perfil de FSH inmunológica obtenido luego de combinar fracciones con idéntico pH de tres isoelectroenfoques realizados. Perfil de proteínas totales y gradiente de pH representativos obtenidos en una corrida. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

En este estudio se determinó el porcentaje de inmuno FSH recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH (en el rango 3.0-6.0) considerando como 100% el total de la FSH inmunoreactiva recuperada en el isoelectroenfoque.

En la pubertad temprana, la FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de

pH entre 3.0-5.0. La mayor proporción de la hormona enfocó entre pH 3.0 y 4.0 (66%). No se detectaron en este estadio puberal análogos de carga entre pH 5.0 y 6.0. (Figura 25).

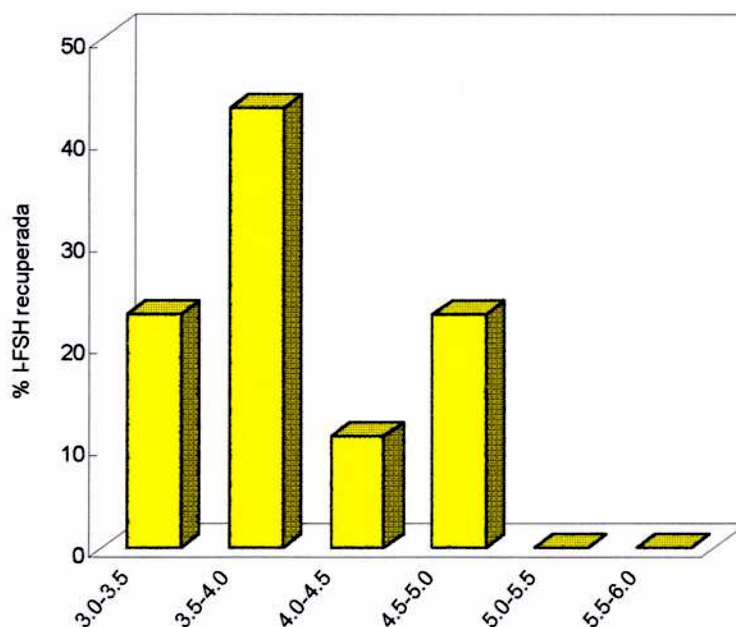


FIGURA 25: Pubertad temprana: porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH.

3.1.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de carga de FSH se reunieron los concentrados provenientes del rango de pH 3.0-5.0. Esta nueva preparación, que contenía todos los análogos de carga fue, a su vez, concentrada nuevamente. Sobre éste último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas de la hormona en cromatografía en Con-A.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, hallada en este material fue 0.6.

La distribución de isoformas de FSH luego de la cromatografía en Con-A se muestra en la Figura 26. En este estadio del desarrollo puberal se observó un predominio de isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas biantenarias completas y truncadas (44%), siguiendo en

importancia la proporción de isoformas con cadenas de oligosacáridos más incompletas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (38%). Las isoformas con cadenas triantenarias y bisectadas estuvieron presentes en una menor proporción (17%).

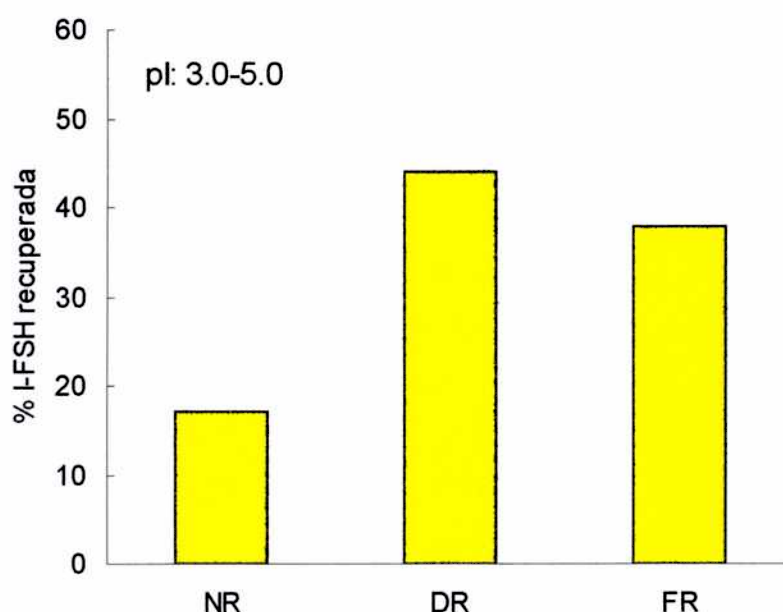


FIGURA 26: Pubertad temprana: distribución de isoformas de FSH luego de cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoco; NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

3.2 PUBERTAD MEDIA

3.2.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico

Los niños entre 11.3 y 14.7 años de edad fueron clasificados de acuerdo al estadio de Tanner III en base al examen clínico (Tabla 15).

TABLA 15: DATOS CLINICOS Y NIVELES HORMONALES DE LOS NIÑOS EN PUBERTAD MEDIA

Pacientes	EC (años)	VT _D (ml)	VT _I (ml)	VP	T (nmol/l)	FSH (UI/l)	LH (UI/l)
P.F.	12.6	12	6	3	15.2	4.5	2.6
K.G.	12.6	10	10	3	19.9	5.7	4.9
R.G.	14.0	10	10	3	13.0	1.2	0.7
B.J.M	14.3	20	12	3-4	9.6	1.5	0.7
K.M.	14.7	8-10	8	4	9.3	1.3	2.4
G.G.	13.6	6	5	3	11.7	1.9	2.8
K.J.	12.4	5	5	3	3.4	1.1	1.8
A.F.	11.3	15	12	2	7.8	0.6	1.0
G.N.	12.2	6	5	3	5.8	0.6	1.0

Edad cronológica (EC), volumen testicular derecho (VT_D) e izquierdo (VT_I), vello pubiano (VP) y niveles de testosterona (T), FSH y LH. Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40.

3.2.2 Determinación del rango de puntos isoelectricos de la FSH circulante en la pubertad media por isoelectroenfoque preparativo

El volumen total de suero (14 ml) proveniente de los niños en pubertad media fue sembrado en dos isoelectroenfoques preparativos sucesivos en alícuotas de 7 ml por cada corrida.

En las fracciones individuales de los dos isoelectroenfoques se determinaron las proteínas totales y el pH. Las fracciones con idéntico pH provenientes de los mismos fueron combinadas. Estas fracciones combinadas fueron concentradas y en ellas se determinó la FSH inmunoreactiva presente. En la Figura 27 se muestra un ejemplo representativo del perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenidos en los isoelectroenfoques realizados. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica en las preparaciones que resultaron de la

combinación de fracciones con idéntico pH de los dos isoelectroenfoques.

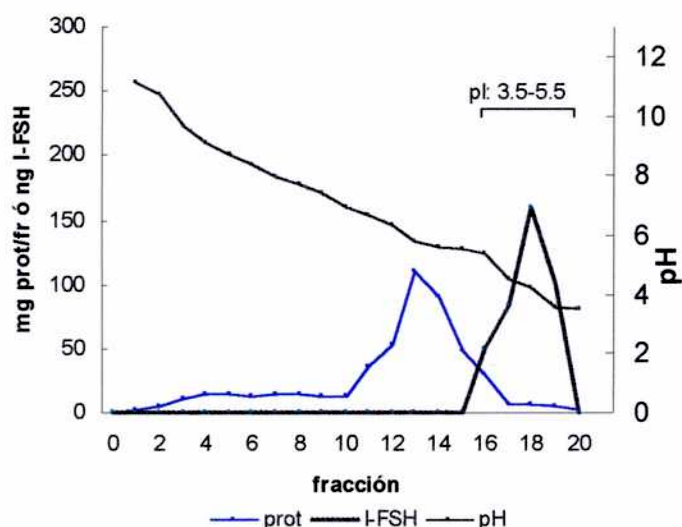


FIGURA 27: Pubertad media: perfil de FSH inmunológica obtenido luego de combinar fracciones con idéntico pH de dos isoelectroenfoques realizados. Perfil de proteínas totales y gradiente de pH representativos obtenidos en una corrida. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

La FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de pH entre 3.5 y 5.5. La mayor proporción de la hormona enfocó entre pH 3.5 y 4.5 (67%) (Figura 28).

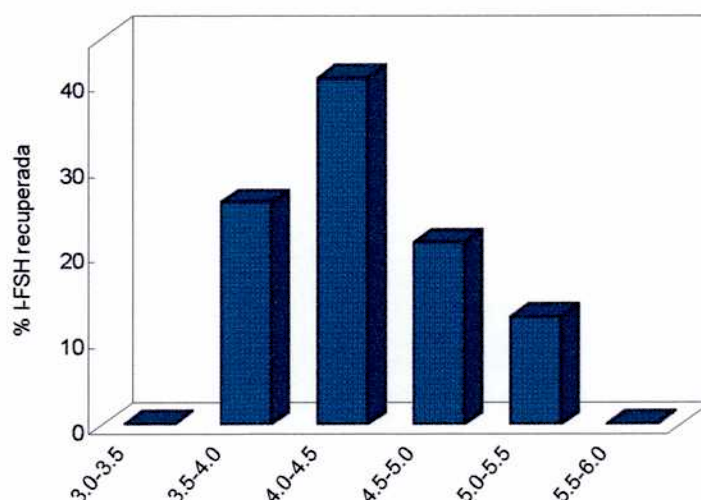


FIGURA 28: Pubertad media: porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH (en el rango 3.0-6.0) considerando como 100% el total de la FSH inmunoreactiva recuperada en el isoelectroenfoque.

3.2.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de carga de FSH se reunieron los concentrados provenientes del rango de pH 3.5-5.5. Esta nueva preparación, que contenía todos los análogos de carga fue, a su vez, concentrada nuevamente. Sobre este último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas de la hormona en cromatografía en Con-A.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, hallada en este material fue 2.4.

La distribución de isoformas de FSH luego de cromatografía en Con-A se muestra en la Figura 29. Las isoformas predominantes en este estadio de la pubertad masculina poseen cadenas carbohidratadas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (46%). Las restantes isoformas halladas se distribuyeron en similar proporción entre isoformas con cadenas de carbohidratos biantenarias completas y truncadas (29%) e isoformas con cadenas triantenarias y bisectadas (25%).

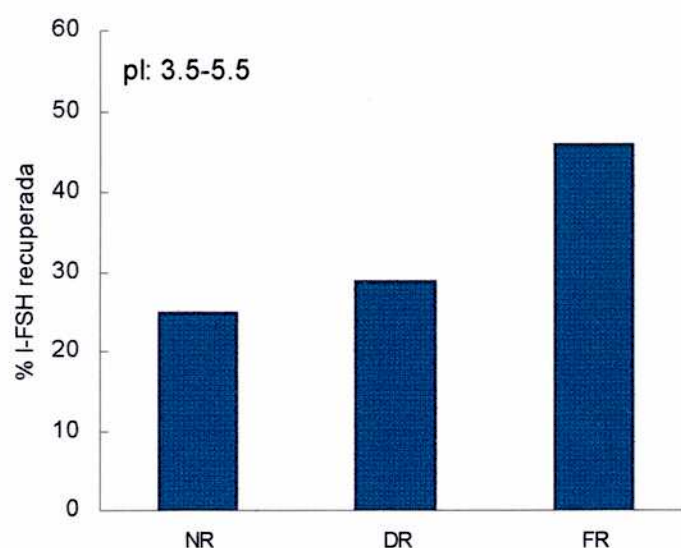


FIGURA 29: Pubertad media: distribución de isoformas de FSH luego de cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoque; NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

3.3 PUBERTAD AVANZADA

3.3.1 Evaluación clínica y perfil hormonal sérico

Los varones entre 13.5 y 18 años de edad fueron clasificados de acuerdo a los estadios de Tanner IV y V en base al examen clínico (Tabla 16).

TABLA 16: DATOS CLINICOS Y NIVELES HORMONALES DE LOS VARONES EN PUBERTAD AVANZADA

Pacientes	EC (años)	VT _D (ml)	VT _I (ml)	VP	T (nmol/l)	FSH (UI/l)	LH (UI/l)
S.M.	16.2	15	15	4	16.6	1.0	2.4
G.M.	14.4	20	20	4	8.6	1.0	1.8
N.G.	14.3	12	12	4	22.7	1.0	2.9
B.G.	15.5	20	15	4	7.5	4.4	5.3
C.M.	17.1	20	20	5	10.8	1.4	3.6
R.J.	18.0	25	25	5	18.1	2.5	4.1
B.R.	14.2	25	25	5	22.6	0.5	1.9
H.M.	13.5	20	15	4	16.9	2.7	6.4
K.P.	14.0	20	20	4	11.3	1.0	4.0

Edad cronológica (EC), volumen testicular derecho (VT_D) e izquierdo (VT_I), vello pubiano (VP) y niveles de testosterona (T), FSH y LH. Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40.

3.3.2 Determinación del rango de puntos isoelectrónicos de la FSH circulante en la pubertad avanzada por isoelectroenfoque preparativo

El volumen total de suero (18 ml) proveniente de los varones en pubertad avanzada fue sembrado en dos isoelectroenfoques sucesivos en alícuotas de 9 ml por cada corrida.

En las fracciones individuales de ambos isoelectroenfoques se determinaron las proteínas totales y el pH. Las fracciones con idéntico pH provenientes de los mismos, fueron combinadas. Estas fracciones combinadas fueron concentradas y en ellas se determinó la FSH inmunoreactiva presente. En la Figura 30 se muestra un ejemplo representativo del perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenidos en los isoelectroenfoques realizados. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica en las preparaciones que resultaron de la combinación de fracciones con idéntico pH de los dos isoelectroenfoques.

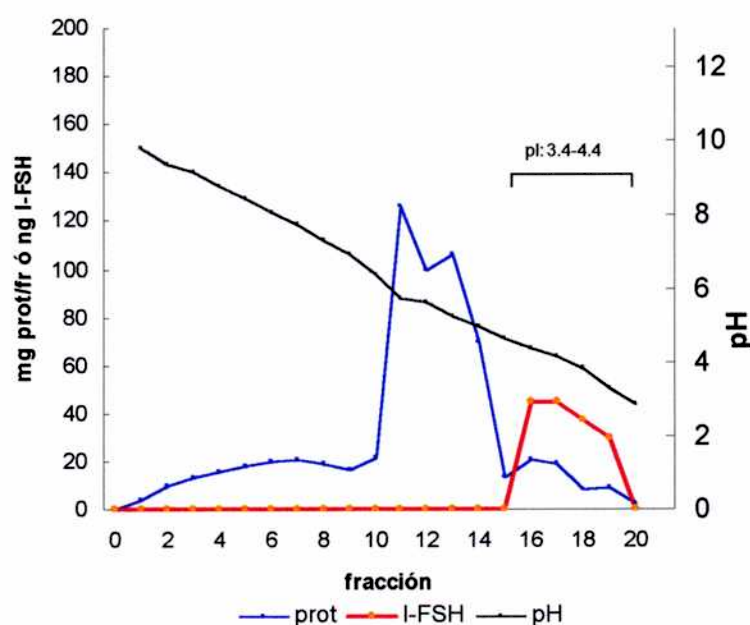


FIGURA 30: Pubertad avanzada: perfil de FSH inmunológica obtenido luego de combinar fracciones con idéntico pH de dos isoelectroenfoques realizados. Perfil de proteínas totales y gradiente de pH representativos obtenidos en una corrida. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

La FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de pH 3.4-4.4. La mayor proporción de la hormona enfocó entre pH 4.0 y 4.5 (56%) (Figura 31).

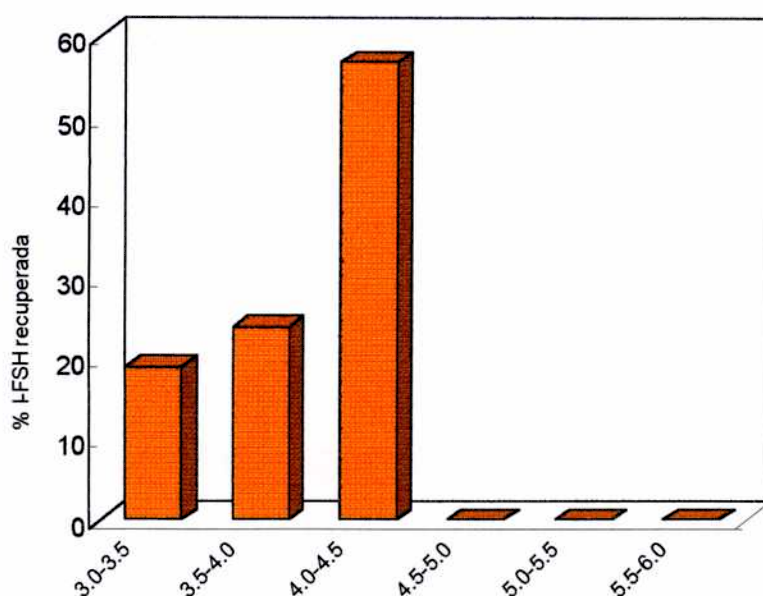


FIGURA 31: Pubertad avanzada: porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH (en el rango 3.0-6.0) considerando como 100% el total de la FSH inmunoreactiva recuperada en el isoelectroenfoque.

3.3.3 Determinación de bioactividad y distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Del mismo modo que en los grupos de niños en pubertad temprana y pubertad media previamente estudiados, para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de carga de FSH se reunieron los concentrados provenientes del rango de pH 3.4-4.4. Esta nueva preparación, que contenía todos los análogos de carga fue, a su vez, concentrada nuevamente. Sobre este último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, hallada en este material fue 0.3.

La distribución de isoformas de FSH luego de la cromatografía en Con-A se muestra en la Figura 32. En esta etapa del desarrollo puberal se observó un predominio de

isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas triantenarias y bisectadas (43%), siguiendo en importancia la proporción de isoformas con cadenas de oligosacáridos biantenarias completas y truncadas (34%). En menor proporción se encontraron las isoformas con cadenas de carbohidratos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (23%).

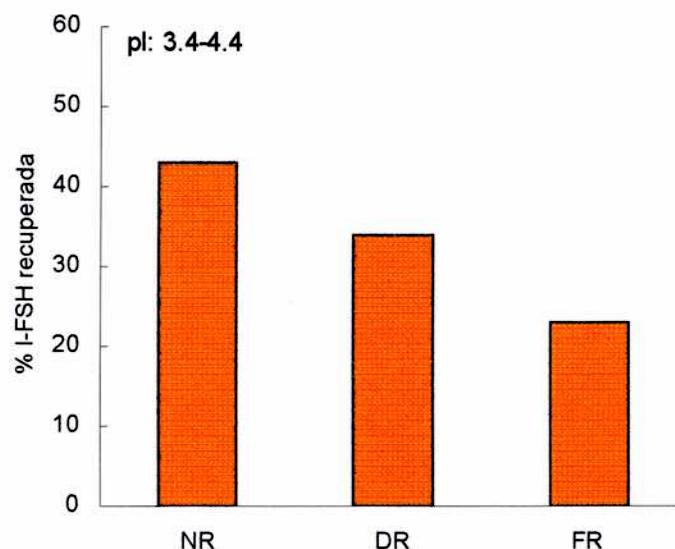


FIGURA 32: Pubertad avanzada: distribución de isoformas de FSH luego de cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoque; NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

3.4 Análisis comparativo de la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas en los distintos estadios de la pubertad en varones

En la Figura 33 pueden observarse las proporciones de isoformas con distinta estructura de cadena carbohidratada interna al ácido siálico terminal en los distintos estadios de la pubertad. Las isoformas con estructura de cadena triantenaria y bisectada aumentaron su proporción a medida que avanzó la pubertad en los varones, llegando a ser las isoformas predominantes en la pubertad avanzada. Las isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas biantenarias completas y truncadas fueron predominantes al comienzo de

la pubertad, disminuyendo su proporción en los estadios posteriores. Solamente en la pubertad media las isoformas con cadenas de carbohidratos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa constituyeron la mayor proporción de la FSH recuperada.

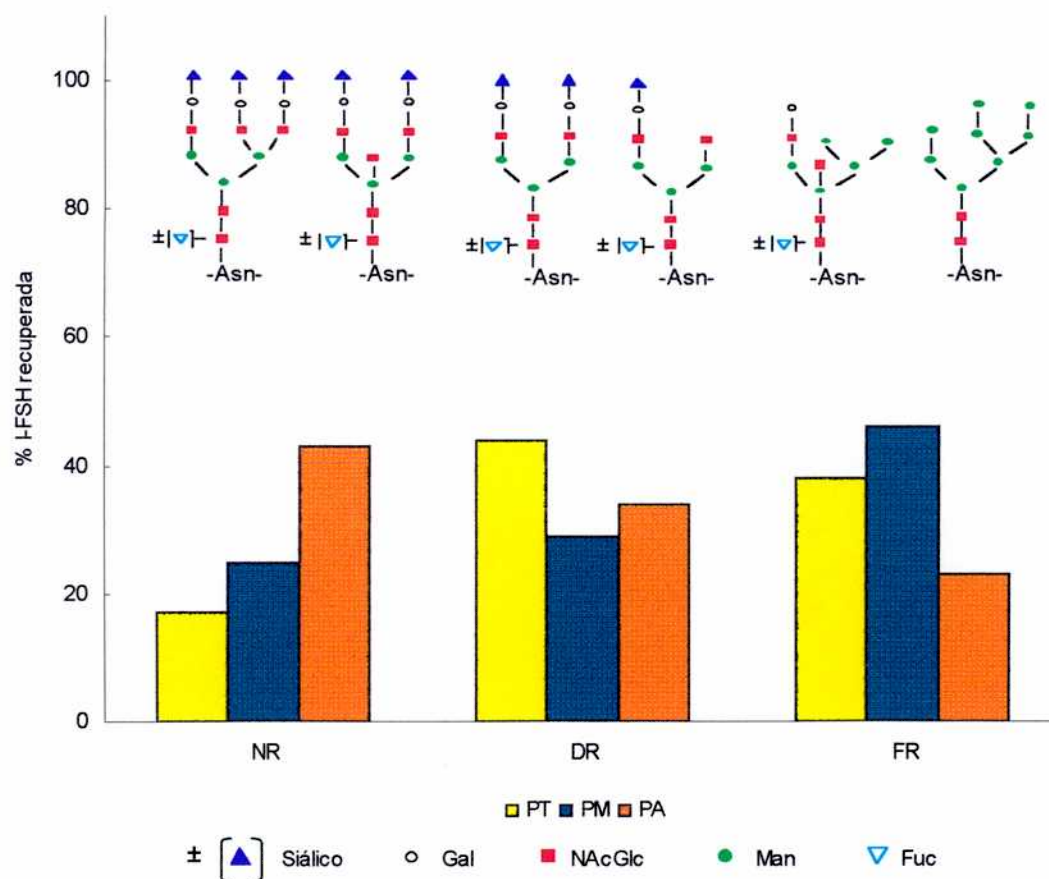


FIGURA 33: Distribución de isoformas de FSH circulantes durante la pubertad temprana(PT), pubertad media (PM) y pubertad avanzada (PA) luego de cromatografía en Con-A. Se muestra la estructura de cadena carbohidratada presente en las isoformas no retenidas (NR), débilmente retenidas (DR) y fuertemente retenidas (FR) por la lectina.

4. EFECTO DEL FACTOR LIBERADOR DE GONADOTROFINAS SOBRE LAS ISOFORMAS DE FSH CIRCULANTES EN DISTINTOS ESTADIOS DEL DESARROLLO PUBERAL EN EL VARON

El objetivo de este estudio fue evaluar los posibles cambios inducidos por la administración de GnRH sobre el polimorfismo de FSH observado en condiciones basales en los distintos estadios del desarrollo puberal del varón.

Un grupo de los niños en pubertad temprana, pubertad media y pubertad avanzada de los incluidos en el estudio de caracterización de FSH en condiciones basales fueron estudiados luego de un estímulo agudo con GnRH.

En la Tabla 17 se pueden observar los niveles séricos de FSH y LH determinados en condiciones basales y 20, 30 y 60 minutos posteriores al estímulo con GnRH.

TABLA 17: NIVELES DE FSH Y LH EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DEL ESTIMULO CON GnRH

	FSH (UI/l)				LH (UI/l)			
	Basal	20'	30'	60'	Basal	20'	30'	60'
PT	0.8 ± 0.2	1.8 ± 1.9	2.8 ± 2.1	2.5 ± 2.6	1.2 ± 0.9	11.2 ± 6.9	12.3 ± 7.7	4.9 ± 2.6
PM	2.4 ± 1.6	3.5 ± 1.8	3.8 ± 2.7	4.6 ± 3.1	2.4 ± 1.5	19.1 ± 6.2	16.8 ± 5.5	13.7 ± 3.1
PA	2.5 ± 1.6	4.0 ± 3.3	3.9 ± 3.1	4.1 ± 3.1	4.4 ± 1.9	25.0 ± 4.5	25.0 ± 4.9	22.4 ± 9.8

Pubertad temprana (PT, n=6), pubertad media (PM, n=6) y pubertad avanzada (PA, n=4) en condiciones basales y a los 20', 30' y 60' de la administración de 25 µg de GnRH a niños en PT y 50 µg de GnRH a niños en PM y PA. Los resultados de las determinaciones hormonales se muestran como media ± DE. Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40

La caracterización de la FSH se realizó 60 minutos posteriores a la administración del factor liberador de gonadotrofinas. La primera etapa en la caracterización de la FSH consistió en aislar los análogos de carga presentes en cada estadio del desarrollo puberal de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. Posteriormente, se determinó la bioactividad *in vitro* de estos análogos y, finalmente, se analizó la estructura molecular de las cadenas de carbohidratos internas al ácido siálico.

4.1 PUBERTAD TEMPRANA

4.1.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH

Los niños en pubertad temprana fueron estudiados luego de la administración de una dosis de 25 µg de GnRH. Los valores individuales de las gonadotrofinas plasmáticas en respuesta al estímulo agudo con GnRH de cada uno de los niños incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 18.

TABLA 18: NIVELES DE FSH Y LH EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE 20', 30' Y 60' DE LA ADMINISTRACION DE 25 µg DE GnRH A NIÑOS EN PUBERTAD TEMPRANA.

Pacientes	FSH (UI/l)				LH (UI/l)			
	Basal	20'	30'	60'	Basal	20'	30'	60'
A.J.	0.7	0.5	1	1.0	1.2	11.7	13.1	6.9
W.N.	1.2	2.2	2.6	2.2	3.0	22.0	26.0	8.1
L.D.	0.5	0.4	0.8	0.8	0.5	9.6	9.6	3.7
A.H.	0.8	5.4	6.3	7.7	1.0	9.9	9.5	5.3
G.M.	0.9	0.7	4.3	0.9	0.4	0.6	2.7	0.6
I.D.	0.8	1.3	1.7	2.1	0.8	13.2	12.7	4.9

Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40.

4.1.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad temprana

El volumen total de suero (9 ml) obtenido luego de 60 minutos de administrado el GnRH a los niños en pubertad temprana fue sembrado en un isoelectroenfoque preparativo.

En las fracciones individuales del isoelectroenfoque se determinaron las proteínas totales y el pH. La Figura 34 muestra el perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenido en el isoelectroenfoque realizado. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica determinada luego de concentrar cada una de las fracciones provenientes del isoelectroenfoque.

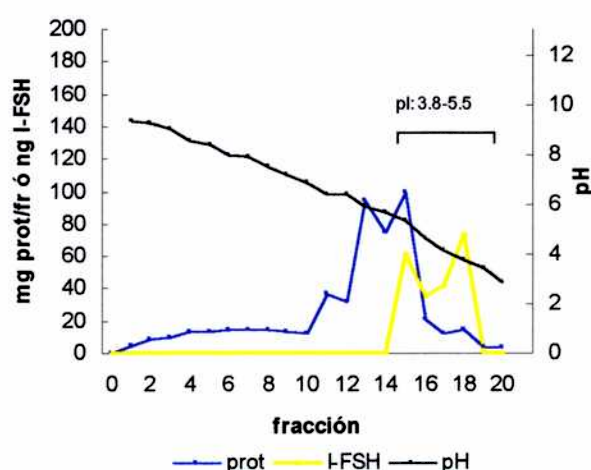


FIGURA 34: Pubertad temprana: Perfil de proteínas totales y gradiente de pH obtenido luego del isoelectroenfoque. Perfil de FSH inmunológica obtenido luego de concentrar cada una de las fracciones de la corrida realizada. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

En este estudio se determinó el porcentaje de inmuno FSH recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH (en el rango 3.0-6.0) considerando como el 100% el total de la FSH inmunoreactiva recuperada en el isoelectroenfoque.

Luego de la administración de GnRH en la pubertad temprana, la FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de pH entre 3.8 y 5.5. No se detectó FSH inmunoreactiva en el intervalo de pH 3.0-3.5, que estaba presente en condiciones basales. La proporción hallada en el rango de pH 3.5-4.0 fue del 35%. La administración de GnRH en este estadio del

desarrollo puberal indujo la aparición de un 29% de FSH en el intervalo de pH 5.0-5.5 que no estaba presente en condiciones basales (Figura 35).

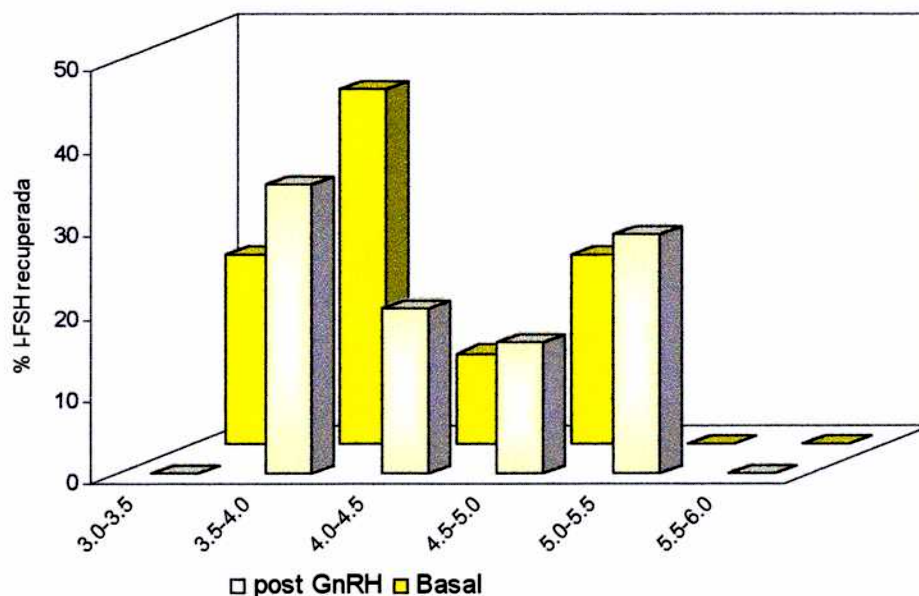


FIGURA 35: Pubertad temprana: efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH. Porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH tanto en condiciones basales como luego del estímulo con GnRH.

4.1.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de carga de FSH se reunieron los concentrados provenientes del rango de pH 3.5-5.5. Esta nueva preparación, que contenía todos los análogos de carga, fue a su vez, concentrada. Sobre este último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas de la hormona en cromatografía en Con-A.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, hallada en este material fue 0.6.

La distribución de isoformas de FSH luego de cromatografía en Con-A se muestra en la

Figura 36. Luego de la administración de GnRH, en la pubertad temprana se observó un predominio de isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas triantenarias y bisectadas (41%), siguiendo en importancia la proporción de isoformas con cadenas de oligosacáridos más incompletas, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (36%). Las isoformas con cadenas biantenarias completas y truncadas estuvieron presentes en una menor proporción (23%).

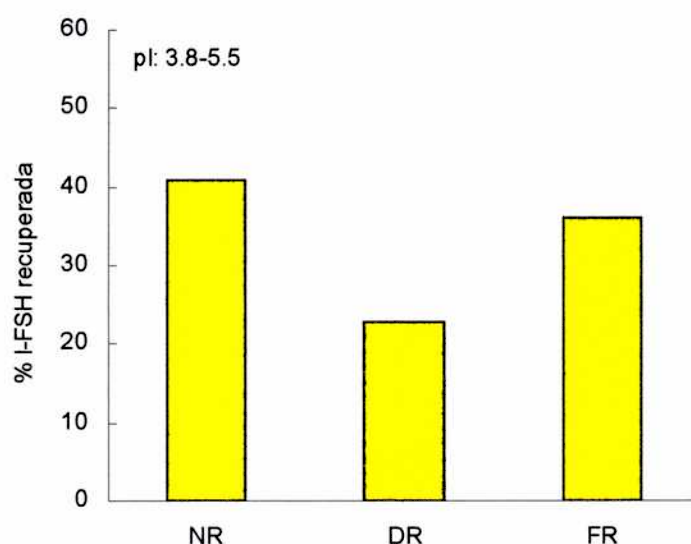


FIGURA 36: Pubertad temprana luego del estímulo con GnRH: distribución de isoformas de FSH en cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoque. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

4.2 PUBERTAD MEDIA

4.2.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH

Los niños en pubertad media fueron estudiados luego de la administración de una dosis de 50 μ g de GnRH. Los valores individuales de las gonadotrofinas plasmáticas en respuesta al estímulo agudo con GnRH de cada uno de los niños incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 19.

TABLA 19: NIVELES DE FSH Y LH EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE 20', 30' Y 60' DE LA ADMINISTRACION DE 50 µg DE GnRH A NIÑOS EN PUBERTAD MEDIA.

Pacientes	FSH (UI/l)				LH (UI/l)			
	Basal	20'	30'	60'	Basal	20'	30'	60'
P.F.	4.5	6.6	8.9	10.1	2.6	26.5	26.9	17.0
G.G.	1.9	2.2	2.5	2.8	2.8	13.2	13.5	12.5
R.G.	1.2	2.2	2.1	3.1	0.7	12.7	12.9	8.9
K.G.	5.7	4.7	4.6	6.4	4.9	17.2	19.0	17.2
B.J.M.	1.5	2.5	2.7	3.2	0.7	26.6	15.7	13.6
K.M.	1.3	2.6	1.8	1.8	2.4	18.6	12.9	12.8

Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40

4.2.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad media

El volumen total de suero (6 ml) obtenido luego de 60 minutos de administrado el GnRH a los niños en pubertad media fue sembrado en dos isoelectroenfoques preparativos en alícuotas de 3 ml por corrida.

En las fracciones individuales de ambos isoelectroenfoques se determinaron las proteínas totales y el pH. Posteriormente, las fracciones con idéntico pH provenientes de los mismos, fueron combinadas. Estas fracciones combinadas fueron concentradas y en ellas se determinó la FSH inmunoreactiva presente. En la Figura 37 se muestra un ejemplo representativo del perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenidos en los isoelectroenfoques realizados. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica en las preparaciones que resultaron de la combinación de fracciones con idéntico pH de los dos isoelectroenfoques.

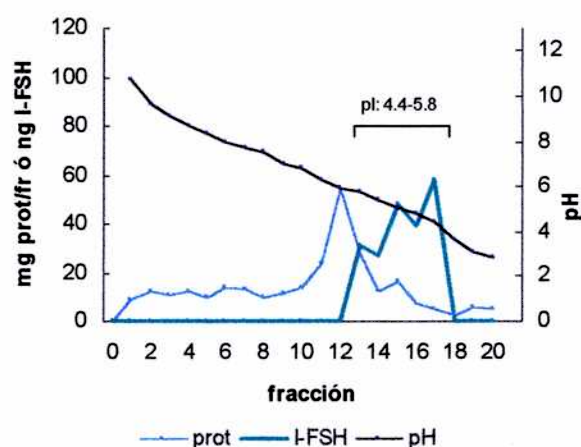


FIGURA 37: Pubertad media: perfil de FSH inmunológica obtenido luego de combinar fracciones con idéntico pH de dos isoelectroenfoques preparativos realizados. Perfil de proteínas totales y gradiente de pH representativos obtenidos en una corrida. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

La FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de pH entre 4.4 y 5.8. No se detectó inmunoreactividad de FSH en el rango de pH 3.5-4.0 y aparecieron isoformas en el rango de pH entre 5.5 y 6.0 que no estaban presentes en los sueros de los niños en condiciones basales. El 51% del total de la FSH recuperada enfocó en el rango de pH 5.0-6.0 (Figura 38) mientras que en condiciones basales solamente se recuperó en el mismo intervalo de pH el 12% de la FSH.

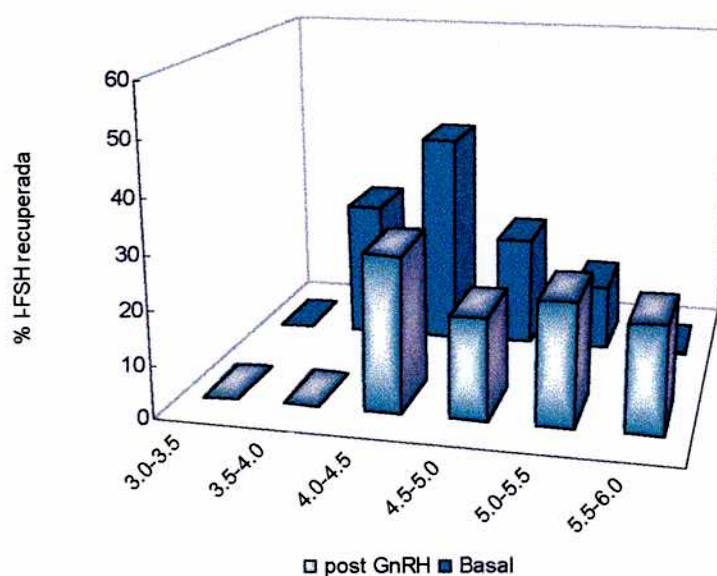


FIGURA 38: Pubertad Media: Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH. Porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH tanto en condiciones basales como luego del estímulo con GnRH.

4.2.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de FSH se reunieron los concentrados provenientes de un rango de pH entre 4.0 y 6.0. Esta nueva preparación, que contenía todos los análogos de carga, fue a su vez concentrada nuevamente. Sobre este último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas de la hormona en cromatografía en Con-A.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, encontrada en este material fue 2.6.

La distribución de isoformas de FSH luego de la cromatografía en Concanavalina A se muestra en la Figura 39. Luego de la administración de GnRH, en la pubertad media se observó un predominio de isoformas de FSH con cadenas carbohidratadas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (64%). Las restantes isoformas halladas se distribuyeron en similar proporción entre isoformas con cadenas de carbohidratos más ramificadas, triantenarias y bisectadas (18%) y biantenarias completas y truncadas (18%). Esta distribución es muy semejante a la observada en condiciones basales.

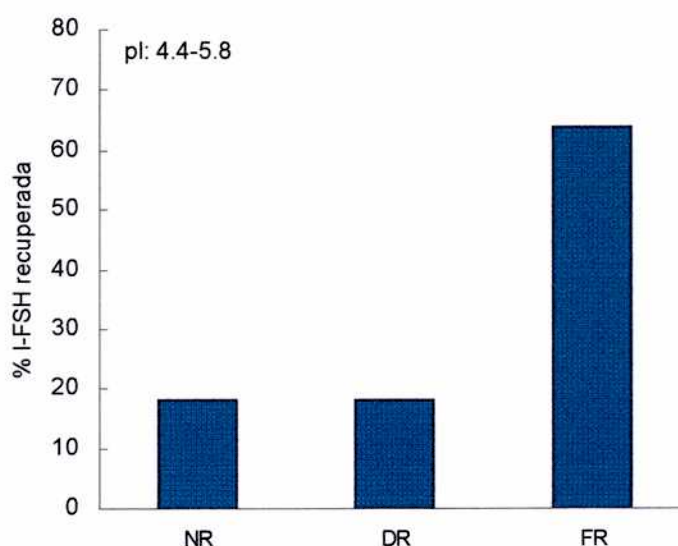


FIGURA 39: Pubertad media luego del estímulo con GnRH: distribución de isoformas de FSH en la cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoque. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

4.3 PUBERTAD AVANZADA

4.3.1 Niveles de gonadotrofinas séricas luego del estímulo con GnRH

Los varones en pubertad avanzada fueron estudiados luego de la administración de una dosis de 50 μ g de GnRH. Los valores individuales de las gonadotrofinas plasmáticas en respuesta al estímulo agudo con GnRH de cada uno de los varones incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 20.

TABLA 20: NIVELES DE FSH Y LH EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE 20', 30' Y 60' DE LA ADMINISTRACION DE 50 μ g DE GnRH A VARONES EN PUBERTAD AVANZADA.

Pacientes	FSH (UI/l)				LH (UI/l)			
	Basal	20'	30'	60'	Basal	20'	30'	60'
B.R.	0.5	1	1.2	1.3	1.9	22.6	21	10.5
H.M.	2.7	2.8	3.1	3.0	6.4	22.8	22.3	23.4
R.J.	2.5	3.4	3.0	3.6	4.1	22.9	24.9	34.5
B.G.	4.4	8.7	8.3	8.6	5.3	31.8	31.9	21.1

Los niveles de FSH se expresan en UI/l de 1st IRP 69/104 y los de LH en UI/l de 1st IRP 68/40

4.3.2 Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH circulante en la pubertad avanzada

El volumen total de suero (4 ml) obtenido luego de 60 minutos de administrado el GnRH a los varones en pubertad avanzada fue sembrado en un isoelectroenfoque preparativo.

En las fracciones individuales del isoelectroenfoque se determinaron las proteínas totales y el pH. La Figura 40 muestra el perfil de proteínas y el gradiente de pH obtenido en el isoelectroenfoque realizado. En la misma figura se muestra el contenido de FSH inmunológica determinada luego de concentrar cada una de las fracciones provenientes del isoelectroenfoque.

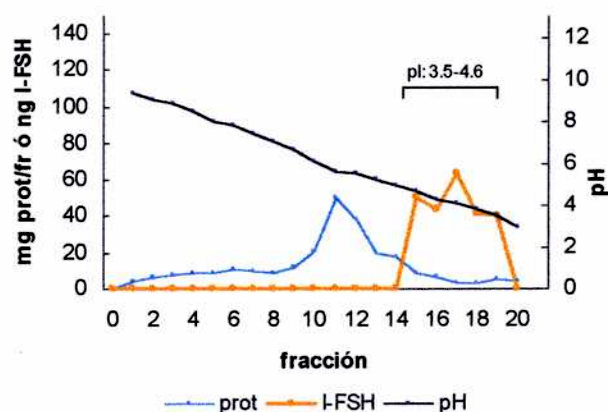


FIGURA 40: Pubertad avanzada Perfil de proteínas y gradiente de pH obtenido luego del isoelectroenfoque. Perfil de FSH inmunológica resultante de concentrar cada una de las fracciones de la corrida realizada. Los niveles de FSH inmunológica están expresados en ng de LER 907.

Luego de la administración de GnRH en la pubertad avanzada, la FSH fue recuperada en el isoelectroenfoque en el rango de pH entre 3.5 y 4.6. No se detectó FSH inmunoreactiva en el intervalo de pH 3.0-3.5. Entre pH 3.5 y 4.0 enfocó un 34% de la FSH inmunoreactiva. La administración de GnRH en este estadio de desarrollo puberal indujo la aparición de isoformas en el intervalo de pH 4.5-5.0 que no estaban presentes en condiciones basales (Figura 41).

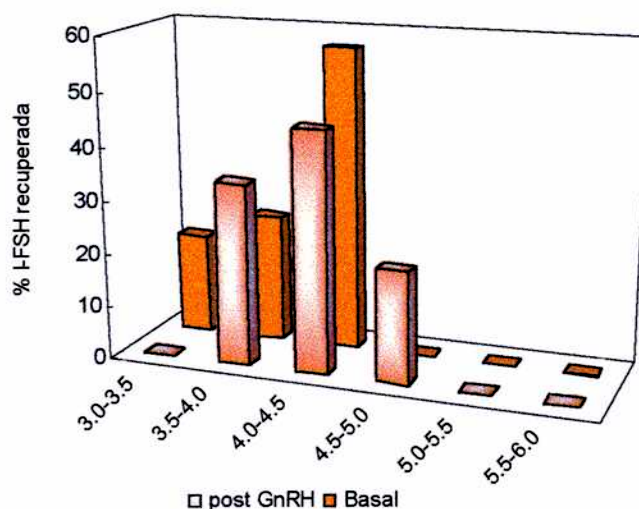


FIGURA 41: Pubertad avanzada: Efecto del GnRH sobre los análogos de carga de la FSH. Porcentaje de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH tanto en condiciones basales como luego del estímulo con GnRH.

4.3.3 Efecto del GnRH sobre la bioactividad y la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas

Para determinar la biopotencia y analizar la estructura de las cadenas carbohidratadas de los análogos de FSH se reunieron los concentrados del rango de pH 3.5-5.0. Esta preparación, que contenía todos los análogos de carga, fue a su vez concentrada nuevamente. Sobre este último material se determinó la FSH bio e inmunoactiva y se realizó la caracterización de las cadenas carbohidratadas de la hormona en cromatografía en Con-A.

La relación bio a inmunoactividad, B/I, encontrada en este material fue 0.5.

La distribución de isoformas de FSH luego de la cromatografía en Concanavalina A se muestra en la Figura 42. Luego del estímulo con GnRH en la pubertad avanzada se observó que las isoformas de FSH se distribuyeron en proporciones similares entre isoformas con cadenas de carbohidratos más ramificadas, triantenarias y bisectadas (39%) y biantenarias completas y truncadas (38%). Una menor proporción correspondió a isoformas con cadenas carbohidratadas de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (23%). Esta distribución es semejante a la observada en condiciones basales.

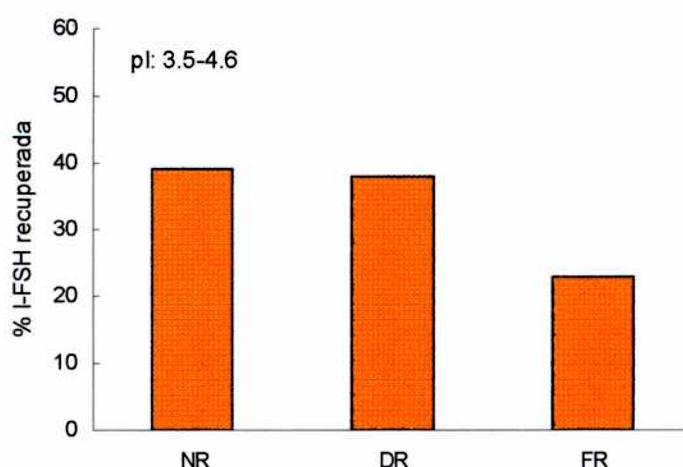


FIGURA 42: Pubertad avanzada luego del estímulo con GnRH: distribución de isoformas de FSH en cromatografía en Con-A. Se muestra el rango de puntos isoeléctricos de los análogos de carga de FSH aislados por isoelectroenfoco. NR: isoformas no retenidas por la lectina; DR: isoformas débilmente retenidas por la lectina; FR: isoformas fuertemente retenidas por la lectina.

4.4 Análisis comparativo de la distribución de análogos de carga de FSH en los distintos estadios de la pubertad en varones

En la Figura 43 se muestran los rangos de puntos isoeléctricos de la FSH inmunológica recuperada luego del isoelectroenfoque, tanto en condiciones basales como luego de un estímulo agudo con GnRH administrado a niños en pubertad temprana, media y avanzada. Puede observarse que durante la pubertad media se encontraron en condiciones basales análogos de carga de FSH más básicos, con rango de puntos isoeléctricos más altos que los correspondientes a los restantes estadios de la pubertad.

El estímulo con GnRH produjo en todos los estadios de la pubertad masculina, un corrimiento en el rango de puntos isoeléctricos observado en condiciones basales, hacia análogos de carga más básicos. En todos los casos, el desplazamiento en los puntos isoeléctricos observado en los análogos de carga correspondió a 0.5 unidades de pH.

4.5 Análisis comparativo de la distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas en los distintos estadios de la pubertad en varones

En la Figura 44 (pág. 110) se muestra la distribución en cromatografía en Con-A de las isoformas de FSH circulantes durante la pubertad temprana, media y avanzada, tanto en condiciones basales como luego de un estímulo agudo con GnRH. Puede observarse que solamente se produce una modificación en el perfil de distribución de las isoformas de acuerdo a la estructura de su cadena interna cuando se administra GnRH durante la pubertad temprana. Este cambio consistió en la modificación del perfil encontrado en condiciones basales en el cual predominaban las isoformas con cadenas de carbohidratos biantenarias y truncadas y las de tipo híbrido y alto contenido en manosa. Luego de administrar el GnRH se observó el predominio de isoformas con cadenas de oligosacáridos triantenarias y de tipo híbrido y alto contenido en manosa.

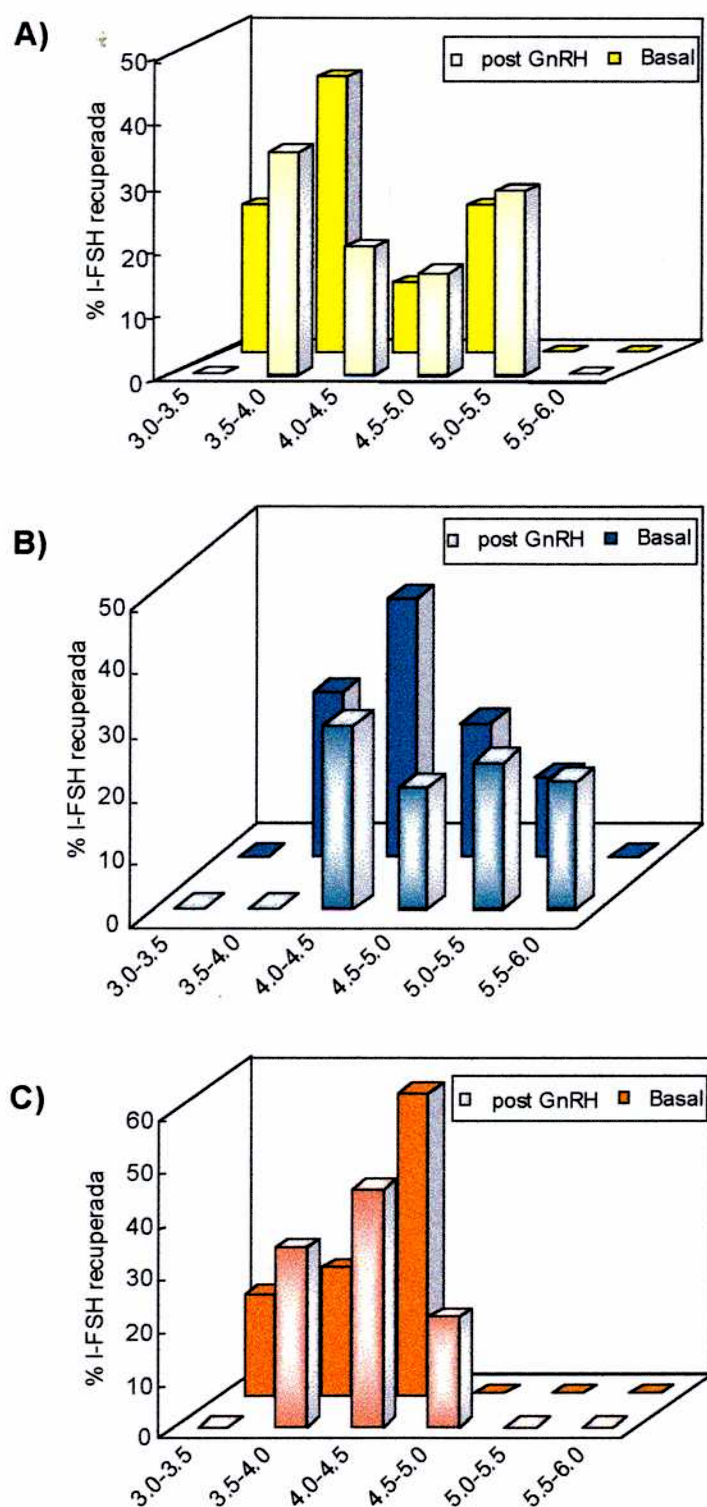


FIGURA 43: Separación de análogos de carga de FSH de acuerdo a su punto isoelectrónico en la pubertad temprana (A), pubertad media (B) y pubertad avanzada (C), en condiciones basales y luego de un estímulo agudo con GnRH. Porcentajes de FSH inmunológica recuperada en intervalos de 0.5 unidades de pH, considerando como 100% el total de la FSH inmunológica recuperada en el isoelectroenfoco.

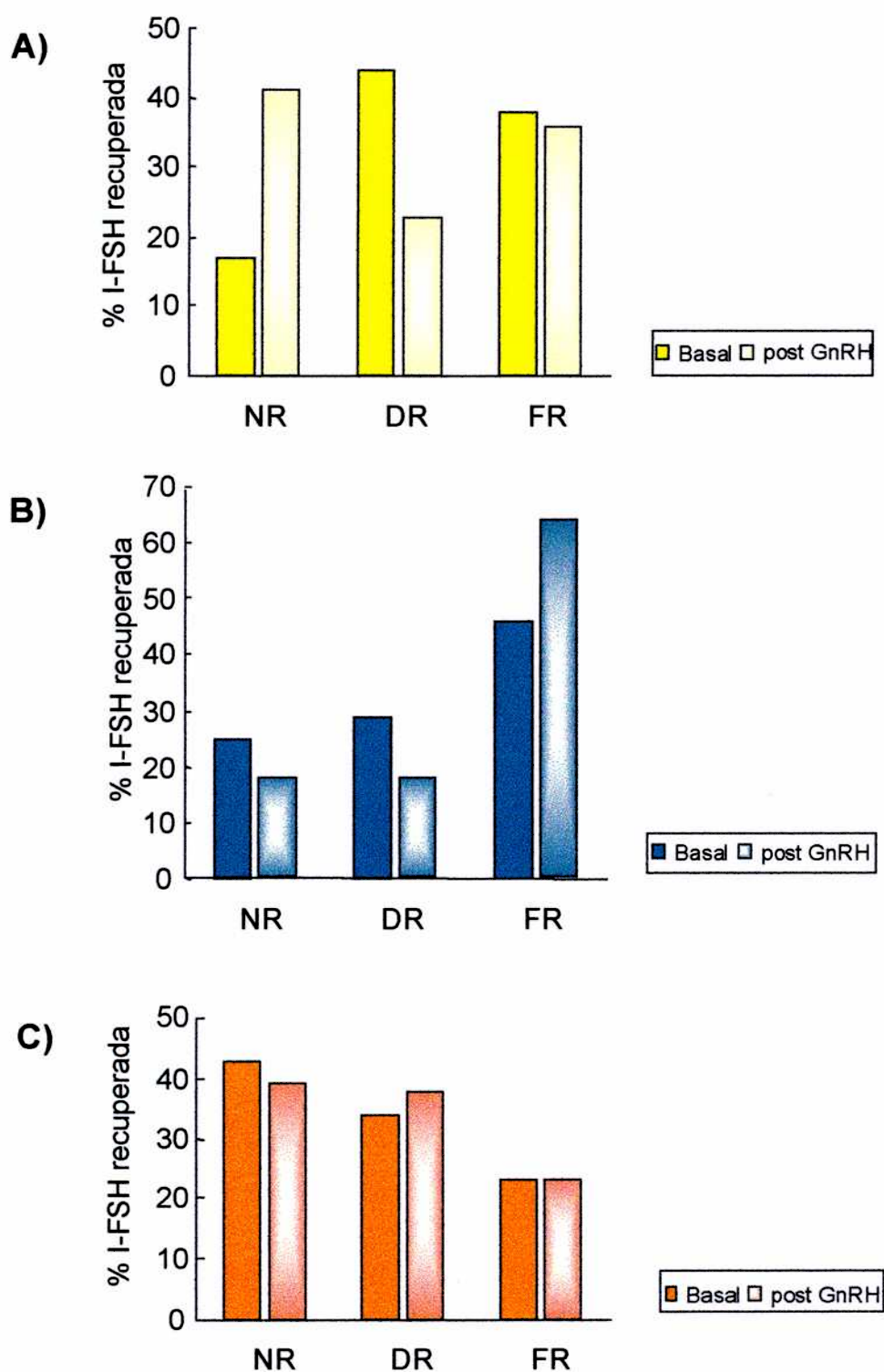


FIGURA 44: Distribución en cromatografía en Con-A de isoformas de FSH circulantes durante la pubertad temprana (A), pubertad media (B) y pubertad avanzada (C), en condiciones basales y luego de un estímulo agudo con GnRH.

Discusión

La existencia de la FSH como una familia heterogénea de moléculas fue descrita hace más de 25 años ante la necesidad de aislar hormona pura para el desarrollo de técnicas de radioinmunoensayo. Numerosas especies moleculares de la misma hormona fueron identificadas en base a su carga o peso molecular, las cuales presentaban potencias biológicas diferentes (Reichert, 1971). También a mediados de la década del 70 varios investigadores demostraron que esta heterogeneidad molecular era modificada por el estado endocrino de la especie en estudio (Peckham y col., 1973; Bogdanove y col., 1974).

Este polimorfismo hormonal es debido a variaciones en la composición y estructura de los oligosacáridos unidos a las cadenas polipeptídicas y ha sido observado no sólo en la FSH sino también en otras hormonas glicoproteicas las cuales se presentan como una familia heterogénea de isoformas con diferentes propiedades biológicas y farmacocinéticas (Ulloa-Aguirre y col., 1992a).

La FSH se sintetiza, circula y se excreta como un continuo de isoformas (Ulloa-Aguirre y col., 1983; 1992c). Esta característica ha sido observada en diferentes especies de mamíferos, incluyendo al hombre (Wide, 1982; 1985; Ulloa-Aguirre y col., 1992a).

Las gonadas y el hipotálamo modulan la calidad de la hormona sintetizada y secretada por el gonadotropo (Ulloa-Aguirre y col., 1992b; Wide y Naessén, 1994; Wide y Albertsson-Wikland, 1990). Esta regulación se ejercería a través de la incorporación de los diferentes residuos a los oligosacáridos presentes en las isoformas.

La presencia de carbohidratos en la molécula de las hormonas glicoproteicas es esencial para la expresión de la actividad biológica (Sairam y Manjunath, 1982). Estos carbohidratos son incorporados en forma co-traduccional al polipéptido. Su procesamiento no es un proceso biosintético al azar sin significado fisiológico, sino una síntesis estrictamente ordenada, en la cual cada oligosacárido condiciona la incorporación del siguiente residuo (Schachter, 1986). De esta forma quedan determinadas las características biológicas de la glicoproteína: permanencia de la hormona en circulación, la afinidad de la hormona por el receptor específico y la respuesta biológica en la célula blanco (Ulloa-Aguirre y col., 1995).

La mayoría de los estudios realizados sobre el polimorfismo de la FSH se han basado en las diferencias en el contenido de ácido siálico, su relación con la permanencia de la hormona en circulación y con su bioactividad *in vitro*. Sin embargo, Green y Baenziger (1988) han observado que las moléculas de FSH no difieren solamente en el contenido de

ácido siálico sino que también existen moléculas con distinta estructura de carbohidratos interna al ácido siálico. También otros autores (Wide, 1985) observaron que la heterogeneidad molecular de la FSH se mantiene luego de la eliminación enzimática de los residuos de ácido siálico.

En la actualidad se desconoce con precisión cuál es el significado fisiológico de la existencia de numerosas variantes moleculares de FSH con distinto contenido de ácido siálico y diferente estructura interna de las cadenas carbohidratadas unidas al polipéptido.

Este estudio fue realizado con el propósito de determinar el polimorfismo de la FSH humana y relacionarlo con la potencia biológica *in vitro* de las distintas isoformas, analizando además, la regulación que los cambios en el entorno hormonal podrían ejercer sobre las características moleculares y biológicas de la hormona circulante.

La primera parte de esta Tesis fue orientada a la caracterización de la FSH presente en extractos hipofisarios humanos. Este análisis fue realizado para determinar la relación que existe entre la biopotencia de la hormona *in vitro*, el contenido de ácido siálico terminal y la estructura interna de la porción carbohidratada de la molécula. El objetivo de esta caracterización también consistió en identificar isoformas de FSH con estructuras carbohidratadas específicas cuya actividad biológica *in vitro* fuera modificada por el contenido de ácido siálico presente en las mismas y diferenciarlas de aquellas que mantuvieran su biopotencia en forma independiente del contenido de este residuo terminal.

Cabe señalar que hasta el presente no existen datos en la literatura que permitieran demostrar la existencia de esta relación.

La caracterización de la FSH hipofisaria se inició con un cromatoenfoque que permitió aislar análogos de carga de acuerdo a su punto isoeléctrico, el cual está determinado principalmente por el contenido de ácido siálico.

Posteriormente, la biopotencia de los distintos grupos de análogos de carga fue analizada en un bioensayo basado en la estimulación de la actividad aromatasa de células de Sertoli en cultivo.

Para establecer la estructura interna de las cadenas carbohidratadas presentes en los distintos grupos de análogos de carga aislados, éstos fueron analizados en cromatografía seriada en diferentes lectinas. Se determinó luego la biopotencia *in vitro* de las isoformas con diferentes estructuras de oligosacáridos aisladas.

En los extractos hipofisarios estudiados, la mayor proporción de FSH aislada correspondió a isoformas ácidas, con alto contenido de ácido siálico (grupos IV y V).

El grupo V de análogos de carga fue obtenido eluyendo la columna con alta concentración salina. Este grupo de isoformas fue caracterizado previamente por Chappel y colaboradores (1984) en hipófisis de primates. Estos autores realizaron una desialilación enzimática de las isoformas contenidas en el eluido con alta concentración de NaCl; y analizándolos en un cromatoenfoque posterior pudieron aislar análogos de carga con puntos isoeléctricos mayores de 4.0. Estos resultados indicarían que el grupo V está constituido por un grupo heterogéneo de análogos de carga que quedó retenido en la columna en forma inespecífica. Sin embargo, cuando se realizó una cromatografía de intercambio iónico del material contenido en el pico de sal, se observó que este material contenía análogos con carga fuertemente negativa, que correspondería a hormona con alto contenido de ácido siálico.

Coincidiendo con estas últimas observaciones, Blum y colaboradores (1985) utilizando un cromatoenfoque con un rango de pH cuyo extremo inferior era 3.0, pudieron recuperar numerosos picos de FSH inmunoreactiva con puntos isoeléctricos entre 3.0 y 4.0.

Si bien en el presente trabajo no se realizó un análisis del contenido de ácido siálico de los análogos presentes en el pico de sal, los resultados obtenidos al aislar los análogos de carga de acuerdo a la estructura interna de la cadena de carbohidratos que serán descriptos más adelante, muestran un predominio de isoformas con estructuras de cadena de tipo complejo que permiten el agregado de numerosos residuos de ácido siálico terminal. Estos resultados coincidirían con la hipótesis de que el pico de sal estaría constituido por análogos de carga fuertemente negativa que no pudieron eluir del cromatoenfoque debido a que el extremo inferior del rango de pH utilizado no incluyó valores menores de 4.0.

Cuando se analizó el perfil de distribución de los análogos de carga contenidos en los extractos hipofisarios se pudo observar que las proporciones disminuyeron marcadamente a medida que la columna fue eluida en la zona de pH superior a 5.0. Sólo una pequeña proporción de isoformas presentó puntos isoeléctricos superiores a 5.0 (pl 5.0-5.3: 9.4%; pl 5.5-6.2: 6.0%; pl 6.6-7.4: 1.4%). La distribución de análogos de carga de FSH hipofisaria humana observada en estos extractos es similar a los perfiles obtenidos en modelos experimentales, donde también fueron aislados en mayor proporción los análogos de carga con alto contenido de ácido siálico.

Estudios realizados en ratas macho adultas mostraron que el 94.4% de la FSH hipofisaria analizada correspondía a análogos de carga con puntos isoeléctricos menores

de 4.7 y esta proporción era algo menor (82.7%) si la FSH provenía de ratas hembra (Foulds y Robertson, 1983).

También los estudios realizados por Chappel y colaboradores (1984) en hipófisis de monas adultas ovariectomizadas confirmaron la preponderancia de análogos de carga con puntos isoeléctricos menores de 5.0 en la FSH almacenada en la hipófisis.

Teniendo en cuenta las evidencias obtenidas en el presente estudio y los trabajos mencionados anteriormente, es posible concluir que la glándula hipófisis almacena preferentemente análogos de carga de FSH con un alto contenido de residuos de ácido siálico en sus cadenas de oligosacáridos.

Cuando se determinó en los distintos grupos de análogos de carga aislados, la capacidad de estimular la actividad aromataza en un sistema *in vitro*, se encontró que la relación entre el contenido de ácido siálico en los análogos de carga y la capacidad de estimular la actividad aromataza en células de Sertoli en cultivo era inversa. Los análogos de carga de FSH con un alto contenido de ácido siálico presentaron una menor capacidad de estimular la producción de estrógenos en las células blanco, existiendo una correlación negativa altamente significativa entre el pI de los análogos de carga y la relación B/I de las mismas. La biopotencia de los análogos de carga con puntos isoeléctricos en el rango 5.5-6.2 fue 3 veces mayor que la biopotencia de los análogos con puntos isoeléctricos menores de 4.7.

Una relación semejante entre el contenido de ácido siálico de los análogos de carga aislados y la biopotencia *in vitro* fue hallada por Padmanabhan y colaboradores (1988a) quienes analizaron la FSH secretada por un tumor hipofisario humano. En este estudio, utilizando también células de Sertoli en cultivo como sistema biológico, se observó que los análogos de carga con menor contenido de ácido siálico presentaban mayor biopotencia.

También se obtuvieron resultados semejantes en los trabajos realizados por Ulloa-Aguirre y colaboradores (1992a) en los cuales se determinó la biopotencia de análogos de carga de FSH hipofisaria humana con un bioensayo basado en la estimulación de la actividad aromataza en células de la granulosa en cultivo.

Los resultados obtenidos en estudios que utilizan un ensayo de radioreceptor, el cual analiza la capacidad de unión que poseen las variantes moleculares de FSH por el receptor específico de membrana, han demostrado que la menor capacidad para estimular la producción de estradiol en células blanco en cultivo de los análogos de carga altamente sialilados se debe a una disminución de su afinidad por el receptor (Ulloa-Aguirre y

Chappel, 1982; Chappel y col., 1984; Ulloa-Aguirre y col., 1992a).

Si bien el ácido siálico disminuye la bioactividad de la FSH *in vitro*, su presencia prolonga la permanencia de la hormona en circulación.

Ulloa-Aguirre y colaboradores (1992a) observaron que el tiempo de vida media de los análogos de carga hipofisarios humanos con menor contenido de ácido siálico (pl: 5.9-5.3) era mucho menor que el de los análogos más sialilados (pl: 3.9-3.8). Estos tiempos de vida media, fueron respectivamente 35.4 y 69.1 minutos. Resultados similares fueron obtenidos por Wide y Wide (1984) quienes inyectaron en ratones los extractos hipofisarios provenientes de mujeres jóvenes y mayores de 70 años de edad. Estos autores observaron que el tiempo de vida media de la FSH de las mujeres mayores de 70 años se duplicaba ($t_{1/2}$: 15.8 vs 30.8), y concluyeron que ésto era debido al mayor contenido de ácido siálico que presentaban los análogos de carga aislados en estos últimos extractos (Wide y Hobson, 1982).

Considerando que la mayor proporción de FSH aislada en los extractos hipofisarios humanos correspondió a análogos de carga altamente sialilados, se puede concluir que la hormona almacenada en la hipófisis humana, en su mayor proporción, posee baja actividad biológica *in vitro* pero alta biopotencia *in vivo*. La relación directa entre el contenido de ácido siálico y la permanencia de una glicoproteína en circulación fue descrita por Morell y colaboradores (1971). La presencia de receptores hepáticos específicos para residuos galactosa terminales presentes en las cadenas de carbohidratos demostrada por Ashwell y Harford (1982) explicaría la causa de una rápida depuración plasmática de las asialoglicoproteínas y una mayor permanencia en circulación de las variantes moleculares con alto contenido en ácido siálico.

La heterogeneidad de la FSH no se limita solamente a la variación en el contenido de ácido siálico sino que, como ya se mencionara, la estructura interna de la cadena de carbohidratos también participa en la determinación del polimorfismo.

En cada grupo de análogos de carga de un determinado rango de pH, fue posible encontrar moléculas de gonadotrofina con diferentes estructuras en su cadena interna de carbohidratos. Para determinar estas características se utilizó la cromatografía en lectinas, la cual permite separar variantes moleculares que no pueden ser discriminadas en el aislamiento por punto isoelectrico.

La Concanavalina A separa tres grupos de isoformas: las no retenidas, con cadenas

de oligosacáridos complejos, triantenarias y bisectadas, las débilmente retenidas, con cadenas de carbohidratos complejos, biantenarias y truncadas, y las fuertemente retenidas por la lectina, las cuales poseen cadenas de carbohidratos incompletas, de tipo híbrido y alto contenido en manosa. Las isoformas que poseen cadenas carbohidratadas complejas han completado el procesamiento de sus oligosacáridos en las cisternas cis, media y trans del aparato de Golgi; mientras que las isoformas de FSH con cadenas de oligosacáridos más incompletas, no han finalizado la incorporación de residuos de azúcar durante su biosíntesis.

Cuando se analizó la estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico terminal en los distintos grupos de análogos de carga se observó que aquellos análogos con mayor contenido de ácido siálico (grupos IV y V) poseían predominantemente estructuras de oligosacáridos de tipo complejo (Tabla 8; isoformas NR + DR). El alto contenido en siálico en este tipo de estructura de oligosacáridos no es sorprendente, ya que estas estructuras de cadenas carbohidratadas contienen numerosos residuos de galactosa terminal los cuales posibilitan la incorporación del ácido siálico a la cadena (Komfeld y Komfeld, 1985).

Por el contrario, en aquellos análogos cuyos puntos isoeléctricos fueron más altos (grupos I y II) predominaron las isoformas con cadenas de oligosacáridos incompletas. En estas isoformas, el contenido de ácido siálico terminal es menor ya que la ausencia de galactosa en estas cadenas no hace posible la incorporación de este azúcar.

Las isoformas con cadenas de oligosacáridos incompletas pueden contener dos tipos de estructuras (ver esquemas págs. 51-52, fracción FR de Con-A): las que han interrumpido la incorporación de azúcares en la primera cisterna del aparato de Golgi (alto contenido en manosa) y aquellas que han incorporado un número variable de residuos NAcGlc en la cisterna media (híbridos). Para determinar en qué proporción se encontraban cada una de ellas se utilizó una cromatografía de afinidad en Aglutinina de Germen de Trigo, la cual une con alta afinidad los residuos NAcGlc expuestos presentes en las cadenas de carbohidratos.

El análisis de los grupos II, III, IV y V en Aglutinina de Germen de Trigo mostró en todos los casos que la mayor proporción de estas isoformas con cadenas incompletas correspondía a aquellas que poseían al menos un residuo de NAcGlc (Figura 17), pues entre el 80 y 90% de la FSH analizada se unió fuertemente a la lectina.

En consecuencia, se puede concluir que la hipófisis almacena muy pequeña

proporción de isoformas con cadenas incompletas que han interrumpido el procesamiento de sus oligosacáridos en la primera cisterna del Golgi. La mayor proporción de estas isoformas con cadenas incompletas de tipo híbrido, han incorporado al menos un residuo NAcGlc por acción de la N-acetilglucosaminil transferasa I, que está localizada en el compartimiento medio del aparato de Golgi.

Como se mencionó anteriormente, la relación que existe entre la estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico terminal y la potencia biológica *in vitro* de las isoformas no había sido estudiada previamente. Tampoco se conocía si las variaciones en la actividad biológica de las distintas isoformas se debían exclusivamente a las diferencias en el contenido de ácido siálico o si la estructura interna de la cadena carbohidratada estaba también involucrada en la regulación de la biopotencia.

En el presente estudio se demuestra que los análogos de carga con cadenas de carbohidratos muy ramificadas (isoformas NR en Con-A, triantenarias y bisectadas) no cambian significativamente su bioactividad al modificarse el contenido de ácido siálico en sus cadenas (B/I: 1.5-2.3 vs pl: 4.0-6.2). Por el contrario, la biopotencia de los análogos de carga con cadenas carbohidratadas que fueron débil y fuertemente retenidas en Con-A (biantenarias, truncadas, híbridos y alto contenido en manosa) se modifica marcadamente al aumentar el contenido de ácido siálico (B/I: 1.1-5.3). Tanto las isoformas DR como FR mostraron una clara tendencia a aumentar su biopotencia a medida que disminuye el contenido de ácido siálico en las mismas.

La mayor bioactividad en todos los grupos de análogos de carga analizados estuvo siempre asociada a isoformas con estructura de oligosacáridos biantenarias y truncadas.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio se puede postular que las isoformas con cadenas de carbohidratos altamente ramificadas ejercen una acción biológica asociada esencialmente a una estructura molecular específica de sus oligosacáridos. Las variaciones en el contenido de ácido siálico en estas isoformas sólo regularían el tiempo de permanencia de las mismas en circulación.

Otros tipos de isoformas, en particular las que poseen cadenas biantenarias y truncadas, pueden llegar a ser altamente bioactivas si disminuyen su contenido en ácido siálico. Aunque la proporción de estas isoformas almacenada en la hipófisis humana es pequeña, estas variantes moleculares podrían estar relacionadas con eventos fisiológicos dinámicos en el órgano blanco.

La utilización de la cromatografía de afinidad en Lectina de Lenteja permitió aislar isoformas de FSH conteniendo residuos fucosa en sus oligosacáridos. En los distintos grupos de análogos de carga, la proporción de isoformas fucosiladas fue distinta y no guardó ninguna relación con el contenido de ácido siálico presente en las mismas (Figuras 18 y 19).

Cuando se determinó la bioactividad de las isoformas DR y FR en Concanavalina A que contenían un residuo fucosa en sus cadenas, no se observaron cambios en la actividad biológica de estas isoformas que pudieran asociarse a la ausencia o presencia de este azúcar, ni modificaciones en la relación entre el B/I y los puntos isoeléctricos que fue hallada previamente a la separación en lectina de lenteja. En consecuencia, la presencia del residuo fucosa en las cadenas carbohidratadas de la FSH no sería un factor determinante de la biopotencia de la hormona. A pesar de ello, como se mencionó anteriormente, la mayor bioactividad encontrada en los extractos hipofisarios estuvo asociada a isoformas biantenarias y truncadas con bajo contenido de ácido siálico en las cuales estaba presente el residuo fucosa.

No existen datos en la literatura que relacionen el contenido de residuos fucosa en las cadenas carbohidratadas de la FSH y la biopotencia de la misma. Sin embargo, se han descripto situaciones fisiológicas y patológicas en las cuales los cambios en el entorno hormonal se acompañan de variaciones del contenido de fucosa en otras hormonas glicoproteicas. El contenido de fucosa de la subunidad alfa libre de la hCG aumenta significativamente a lo largo del embarazo normal, aunque se desconoce el posible significado fisiológico de estos cambios (Skarulis y col., 1992). También se ha descripto que el factor liberador de tirotrófina (TRH) produce en sujetos normales, un aumento de la proporción de isoformas de TSH circulantes fucosiladas. Sin embargo, este efecto parecería estar condicionado a niveles séricos normales de hormonas tiroideas pues en pacientes con hipotiroidismo subclínico no se observa ningún cambio en el contenido de fucosa de la TSH secretada luego del estímulo con TRH (Schaaf y col., 1995).

Hasta el presente el polimorfismo de la FSH había sido asociado principalmente a las diferencias en el contenido de ácido siálico de la hormona. A su vez, se postulaba que las variaciones en este contenido eran las que regulaban su biopotencia *in vivo* e *in vitro*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican claramente que la bioactividad *in vitro* de la FSH no depende exclusivamente del contenido de ácido siálico de

la hormona sino que la estructura interna de la cadena carbohidratada también confiere características biológicas particulares.

La influencia de los cambios en el entorno hormonal sobre el polimorfismo de la FSH circulante en la mujer fue determinada en dos condiciones fisiológicas diferentes: en el momento del ciclo menstrual en el cual la FSH y los factores gonadales promueven el desarrollo del folículo hasta el estadio preovulatorio (fase folicular) y cuando la función ovárica ha cesado determinando la finalización del período fértil de la mujer (la postmenopausia).

En este estudio se determinó el perfil de distribución de las isoformas de FSH de acuerdo a la estructura de la cadena carbohidratada interna al residuo terminal de ácido siálico, analizándose la potencia biológica *in vitro* en los grupos de isoformas aisladas.

Los resultados obtenidos demostraron que el polimorfismo de la FSH circulante durante la fase folicular de ciclos menstruales espontáneos es diferente al observado en sueros de mujeres postmenopáusicas.

La FSH que circula durante la fase folicular de los ciclos menstruales espontáneos está constituida por isoformas que han completado la incorporación de residuos en todas las cisternas del aparato de Golgi: proporciones similares de isoformas con cadenas carbohidratadas de alto grado de ramificación (triantenarias y bisectadas) e isoformas con cadenas biantenarias y truncadas. No se detectaron en circulación las isoformas con cadenas de tipo híbrido o de alto contenido en manosa.

Por el contrario, en la postmenopausia están ausentes las isoformas de FSH con oligosacáridos de alto grado de ramificación; si bien, predominan las isoformas con cadenas biantenarias y truncadas, que han incorporado azúcares en todas las cisternas del aparato de Golgi, aparece en circulación una pequeña proporción de isoformas con cadenas de tipo híbrido o de alto contenido en manosa, que indicarían una modificación en la actividad relativa de las enzimas presentes en la cisterna media del aparato de Golgi como posible consecuencia del cambio en el entorno hormonal.

En base a evidencias obtenidas en modelos experimentales y en humanos, se ha propuesto que los esteroides gonadales regulan la actividad de las enzimas responsables del procesamiento de los oligosacáridos presentes en las hormonas glicoproteicas.

En hámster y ratas hembra, se ha observado que tanto la administración de estrógenos a animales ovariectomizados (Galle y col., 1983), como los cambios del entorno

hormonal característicos de los ciclos estrales normales (Ulloa-Aguirre y col., 1988) y del desarrollo sexual del animal (Chappel y col., 1983), se acompañan de un aumento en la proporción relativa de isoformas de FSH con menor contenido de ácido siálico en sus cadenas carbohidratadas.

En la mujer, se ha observado que existe una relación directa entre el nivel sérico de estrógenos y el contenido de ácido siálico de la FSH circulante. Padmanabhan y colaboradores (1988a) han demostrado que la administración de estrógenos a pacientes con disgenesia gonadal produce un aumento significativo de la proporción de FSH con puntos isoeléctricos 5.2-5.6 y una disminución concomitante de la hormona con puntos isoeléctricos entre 4.4 y 5.2.

Wide y Naessén (1994) también han observado cambios similares en mujeres postmenopáusicas a las cuales se les ha administrado una terapia de reemplazo con estrógenos. En estas mujeres, los estrógenos reestablecen las características de la FSH circulante en la fase folicular de ciclos menstruales normales, en las cuales las variantes glicosiladas poseen un contenido de ácido siálico menor al observado durante la postmenopausia (Wide, 1982).

De acuerdo a las evidencias obtenidas por Dharmesh y Baenziger (1993) en las cadenas carbohidratadas de la LH, los estrógenos ejercen un efecto modulador sobre las enzimas N-acetilgalactosaminil transferasa y sulfotransferasa encargadas de la incorporación de residuos NAcGal y sulfato.

Todos los estudios realizados hasta el momento sólo han descripto la regulación hormonal de las enzimas que participan en la incorporación de los azúcares terminales de las cadenas carbohidratadas de las hormonas glicoproteicas. La desaparición de isoformas con oligosacáridos altamente ramificados asociada con la disminución de la función ovárica que se caracteriza por niveles bajos de esteroides circulantes, sugiere que las enzimas responsables de la incorporación de azúcares en la estructura interna de la porción carbohidratada de las moléculas de FSH también está regulada por el entorno hormonal.

Schachter y colaboradores (1983; 1986; 1991) han descripto los factores que condicionan la formación de oligosacáridos complejos en la biosíntesis de glicoproteínas. Estudios realizados sobre las enzimas N-acetilglucosaminil transferasas involucradas en la síntesis de oligosacáridos con alto grado de ramificación permitieron definir los siguientes factores condicionantes:

a) diferencias en la actividad relativa de las enzimas, con la consiguiente competencia

entre dos o más de ellas por un sustrato común.

b) la incorporación de un azúcar específico al oligosacárido en formación que favorezca o impida la acción de enzimas involucradas en etapas posteriores en la biosíntesis de carbohidratos complejos.

c) la disponibilidad de sustratos y cofactores y la compartimentalización de las enzimas en las distintas cisternas.

El primer factor condicionante mencionado anteriormente ha sido demostrado experimentalmente por Allen y colaboradores (1984). En estos estudios se observó que las diferencias en la actividad relativa de las enzimas α -manosidasa II y N-acetilglucosaminil transferasa III condicionan la síntesis de oligosacáridos complejos o híbridos, respectivamente, a partir de un precursor común en la cisterna media del aparato de Golgi.

Estudios realizados en el oviducto de pollo han mostrado la mayor actividad de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III respecto de la α -manosidasa II en este tejido (Narasimhan y col., 1981a y b). Esta particular actividad relativa de ambas enzimas favorece la síntesis de glicoproteínas con cadenas de oligosacáridos incompletas de tipo híbrido, como por ejemplo, la ovoalbúmina (Tai y col., 1977). Al incorporarse un residuo bisectado por acción de la transferasa III a la cadena de oligosacáridos se impide la remoción de dos residuos manosas por la acción de la manosidasa (Harpaz y Schachter, 1980).

Por otro lado, Nelson y colaboradores (1975) han demostrado que la actividad de las N-acetilglucosaminiltransferasas y la galactosiltransferasa presentes en endometrio de ratas ovariectomizadas aumenta luego de la administración de estradiol. Este efecto estimulador no se observa en las mismas enzimas presentes en hígado.

Teniendo en cuenta las evidencias antes mencionadas, se podría postular que en la fase folicular confluyen en el gonadotropo los factores condicionantes para la biosíntesis de carbohidratos complejos. El entorno hormonal característico de esta fase del ciclo menstrual podría regular la actividad de las enzimas α -manosidasa II y las N-acetilglucosaminil transferasas IV y V, para favorecer la síntesis de isoformas con cadenas carbohidratadas complejas, particularmente las que poseen alto grado de ramificación.

Por el contrario, en la postmenopausia podría producirse una disminución de la actividad relativa de las enzimas N-acetilglucosaminil transferasas IV y V, y aumentaría la actividad de la N-acetilglucosaminil transferasa III en el compartimiento medio del aparato de Golgi. De esta forma se explicaría la desaparición de las isoformas de FSH con alto

grado de ramificación en sus oligosacáridos y la aparición de una pequeña proporción de isoformas de FSH con oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido de manosa. Una alta actividad de las N-acetilglucosaminil transferasas I y II aseguraría la síntesis de isoformas con estructuras carbohidratadas biantenarias y truncadas que constituyen la mayor proporción de FSH circulante en la postmenopausia.

Se podría postular que la pequeña proporción de isoformas de FSH con cadenas de carbohidratos de tipo híbrido en circulación en la postmenopausia no posee residuos galactosa terminales en los oligosacáridos, pues de esta forma la hormona sería rápidamente depurada. Es probable que estas isoformas de FSH no hayan incorporado galactosa y siálico a sus cadenas y permanezcan en circulación por poseer residuos NAcGlc expuestos. Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos por Thotakura y colaboradores (1994). Trabajos realizados con tirotrófina recombinante humana determinaron la función específica de cada uno de los componentes de las estructuras carbohidratadas presentes en esta hormona. Mediante la remoción y adición de los dos últimos azúcares presentes en las cadenas (galactosa y ácido siálico) se pudo demostrar que las variantes moleculares de tirotrófina que no poseen ninguno de estos dos residuos son depurados más lentamente que las que exponen los residuos galactosa.

La actividad biológica *in vitro* de la FSH presente en los sueros provenientes de las mujeres postmenopáusicas fue mayor que la biopotencia determinada en los sueros de las mujeres en fase folicular del ciclo menstrual. Estos resultados coinciden con los descriptos previamente por Padmanabhan y colaboradores (1987).

La determinación de la actividad biológica de la FSH luego de la separación de isoformas en cromatografía en Concanavalina A permitió explicar las diferencias encontradas en la bioactividad de los sueros enteros. La actividad biológica observada durante la fase folicular refleja la similar y baja biopotencia de los dos grupos de isoformas de FSH maduras circulantes en este momento del ciclo. La mayor bioactividad observada en los sueros de las mujeres postmenopáusicas sería debida a la contribución de las isoformas con cadenas de oligosacáridos incompletas que aunque se encontraron en circulación en pequeña proporción, poseen una actividad biológica *in vitro* muy alta.

Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado que durante el período reproductivo de la mujer, la FSH circulante está constituida por isoformas maduras,

en las cuales se ha completado el procesamiento de sus oligosacáridos. Estos hallazgos sugieren que durante la fase folicular factores de origen gonadal, esteroideos y/o peptídicos, estarían modulando en forma directa sobre la hipófisis o en forma indirecta a nivel del hipotálamo la actividad y abundancia relativa de las glicosiltransferasas del gonadotropo que favorecen la síntesis de isoformas con cadenas complejas y de alto grado de ramificación.

La presencia de proporciones similares de isoformas de FSH con oligosacáridos complejos, altamente ramificados y biantenarios/truncados, en circulación podría reflejar la necesidad de inducir respuestas biológicas diferenciales en situaciones fisiológicas específicas. Así, el crecimiento y desarrollo del folículo preovulatorio requeriría un estímulo hormonal sostenido y de baja intensidad, constituido por variantes moleculares triantenarias, bisectadas, biantenarias completas y truncadas.

Las diferencias encontradas en el polimorfismo de la FSH circulante en la postmenopausia y en fase folicular abren un interrogante sobre el efecto de los preparados comerciales de gonadotrofinas usados para distintas terapias de reemplazo o para inducción de ovulación, particularmente aquellos que utilizan orina de mujeres postmenopáusicas para su aislamiento y purificación (Human Menopausal Gonadotrophin, HMG). Elevadas dosis de HMG administradas en pacientes incluidos en protocolos de inducción de ovulación y fertilización *in vitro* han sido asociadas con bajo número de embarazos exitosos (Stadmauer y col., 1994). También la ovulación múltiple ha sido una complicación casi constante de la inducción de ovulación con preparados comerciales de gonadotrofinas. Si bien no se ha demostrado cual es la razón de todos estos efectos no deseados, la marcada diferencia en el polimorfismo de los preparados comerciales conteniendo FSH proveniente de orina de postmenopáusica respecto del que fisiológicamente es sintetizado durante la fase folicular de un ciclo menstrual normal, podría ser uno de los factores que contribuiría a la obtención de respuestas muy variables y no satisfactorias en las pacientes que reciben estas terapias sustitutivas.

Considerando los cambios que se producen en el polimorfismo de la FSH circulante durante el ciclo menstrual normal, una terapia de inducción de ovulación que imite las condiciones fisiológicas requeriría disponer, en primer lugar, de preparados que no sean obtenidos a partir de orina de postmenopáusicas; y en segundo lugar, la gonadotrofina debería contener isoformas con estructuras de oligosacáridos semejantes a las encontradas *in vivo*.

Para lograr estas condiciones debería ser posible disponer de preparados comerciales de FSH conteniendo isoformas con determinada estructura interna en sus cadenas de carbohidratos para utilizarlos en forma selectiva con el objeto de inducir respuestas de la gonada específicas que contribuirían a mejorar el resultado final del tratamiento administrado.

El objetivo de la tercera parte de este trabajo fue establecer las características moleculares y biológicas de la FSH circulante en distintos estadios del desarrollo puberal del varón y determinar los posibles cambios producidos en el polimorfismo de la hormona luego de la administración de GnRH. Este estudio se realizó en tres momentos del desarrollo sexual: pubertad temprana, media y avanzada.

Cuando se inició este estudio se observó que la determinación de actividad biológica de FSH en suero entero de los niños seleccionados no arrojaban resultados consistentes, particularmente en los niños de menor edad.

En consecuencia, el estudio de las características moleculares de la FSH se inició con un isoelectroenfoque preparativo. Esta metodología permitió procesar un volumen considerable de suero, concentrar los bajos niveles de gonadotrofina circulantes, especialmente en la pubertad temprana y aislar los análogos de carga de acuerdo a su punto isoeléctrico. La potencia biológica *in vitro* fue determinada posteriormente sobre un concentrado de todos los análogos de carga combinados con el objeto de lograr una adecuada estimulación de la actividad aromatasa en las células de Sertoli en cultivo.

Por último, a partir de la preparación combinada de análogos de carga se analizó la distribución de las variantes moleculares de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas carbohidratadas utilizando cromatografía en Concanavalina A.

Si bien no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles inmunológicos de la FSH sérica en la pubertad temprana, media y avanzada, las variaciones en el polimorfismo durante el desarrollo puberal fueron las siguientes:

- cambios en el grado de heterogeneidad y en el rango de puntos isoeléctricos de la hormona (PT: 3.0-5.0; PM: 3.5-5.5; PA: 3.4-4.4)
- cambios en su biopotencia *in vitro*
- cambios en las proporciones de las variantes moleculares circulantes aisladas de acuerdo a la estructura interna de las cadenas carbohidratadas.

La FSH circulante en la pubertad temprana se caracterizó por poseer alto contenido de ácido siálico ya que el 66% de la hormona enfocó a un pH menor de 4.0.

La relación inversa entre el contenido de ácido siálico de la FSH y la biopotencia *in vitro* descrita en la literatura por varios autores y observada en este mismo estudio durante la caracterización de extractos hipofisarios humanos, también fue observada en la pubertad temprana pues esta hormona altamente sialilada, presentó baja bioactividad.

En consecuencia las características más sobresalientes de la FSH circulante en la pubertad temprana serían una prolongada permanencia en circulación, determinada por la importante proporción de isoformas acídicas que la componen, y una baja biopotencia.

En cuanto a la distribución de las variantes moleculares de acuerdo a la estructura interna de las cadenas carbohidratadas se observó un perfil de distribución caracterizado por el predominio de isoformas con cadenas biantenarias y truncadas, y con cadenas incompletas, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa. La menor proporción correspondió a isoformas con oligosacáridos altamente ramificados.

Durante este estadio del desarrollo puberal el aumento del volumen testicular precede a la aparición de los caracteres sexuales secundarios. Este aumento se produce como consecuencia de haberse completado las dos etapas iniciales de la espermatogénesis: el incremento de la población de espermatogonias y la aparición de los primeros espermatoцитos meióticos. Las características moleculares y biológicas de la FSH descritas anteriormente podrían contribuir a la inducción de estos cambios observados en el testículo.

Sin embargo, los cambios en la gonada no se limitan al compartimiento tubular sino que también incluyen al intersticio donde la reactivación de los precursores de células de Leydig produce una elevación significativa de la concentración intratesticular de testosterona. Algunos autores sostienen que la reactivación del intersticio es también uno de los factores desencadenantes del inicio de la maduración del epitelio seminífero (Chemes y col., 1985). Este aumento del nivel de andrógenos intratesticular no se refleja a nivel periférico ya que los niveles circulantes se mantienen por debajo de los 70 ng/dl. Este entorno hormonal y un hipotálamo que ha reiniciado su actividad secretoria, determinaría de esta manera el polimorfismo de FSH antes descrito.

En la pubertad media la FSH circulante presentó características diferentes a las observadas en la pubertad temprana. En este estadio del desarrollo puberal se observó un marcado cambio en el contenido de ácido siálico de la hormona circulante evidenciado por

un pronunciado desplazamiento del rango de puntos isoeléctricos de la hormona hacia valores más altos. Aparecieron en circulación nuevas isoformas (pI: 5.0-5.5), que no se observaron en la pubertad temprana, y al mismo tiempo desaparecieron las isoformas aisladas en el extremo inferior del rango de pH utilizado (pI: 3.0-3.5), que estaban presentes en el estadio del desarrollo puberal previo.

La relación inversa que existe entre el contenido de ácido siálico y la biopotencia también está presente en este estadio del desarrollo puberal pues la disminución en el contenido de ácido siálico de las isoformas de FSH circulante se acompañó con un importante aumento de la bioactividad de la hormona *in vitro*.

También se modificó en el perfil de variantes moleculares aisladas de acuerdo a la estructura interna de sus oligosacáridos. Este estadio del desarrollo puberal se caracterizó por el predominio de isoformas de FSH circulantes con cadenas carbohidratadas incompletas, de tipo híbrido y alto contenido en manosa, con una concomitante disminución de las isoformas con cadenas biantenarias y truncadas, respecto de las que circulaban en la pubertad temprana. La proporción de isoformas con alto grado de ramificación fue mayor que la observada en el estadio puberal descripto anteriormente.

El predominio de isoformas con cadenas carbohidratadas incompletas, que no permiten la incorporación de ácido siálico terminal explicaría el cambio del punto isoeléctrico de la hormona, acompañado por una alta bioactividad *in vitro*.

Durante la pubertad media el entorno hormonal cambia notablemente pues los niveles de testosterona alcanzan valores similares a los observados en el adulto. Este aumento en los niveles de andrógenos circulantes coincide con un nuevo incremento del volumen testicular. En este momento del desarrollo puberal se desencadena la primera división meiótica, indicando que se han producido importantes cambios madurativos en la célula de Sertoli. Las células de Sertoli se diferencian adquiriendo una organización celular compleja, con un desarrollo citoplasmático elaborado y la formación de uniones intercelulares especializadas que darán lugar posteriormente a la denominada barrera hematotesticular (Gondos y Kogan, 1990).

La FSH necesaria para inducir estos cambios madurativos en el epitelio seminífero durante la pubertad media requeriría las características cualitativas particulares descriptas: alta bioactividad y corta permanencia en circulación.

Estas características de la gonadotrofina circulante en la pubertad media no se mantuvieron durante la pubertad avanzada. La hormona volvió a adquirir algunas de las

características observadas en la pubertad temprana, particularmente aquellas relacionadas con el contenido de ácido siálico. Se observó la aparición de variantes moleculares en los intervalos de puntos isoelectricos más bajos: 3.0-3.5, desapareciendo simultáneamente aquellas variantes más básicas con puntos isoelectricos 4.5-5.5 observadas únicamente en la pubertad media. La proporción de análogos de carga con alto contenido de ácido siálico (pI: 3.0 y 4.0) fue la más alta observada en todos los estadios del desarrollo puberal estudiados: 81%. También se observó una disminución del grado de heterogeneidad reflejado en un intervalo de pH menor en el cual se aisló la hormona (PA: 3.0-4.5 vs PT: 3.0-5.0 y PM: 3.5-5.5).

Como era de esperar, el aumento del contenido de ácido siálico de la hormona se acompañó con una disminución de la bioactividad *in vitro*.

El perfil de distribución de variantes moleculares de acuerdo a la estructura interna de los oligosacáridos, se caracterizó por el evidente predominio de isoformas biantenarias y truncadas, acompañadas de la más alta proporción de isoformas con cadenas de alto grado de ramificación observada en todos los estadios del desarrollo puberal estudiados.

Es interesante señalar que, a diferencia de los resultados descriptos previamente en suero de mujeres, en todos los estadios puberales del varón se detectan en circulación los tres grupos de isoformas que permite aislar la cromatografía en Concanavalina A.

Durante el desarrollo puberal masculino se observaron cambios en el contenido de ácido siálico de la FSH circulante: cuando se completó la pubertad la hormona presentó un contenido de ácido siálico mayor que el que poseía en las primeras etapas de la maduración sexual. Estos resultados sugerirían que existen variaciones en la actividad de la sialiltransferasa hipofisaria asociadas con cambios en el entorno hormonal, y coincidirían con evidencias previas existentes en la literatura que muestran un posible efecto estimulador de los andrógenos sobre la actividad de la sialiltransferasa del gonadotropo. Kennedy y Chappel (1985) han demostrado que la testosterona aumenta la secreción de isoformas ácidas en cultivos de células hipofisarias provenientes de ratas inmaduras. Este posible efecto estimulador de la testosterona sobre la actividad de la sialiltransferasa también puede explicar los resultados obtenidos por Ulloa-Aguirre y colaboradores (1986) quienes describen un marcado aumento en el contenido de isoformas ácidas de FSH en la hipófisis de ratas macho a través del desarrollo sexual.

En la pubertad media se observó la desaparición transitoria de isoformas de FSH circulantes con alto contenido de ácido siálico. Estos resultados podrían explicarse

teniendo en cuenta que la actividad relativa de las enzimas glicosilantes que participan en etapas previas de la biosíntesis de los oligosacáridos en este momento del desarrollo puberal, favorece la formación de isoformas con cadenas de tipo híbrido y con alto contenido en manosa en las cuales hay muy pocos residuos galactosa capaces de incorporar siálico. Por esta razón, la actividad de la enzima no podría manifestarse. Otra causa que explicaría los resultados obtenidos sería que, en la pubertad media exclusivamente, el GnRH ejerciera un efecto regulatorio dominante sobre el polimorfismo de la FSH y a través de una mayor amplitud y frecuencia de pulsos pudiera controlar dos procesos simultáneamente: la inhibición de la actividad de la sialiltransferasa y la estimulación de las enzimas glicosilantes (específicamente, la N-acetilglucosaminil transferasa III) que favorecerían la síntesis de isoformas con oligosacáridos de tipo híbrido y bajo contenido de ácido siálico.

El posible efecto estimulador de los andrógenos sobre la actividad de la sialiltransferasa, se pondría en evidencia en la pubertad avanzada. En este estadio del desarrollo puberal el aumento del contenido de ácido siálico de la hormona circulante sería consecuencia de la síntesis de una alta proporción de isoformas cuya estructura carbohidratada interna permite la incorporación de ácido siálico a las mismas.

No existen evidencias directas en la literatura que demuestren la regulación hormonal de la actividad de las diferentes glicosiltransferasas involucradas en la síntesis de glicoproteínas.

La enzima que ha sido más estudiada y caracterizada es la sialiltransferasa hepática. La clonación y la organización del gen de la enzima fue realizada por Wen y colaboradores (1992) y Svensson y colaboradores (1990). En estos estudios se ha sugerido que las diferencias en la actividad de esta enzima observada en distintos tejidos estudiados podrían deberse a la existencia de mecanismos regulatorios de la expresión génica, específicos para cada tejido.

También se ha obtenido evidencia experimental sobre la regulación de la actividad y de la expresión del gen de la sialiltransferasa por glucocorticoides y esteroides gonadales. Utilizando una línea celular hepática (H35) en cultivo, Wang y colaboradores (1989) han descrito que la dexametasona induce la síntesis de RNA mensajero de la enzima en forma dosis dependiente. En tejido mamario de rata se ha descrito que un aumento de la actividad de la enzima en esta glándula acompaña el desarrollo de la misma inducida por la administración diaria de estradiol y progesterona (Ip, 1980)

En todos los estadios del desarrollo puberal estudiados, la relación entre el contenido de ácido siálico y la biopotencia *in vitro* de la FSH circulante fue inversa. En consecuencia, la disminución en el contenido de ácido siálico de la hormona durante la pubertad media se acompañó por un marcado incremento de la actividad biológica.

Estudios previos realizados sobre las características de las gonadotrofinas a través del desarrollo puberal en el varón describieron cambios de la bioactividad de LH que se produjeron concomitantemente con el aumento de los niveles inmunológicos de esta hormona. Ambos parámetros se correlacionaron en forma estadísticamente significativa ($r=0.737$, $p<0.001$) (Kletter y col., 1993). Sin embargo, no se observó una correlación semejante para la FSH utilizando un bioensayo basado en la estimulación de la actividad aromatasa de células de Sertoli en cultivo; la bioactividad de FSH fue determinada directamente en una pequeña alícuota de suero. Es posible que debido a los niveles bajos de FSH circulantes, particularmente al comienzo de la pubertad, la sensibilidad de estos métodos directos no haya sido suficiente para detectar cambios en la bioactividad de esta gonadotrofina en los diferentes estadios puberales estudiados. Estos autores concluyen que esta concentración constante de FSH bioactiva es la condición necesaria para el adecuado desarrollo de la gónada y el mantenimiento de la espermatogénesis.

Beitins y colaboradores (1990) han estudiado las características de la FSH circulante durante la pubertad en niñas y varones. Estos autores observaron que los niveles de FSH biológica circulante durante el desarrollo sexual en ambos sexos tenía un perfil similar. Dado el dimorfismo sexual que existe en los niveles absolutos de FSH inmunológica circulante, los cuales son más altos en las niñas que en los varones, este estudio concluye que la relación B/I de la FSH es significativamente más alta en los varones que en las niñas.

Diferencias en las características de carga de la FSH sérica (contenido en ácido siálico) durante el desarrollo puberal de niñas y varones fueron descritas por Phillips y colaboradores (1997). Estos autores encuentran una diferencia de carga entre la FSH que circula en las niñas y la de los varones. La FSH circulante en los varones, a través de todos los estadios del desarrollo puberal, tendría un mayor contenido de ácido siálico que la observada en las niñas. Particularmente en los varones, estos autores encuentran que la FSH circulante en la prepubertad tiene un contenido de ácido siálico menor que la circulante en los últimos estadios del desarrollo puberal.

En el presente estudio, utilizando condiciones metodológicas muy diferentes, que permitieron concentrar las bajas cantidades de FSH presentes en suero antes de determinar su biopotencia, se observaron cambios en la bioactividad de la FSH circulante durante los distintos estadios de la pubertad. Además de los cambios en la biopotencia en la pubertad temprana, media y avanzada, a través del desarrollo puberal se observaron cambios en el perfil de distribución de las isoformas de FSH con diferente estructura de sus cadenas carbohidratadas.

Si se analizan en conjunto los cambios observados en el polimorfismo de la FSH durante los tres estadios del desarrollo puberal estudiados cuando las isoformas son aisladas de acuerdo a la estructura interna de sus cadenas de oligosacáridos, se puede observar que en este proceso se produce un paulatino aumento de la proporción de isoformas de FSH circulantes con oligosacáridos complejos, con alto grado de ramificación.

Los cambios que se producen en las proporciones de isoformas de FSH circulantes durante el desarrollo puberal serían la consecuencia de modificaciones en la actividad relativa de las glicosiltransferasas involucradas en el procesamiento de los oligosacáridos unidos al polipéptido.

El aumento progresivo de la proporción de isoformas circulantes con cadenas de carbohidratos con alto grado de ramificación durante el desarrollo puberal sugeriría que se producen cambios en la actividad relativa de las enzimas N-acetilglucosaminil transferasas IV y V, y de la α -manosidasa II, las cuales son responsables de la síntesis de oligosacáridos de alto grado de ramificación.

Cabe señalar que utilizando como modelo experimental la rata macho inmadura, también se ha observado un aumento progresivo de la proporción de isoformas de FSH hipofisaria con cadenas de carbohidratos con alto grado de ramificación durante la maduración sexual del animal (Rulli y col., 1997).

En este mismo modelo experimental se estudió el efecto de los andrógenos sobre el polimorfismo de la FSH hipofisaria mediante la castración y el posterior reemplazo con andrógenos. Los resultados obtenidos mostraron que la ausencia de gonada inducía una disminución de la proporción de isoformas de FSH con oligosacáridos de tipo complejo y alto grado de ramificación presentes en la hipófisis, reestableciéndose el perfil de distribución observado en el animal intacto luego de la administración de un andrógeno 5 α -reducido (Rulli y col., 1999).

Estos resultados sugieren que los andrógenos estarían involucrados en la regulación de la actividad relativa de las enzimas N-acetilglucosaminil transferasas IV y V, y de la α -manosidasa II, presentes en la cisterna media del aparato de Golgi.

Una alta proporción de isoformas de FSH con estructuras de oligosacáridos ramificados parecería circular en condiciones fisiológicas en las cuales las gonadas han alcanzado su máximo grado de maduración y diferenciación (pubertad avanzada en el varón). Sin embargo, no solamente los andrógenos estarían involucrados en esta regulación sino también los esteroides ováricos ya que los resultados obtenidos en la caracterización de la FSH sérica durante la fase folicular de ciclos menstruales espontáneos mostraron que este tipo de isoformas se encuentran en circulación cuando la función de la gonada es normal, y desaparecen de circulación cuando la mujer ha finalizado su período fértil.

El predominio de isoformas de FSH circulantes con cadenas de carbohidratos incompletas características de la pubertad media sugiere una fina y temporal regulación de la actividad relativa de las enzimas glicosilantes que favorecen la síntesis de este tipo de oligosacáridos. Si bien la síntesis de isoformas de FSH con cadenas de oligosacáridos de alto grado de ramificación estaría favorecida por los andrógenos, los cuales incrementan sus niveles circulantes significativamente en este período del desarrollo puberal, un estímulo más potente estaría determinando el predominio de isoformas de FSH circulantes con cadenas de carbohidratos incompletas. De esta forma, factores regulatorios desconocidos hasta el momento determinarían una mayor actividad de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III respecto de la actividad de la enzima α -manosidasa II.

En la rata macho inmadura se ha observado que la capacidad de los andrógenos para favorecer la síntesis de isoformas complejas de alto grado de ramificación se ejerce en presencia y en ausencia de un antagonista de GnRH, indicando que el factor liberador no estaría involucrado en este mecanismo regulatorio (Zitta y col., 1998). Podría postularse entonces que un determinado perfil de secreción de GnRH, característico de la pubertad media, podría estar condicionando el incremento de la actividad de la enzima N-acetilglucosaminil transferasa III, resultando en una alta proporción de isoformas de FSH con oligosacáridos incompletos enviados a circulación.

No se han descrito en la literatura cambios en la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de oligosacáridos de tipo híbrido, inducidos por el entorno hormonal. Un incremento de la actividad de la N-acetilglucosaminil transferasa III ha sido

relacionado con alteraciones funcionales del tejido hepático de rata y humano, que preceden o acompañan al desarrollo de un tumor (Narasimhan y col., 1988; Yamashita y col., 1983).

El desarrollo puberal masculino es un proceso complejo regulado por múltiples factores, entre ellos la FSH. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la hormona trófica del epitelio seminífero modifica su heterogeneidad a lo largo de este proceso fisiológico. Cada etapa de la maduración del epitelio germinal requeriría un mensaje hormonal específico; particularmente durante la pubertad media cuando la FSH circulante aumenta su bioactividad y presenta características moleculares específicas para este estadio.

A su vez, el mantenimiento de una espermatogénesis completa estaría regulado por una FSH menos heterogénea, de larga permanencia en circulación y baja bioactividad que en su mayor proporción posee oligosacáridos que han completado su procesamiento en el aparato de Golgi.

Es interesante señalar que el polimorfismo de la FSH observado en la pubertad avanzada se mantiene sin cambios en la edad adulta (Fernández Vera y col., 1997), y posiblemente constituya un factor de regulación importante para mantener un adecuado funcionamiento de las células de Sertoli que determinen una espermatogénesis normal.

A las interacciones clásicamente descritas entre los diferentes componentes del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal debe agregarse un nuevo componente: el polimorfismo hormonal, a través del cual el gonadotropo recibe el mensaje que indica el tipo de gonadotrofina que debe sintetizar en un momento determinado para inducir en la gonada un fenómeno biológico específico. Esta relación entre calidad de gonadotrofina e inducción de una determinada acción biológica es particularmente importante durante el proceso de inducción y diferenciación de la gonada masculina.

Teniendo en cuenta los cambios que se producen sobre el polimorfismo de la FSH circulante cuando se modifica el entorno hormonal, el objetivo de la última parte de este estudio fue determinar si el principal estímulo de la síntesis y liberación de las gonadotrofinas, el GnRH, modifica las características moleculares y biológicas de la FSH secretada.

Este posible efecto del GnRH sobre el polimorfismo de la FSH se estudió luego de

administrar una dosis única de factor liberador a niños normales en pubertad temprana media y avanzada.

El estímulo agudo con GnRH produjo cambios en el polimorfismo de la FSH respecto del que había sido observado en condiciones basales. En todos los estadios del desarrollo puberal, la administración de 25 o 50 µg del factor liberador, fue capaz de producir la liberación a circulación de variantes moleculares con menor contenido de ácido siálico. Este efecto fue independiente del entorno hormonal existente en el momento del estímulo.

La relación observada entre la administración de GnRH y los cambios en el punto isoeléctrico de la hormona liberada, los cuales evidencian modificaciones en el contenido de ácido siálico de la misma, ya habían sido descritos en la literatura. Tanto en modelos experimentales como en humanos en condiciones fisiológicas y patológicas, el estímulo con GnRH produce la liberación de variantes glicosiladas de FSH más básicas, es decir, con un menor contenido de ácido siálico.

Padmanabhan y colaboradores (1992) realizaron experimentos en los que se induce la pubertad en ovejas mediante la administración de GnRH. En este estudio, el estímulo del factor liberador provocó la liberación a la circulación de FSH con menor contenido de ácido siálico. Sin embargo en este modelo experimental, a nivel hipofisario no se encontró ningún cambio del polimorfismo de FSH. Estos resultados sugerirían que el GnRH facilita la secreción de isoformas más básicas de FSH que ya se encontraban almacenadas en la hipófisis.

Por el contrario, Ulloa-Aguirre y colaboradores (1992b) en un cultivo de células de la hipófisis anterior de rata tratadas con GnRH, observaron que tanto la FSH secretada al medio como la hormona presente en las células disminuía su contenido de ácido siálico después de la estimulación. Miller y colaboradores (1983) obtuvieron resultados similares utilizando tejido hipofisario de hámster.

Estos últimos resultados sugieren que el GnRH no sólo facilitaría la secreción de variantes moleculares más básicas de FSH, sino que también estaría modificando el procesamiento post-traducciona l de los oligosacáridos presentes en esta gonadotrofina.

Phillips y Wide (1994) observaron que la administración de factor liberador a niñas y varones durante el desarrollo puberal provoca la aparición de isoformas de FSH en circulación con menor contenido de ácido siálico después de 30 minutos de haber sido administrada una dosis única de GnRH. Resultados similares han sido obtenidos en el ciclo

menstrual por Zambrano y colaboradores (1995) y en pacientes con síndrome de Turner por Wide y Albertsson-Wikland(1990).

En el presente estudio el efecto de la administración de GnRH sobre la aparición de variantes glicosiladas de FSH con menor contenido de ácido siálico en sus cadenas de carbohidratos fue observada en todos los estadios de la pubertad estudiados.

Teniendo en cuenta resultados previos y las evidencias obtenidas en el presente estudio, se podría postular que el efecto específico del GnRH sobre el polimorfismo de FSH es independiente de los niveles de esteroides gonadales y se ejercería a dos niveles: uno a nivel de la secreción, facilitando la liberación de variantes glicosiladas con un menor contenido de ácido siálico, y otro a nivel post-traducciona en el momento del procesamiento de los oligosacáridos unidos al polipéptido, inhibiendo la incorporación del último residuo a la cadena carbohidratada.

Cuando se evaluó la actividad biológica de la FSH luego de la administración de GnRH, determinada en un concentrado de todos los análogos de carga combinados, no se observaron cambios en los distintos momentos del desarrollo puberal estudiados, de la relación B/I respecto de la determinada en condiciones basales. Es decir, que la aparición de isoformas con mayor punto isoelectrico y menor contenido de ácido siálico no logró producir un aumento en la relación B/I de la hormona total.

Estos resultados podrían explicarse al analizar la proporción de la hormona total que permaneció en el mismo rango de puntos isoelectricos en condiciones basales y luego del estímulo con GnRH, se observó que en todos los estadios estudiados más del 50% de la hormona total no presentaba cambios en el contenido de ácido siálico. De esta manera, como la determinación de la bioactividad se realizó sobre la totalidad de los análogos de carga de FSH combinados, y no sobre los grupos de análogos de carga en forma separada, la posible modificación de la bioactividad post-GnRH no pudo ponerse en evidencia.

Padmanabhan y colaboradores (1988b) administraron una dosis muy baja de GnRH en múltiples inyecciones a niños con hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático. En este estudio la relación B/I de la FSH sérica fue determinada a los 20, 40 y 60 minutos después de la administración del estímulo. La bioactividad de FSH aumentó significativamente a los 20 y 40 minutos después del estímulo en todos los pacientes estudiados. A los 60 minutos de suministrado el factor liberador, la bioactividad descendió a los valores observados en

condiciones basales. Los autores postulan que esta disminución de la relación B/I podría deberse a la desaparición de circulación de variantes glicosiladas más básicas, de alta bioactividad, liberadas por el GnRH.

En el presente estudio, la determinación del polimorfismo de FSH se realizó a los 60 minutos de suministrado el factor liberador. Este tiempo fue elegido pues es en este momento cuando se alcanzan los niveles máximos de FSH inmunológica circulantes. La ausencia de cambios en la relación B/I de la FSH liberada luego del estímulo pudo deberse también a que a los 60 minutos habían sido eliminadas de circulación las isoformas más básicas y bioactivas, especialmente aquellas con residuos galactosa expuestos, cuya secreción estaría favorecida por el GnRH.

El efecto del GnRH sobre la distribución de las variantes moleculares según la estructura interna de las cadenas carbohidratadas al ácido siálico terminal, no fue el mismo en los diferentes estadios del desarrollo puberal estudiados. Se observó una modificación de esta distribución después de la administración de GnRH solamente en la pubertad temprana. Este cambio consistió en un importante aumento de la proporción de isoformas de FSH con cadenas de carbohidratos muy ramificadas (proporción similar a la observada en la pubertad avanzada) con una concomitante disminución de la proporción de isoformas con cadenas biantenarias y truncadas respecto de las que circulaban en condiciones basales. El factor liberador, en presencia de niveles de testosterona prepuberales, facilitaría la síntesis de isoformas con alto grado de ramificación, modulando la actividad de las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasas IV y V.

Sin embargo, el factor liberador no fue capaz de alterar el perfil de distribución de isoformas aisladas de acuerdo a la estructura interna de las cadenas carbohidratadas en la pubertad media y en la pubertad avanzada.

En resumen, el efecto más importante del GnRH sobre el polimorfismo de FSH estaría dirigido a determinar el tiempo que la hormona permanecería en circulación (vida media-contenido de ácido siálico). Este efecto se manifestaría facilitando la secreción de hormona de corta vida media y sería ejercido independientemente de la concentración de andrógenos circulantes.

Un efecto modulador del GnRH sobre las etapas más tempranas del procesamiento de los oligosacáridos unidos al polipéptido estaría condicionado a la presencia de niveles bajos de andrógenos circulantes (pubertad temprana).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que:

- 1- la mayor proporción de FSH almacenada en la hipófisis presenta alto contenido de ácido siálico y baja bioactividad.
- 2- el estímulo que recibe la célula blanco puede tener distinta intensidad de acuerdo a la estructura de cadena carbohidratada de la FSH a la cual se agregue el último azúcar. La ausencia de ácido siálico confiere mayor biopotencia a las isoformas con cadenas de carbohidratos de tipo complejo, biantenarias y truncadas, y particularmente aquellas de tipo híbrido, las cuales al variar su contenido en ácido siálico modifican marcadamente, no sólo su tiempo de permanencia en circulación, sino también su biopotencia.
- 3- las isoformas de FSH que poseen cadenas de alto grado de ramificación, triantenarias y bisectadas, no modifican significativamente su biopotencia con el contenido en ácido siálico; este residuo sólo podría regular el tiempo de permanencia de la hormona en circulación. La biopotencia de estas isoformas estaría dada específicamente por la estructura particular de sus oligosacáridos.
- 4- las isoformas de FSH aisladas en extractos hipofisarios humanos, son encontradas también en circulación.
- 5- los cambios en el entorno hormonal no sólo modifican el contenido de ácido siálico sino la proporción de isoformas con diferentes estructuras de sus oligosacáridos.
- 6- en la mujer durante la etapa reproductiva, factores de origen gonadal regularían directa o indirectamente en el gonadotropo la síntesis de isoformas de FSH que han completado su paso por todas las cisternas del aparato de Golgi; esta hormona se caracteriza por poseer cadenas de oligosacáridos de tipo complejo y de baja biopotencia.
- 7- la ausencia de actividad gonadal, característica de la postmenopausia, se asocia con la desaparición de circulación del grupo de isoformas de FSH con oligosacáridos muy ramificados y con la aparición de isoformas que no han completado la incorporación de azúcares en los compartimientos medio y trans del aparato de Golgi.
- 8- en el varón, el perfil de isoformas de FSH circulantes es diferente al de la mujer.

- 9- la pubertad masculina se acompaña de cambios en el polimorfismo de la FSH que originan un perfil característico para cada estadio del desarrollo puberal. Dichos cambios consisten en: modificaciones en el contenido de ácido siálico, en la biopotencia de la hormona y en las proporciones de isoformas con distintas estructuras internas de sus cadenas carbohidratadas.
- 10- la administración de una dosis única de GnRH induce cambios sobre el polimorfismo de la FSH. En forma independiente del entorno hormonal, el GnRH es capaz de regular la permanencia de la hormona en circulación. En presencia de niveles bajos de andrógenos, también modula el procesamiento de los oligosacáridos en etapas previas al agregado de ácido siálico terminal.

En resumen, la biopotencia de la FSH no está determinada solamente por el contenido de ácido siálico, azúcar terminal de las cadenas de carbohidratos unidas al polipéptido, sino que la estructura interna de la cadena le confiere a la hormona características biológicas específicas. El entorno hormonal regula el polimorfismo de esta hormona a distintos niveles del procesamiento de los oligosacáridos presentes en la molécula.

Posible significado fisiológico del polimorfismo de FSH

La FSH es una hormona involucrada en numerosos procesos biológicos. En el ovario, estimula el desarrollo de los folículos ováricos, previene la atresia folicular, induce la actividad aromatasa, estimula la proliferación de las células de la granulosa e induce la aparición de los receptores de LH. En el testículo, la FSH es esencial para la estimulación de la proliferación y la maduración final de la célula de Sertoli, y en la iniciación de la primera onda espermatogénica. En ambas gonadas la FSH estimula la síntesis de proteínas específicas tales como la proteína ligadora de andrógenos (ABP), el activador de plasminógeno y la transferrina, entre otras.

La acción de la FSH en las gonadas se produce a través de la unión a un receptor específico en las células de la granulosa en el ovario y en las células de Sertoli en el testículo. La unión de la FSH con su receptor promueve el acoplamiento del complejo

hormona-receptor a una proteína G, desencadenando una cascada de eventos que conducen a la expresión de la respuesta biológica en la célula blanco.

Cabe señalar que en la unión de la molécula de FSH al receptor participan determinantes estructurales presentes en la porción proteica de la molécula, mientras que los residuos carbohidratados son fundamentales para el desencadenamiento de la respuesta biológica. Estas evidencias surgidas en los últimos años, otorgarían un significado fisiológico para la existencia de una hormona como una familia de variantes glicosiladas.

Schaaf y colaboradores (1997) estudiaron la posible relación entre isoformas de TSH con diferentes estructuras glicosiladas y la activación de diferentes sistemas de segundos mensajeros. La estimulación de las vías de AMP cíclico, PKA dependiente, y de la hidrólisis de fosfoinosítidos fueron determinadas en células CHO y Cos-7, transfectadas con ADN copia del receptor de TSH. Utilizando preparaciones estándar de TSH hipofisaria humana, estos autores aislaron isoformas con distinto contenido en ácido siálico, en residuos fucosa y con diferente estructura de cadena interna. La estimulación de la vía de la hidrólisis de fosfoinosítidos se produjo únicamente en presencia de isoformas de TSH que poseían un residuo fucosa en sus cadenas. Por el contrario, estas isoformas ejercerían solamente un efecto potenciador de la vía del AMPc, PKA dependiente. Asimismo, cuando se estudió el efecto que producían las isoformas que poseían cadenas de carbohidratos incompletas se observó que producían un estímulo mayor sobre la producción de AMPc que aquellas con cadenas de carbohidratos de tipo complejo.

También para la FSH han surgido las primeras evidencias de respuestas biológicas diferenciales producidas por determinadas estructuras de cadena glicosilada presentes en las isoformas. Arey y colaboradores (1997) han demostrado que la FSH recombinante humana producida por células de insectos, la cual posee estructuras carbohidratadas incompletas, produce una respuesta bifásica tanto en la producción de AMP cíclico en líneas celulares transfectadas con el receptor de FSH humano como en la producción de estrógenos en células de la granulosa en cultivo. Estos autores postulan que la respuesta al estímulo con las isoformas de FSH con cadenas de carbohidratos incompletas se ejercería a través de un mecanismo estimulatorio a dosis bajas e inhibitorio a dosis altas, sugiriendo que el receptor de FSH si bien clásicamente se ha definido como acoplado a una proteína G estimuladora (G_s) podría asociarse también a otras proteínas G, tales como G_i / G_o , de tipo inhibitorio, dependiendo de la isoforma de FSH que se haya unido al mismo.

Debido a las numerosas acciones que posee la FSH en las gonadas, se podría postular que cada una de las variantes moleculares de esta hormona sería responsable de la inducción diferencial de una determinada respuesta biológica.

De esta forma, el ovario y el testículo podrían responder a diferentes señales, enviadas por la hipófisis y reguladas por el entorno hormonal, que serían interpretadas por el receptor gonadal, activando mecanismos de transducción adecuados al evento biológico que debe inducir.

Bibliografía

- Albanese C, Colin IM, Crowley Jr. WF, Ito M, Pestell RG, Weiss J, Jameson JL (1995) The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res* 51: 23-61.
- Allen AD, Tsai D, Schachter H (1984) Control of glycoprotein synthesis. The *in vitro* synthesis by hen oviduct membrane preparations of hybrid asparagine-linked oligosaccharides containing 5 mannose residues. *J Biol Chem* 259: 6984-6990.
- Anderson CH, Greenwald GS (1969) Autoradiographic analysis of estradiol uptake in the brain and pituitary of the female rat. *Endocrinology* 85: 1160-1165.
- Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, López FJ (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 11: 517-526.
- Ashwell G, Harford J (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 51: 531-554.
- Baenziger JU, Green ED (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.
- Baird DT, Fraser IS (1974) Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 β and estrone in women throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 1009-1017.
- Beitins IZ, Padmanabhan V, Kasa-Vubu J, Kletter GB, Sizonenko PC (1990) Serum bioactive FSH concentrations from puberty to adulthood: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 4-10.
- Bergadá C (1984) Regulación hormonal del comienzo de la pubertad en el ser humano. *Neur Lat* 1: 5-17.
- Bergadá C (1986) Prólogo. En: Fisiopatología de la Pubertad. Editado por: Bergadá C, Rivarola MA y col. Editorial Ergon, Buenos Aires.
- Bishop LA, Nguyen TV, Schoefield PR (1995) Both of the β -subunit carbohydrate residues of follicle-stimulating hormone determine the metabolic clearance rate and *in vivo* potency. *Endocrinology* 136: 2635-2640.
- Blithe DL (1990) Carbohydrate composition of the α -subunit of human choriogonadotropin (hCG α) and the free α molecules produced in pregnancy: most free α and some combined hCG molecules are fucosylated. *Endocrinology* 126: 2788-2799.
- Blum WFP, Riegelbauer G, Gupta D (1985) Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on *in-vitro* bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J Endocrinol* 105: 17-27.
- Bogdanove EM, Campbell GT, Blair ED, Mula ME, Miller AE, Grossman GH (1974) Gonad-pituitary feedback involves qualitative change: androgens alter the type of FSH secreted by the rat pituitary. *Endocrinology* 95: 219-228.
- Boorstein WR, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC (1982) Human chorionic gonadotropin β -subunit is encoded by at least eight genes arranged in tandem and inverted pairs. *Nature* 300: 419-422.
- Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, Mc Williams D, Boime I (1981) A single gonadotropin α -subunit gene in normal tissue and tumor derived cell lines. *J Biol Chem* 256: 5121-5127.

- Burger HG (1992) Inhibin. *Reprod Med Rev* 1: 1-20.
- Burger HG, Dudley EC, Hopper J, Shelly JM, Green A, Smith A, Dennerstein L, Morse C (1995) The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3537-3545.
- Clayton RN (1982) GnRH modulation of its own pituitary receptors: evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* 111: 152-157.
- Clayton RN, Catt KJ (1981a) Regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors by gonadal hormones. *Endocrinology* 108: 887-895.
- Clayton RN, Catt KJ (1981b) Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2: 186-209.
- Clayton RN, Solano AR, García-Vela A, Dufau ML, Catt KJ (1980) Regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 107: 699-706.
- Combarnous Y (1992) Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocr Rev* 13: 670-691.
- Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL, Reiter EO (1975) A diphasic pattern of gonadotropin secretion in patients with the syndrome of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 670-674.
- Conte FA, Grumbach MM, Kaplan SL, Reiter EO (1980) Correlation of LRF-induced LH and FSH release from infancy to 19 years with the changing pattern of gonadotropin secretion in agonaladal patients: relation to the restraint of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 163-168.
- Crowley Jr. WF, Whitcomb RW, Jameson JL, Weiss J, Finkelstein JS, O'Dea LSL (1991) Neuroendocrine control of human reproduction in the male. *Recent Prog Horm Res* 47: 27-67.
- Cummings RD, Kornfeld S (1982) Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-agarose affinity chromatography. *J Biol Chem* 257: 11235-11240.
- Chappel SC (1981) The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by concanavalin A chromatography. *Endocrinology* 109: 935-942.
- Chappel SC, Bethea CL, Spies HG (1984) Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of Cynomolgus monkeys. *Endocrinology* 115: 452-461.
- Chappel SC, Ramaley JA (1985) Changes in the isoelectric focusing profile of pituitary follicle-stimulating hormone in the developing male rat. *Biol Reprod* 32: 567-573.
- Chappel SC, Resko JA, Normal RL, Spies HG (1981) Studies in rhesus monkeys on the site where estrogen inhibits gonadotropins: delivery of 17 β -estradiol to the hypothalamus and pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 1-8.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J (1983) Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 28: 196-205.
- Chemes HE, Gottlieb SE, Pasqualini T, Domenichini E, Rivarola MA, Bergadá C (1985) Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in human. *J Androl* 6: 102-112.

- Cheng CY, Frick J, Gunsalus GL, Musto NA, Bardin CW (1984) Human testicular Androgen-Binding protein shares immunodeterminants with serum Testosterone-Estradiol-Binding globulin. *Endocrinology* 114: 1395-1401.
- Dahl KD, Pavlou SN, Kovacs WJ, Hsueh AJW (1986) The changing ratio of serum bioactive to immunoactive follicle-stimulating hormone in normal men following treatment with a potent gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 792-794.
- Dahl KD, Stone MP (1992) FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl* 13: 11-22.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC (1989) The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 125: 917-924.
- Danzo BJ, Black JH (1990) Structure of asparagine-linked oligosaccharides on human and rabbit testosterone-binding globulin. *Biol Reprod* 42: 472-482.
- Dharmesh SM, Baenziger JU (1993) Estrogen modulates expression of glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11127-11231.
- Dias JA, Lindau-Shepard B, Hauer C, Auger I (1998) Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol Reprod* 58: 1331-1336.
- Diebel ND, Yamamoto M, Bogdanove EM (1973) Discrepancies between radioimmunoassays and bioassays for rat FSH: evidence that androgen treatment and withdrawal can alter bioassay/immunoassays ratios. *Endocrinology* 92: 1065-1078.
- Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ (1972) Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* 278: 281-292.
- Escobar ME, Rivarola MA, Bergadá C (1976) Plasma concentration of estradiol-17 β in premature thelarche and in different types of sexual precocity. *Acta Endocrinol* 81: 351-361.
- Ferin M, Carmel PW, Zimmerman EA, Warren M, Perez R, Vande Wiele RL (1974) Location of intrahypothalamic estrogen-responsive sites influencing LH secretion in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 95: 1059-1068.
- Fernández Vera, Creus S, Boero L, Mesch V, Benencia H, Campo S (1997) Does aging affect FSH polymorphism in healthy men? *Int J Androl* 20 Suppl. 1. P334: 84.
- Fiddes JC, Goodman HM (1981) The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet* 1: 3-18.
- Filicory M, Butler JP, Crowley WF Jr. (1984) Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 73: 1638-1647.
- Finkelstein JS, Whitcomb RW, O'Dea LStL, Longcope C, Schoenfeld DA, Crowley Jr. WF (1991) Sex steroid control of gonadotropin secretion in the human male. I. Effects of testosterone administration in normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 609-620.
- Forest MG, De Peretti E, Bertrand J (1976) Hypothalamic-pituitary-gonadal relationships in man from birth to puberty. *Clin Endocrinol* 5: 551-569.
- Foulds LM, Robertson DM (1983) Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone for male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 31: 117-130.

- Fritz MA, Spperoff L (1982) The endocrinology of the menstrual cycle: the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril* 38: 509-529.
- Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC (1983) Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol* 99: 31-39.
- Gallo RV (1980) Neuroendocrine regulation of pulsatile luteinizing hormone release in the rat. *Neuroendocrinology* 30: 122-131
- Gharib SD, Bowers SM, Need LR, Chin WW (1986) Regulation of rat LH subunit mRNAs by gonadal steroid hormones. *J Clin Invest* 77: 582-589.
- Gharib SD, Wiernan ME, Shupnik MA, Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11: 177-199.
- Gondos B, Kogan SJ (1990) Testicular development during puberty. *En: Control of the onset of puberty*. Editado por: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML; pág. 387-402. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Gorczyńska E, Handelsman DJ (1991) The role of calcium in FSH signal transduction in Sertoli cells. *J Biol Chem* 266: 23739-23744.
- Green ED, Baenziger JU (1988) Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. I- Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 263: 25-35
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS (1963) The preparation of 131 -I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89: 114-123.
- Griswold MD (1993) Actions of FSH on mamalian Sertoli cells. *En: The Sertoli cell*. Editado por: L.D. Russell, MD Griswold; pág. 494-508. Cache river Press, Clearwater.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1401-1405.
- Grumbach MM Styne DM (1992) Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders. *En: Williams textbook of endocrinology*. Editado por: Wilson JD, Foster DW; pág. 1139-1221. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Grumbach MM, Kaplan SL (1990) The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenetic perspective. *En: Control of the onset of puberty*. Editado por: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML.; pág. 1-68. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Harpaz N, Schachter H (1980) Control of glycoprotein synthesis. Processing of asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi α -D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine: α -D-mannoside β 2-N-acetylglucosaminyl transferase I. *J Biol Chem* 255: 4894-4902.
- Hillier SG, Reichert LE Jr., Van Hall EV (1981) Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 847-856.
- Hoff JD, Quigley ME, Yen SSC (1983) Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 792-796.

- Hoshina H, Boime I (1982) Combination of rat lutropin subunits occurs early in the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7649-7653.
- Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh TH Jr. (1983) Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. *J Reprod Fertil* 69: 325-342.
- Ip C (1980) Changes in tissue and serum sialyltransferase activities as related to proliferation and involution of the rat mammary gland. *Biochim Biophys Acta* 628: 249-254.
- Jones LR, Benker G, Salacinski Pr, Lloyd TJ, Lowry PJ (1979) Large scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J Endocrinol* 82: 77-86.
- Judd HL (1986) Menopause. *En: Essentials of Obstetrics and Gynecology*. Editado por: Hacker N, Moore JG; pág. 436-443. WB Saunders, Philadelphia.
- Judd HL, Judd GE, Lucas WE, Yen SSC (1974) Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 1020-1024.
- Kaplan SL, Grumbach MM (1976) The ontogenesis of human foetal hormones. II. Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH). *Acta Endocrinol* 81: 808-829.
- Kaplan SL, Grumbach MM, Aubert ML (1976) The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog Horm Res* 32: 161-243.
- Kato J (1977) Steroid hormone receptors in brain, hypothalamus and hypophysis. *En: Receptors and mechanism of action of steroid hormones, Part II*. Editado por: Pasqualini JR; pág. 603-671. Marcel Dekker; New York.
- Kennedy J, Chappel S (1985) Direct pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno- and radioreceptor assay. *Endocrinology* 116: 741-748.
- Kessler MJ, Mise T, Ghai DR, Bahl OP (1979) Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J Biol Chem* 254: 7909-7914.
- Kletter GB, Padmanabhan V, Brown MB, Reiter EO, Sizonenko PC, Beitins IZ (1993) Serum bioactive gonadotropins during male puberty: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 432-438.
- Knobil E (1974) On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Prog Horm Res* 30: 1-46.
- Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36: 53-88.
- Kornfeld K, Reitman ML, Kornfeld R (1981) The carbohydrate-binding specificity of Pea and Lentil Lectins. Fucose is an important determinant. *J Biol Chem* 256: 6633-6640.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.
- La Polt PS, Piquette GN, Soto D, Sincich C, Hsueh AJW (1990) Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 127: 823-831.

- Labarca C, Paigen K (1980) A simple rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344-352.
- Leadem CA, Kalra SP (1984) Stimulation with estrogen and progesterone of luteinizing hormone-releasing hormone release from perfused adult female rat hypothalami: correlation with the LH surge. *Endocrinology* 114: 51-56.
- Levine JE, Bethea CL, Spies HG (1985) In vitro gonadotropin releasing hormone release from hypothalamic tissue of ovariectomized estrogen treated cynomolgus macaques. *Endocrinology* 116: 431-438.
- Linder A (1969) Planen und Auswerten von Versuchen, 3rd ed.; pág. 329. Birkhauser, Basle.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321: 779-782.
- Longmore GD, Schachter H (1982) Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose:2acetamido-2-deoxy- β -D-glucoside (Fuc Asn-linked GlcNAc) 6- α -L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver. *Carbohydr Res* 100: 365-392.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mac Naughton J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H (1992) Age related changes in follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol* 36: 339-345.
- Magner JA, Kane J, Chou ET (1992) Intravenous thyrotropin (TSH)-releasing hormone releases human TSH that is structurally different from basal TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 1306-1311.
- Magner JA, Papaggianes E (1987) Structures of high mannose oligosaccharides of mouse thyrotropin: differential processing of α - versus β -subunits of the heterodimer. *Endocrinology* 120: 10-17.
- Magner JA, Weintraub BD (1982) Thyroid-stimulating hormone subunit processing and combination in microsomal subfractions of mouse pituitary tumor. *J Biol Chem* 257: 6709-6715.
- Mahesh VB, Brann DW (1998) Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63: 616-629.
- Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL, Yen SSC (1987) Hormonal dynamics during luteal follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1109-1114.
- Manjunath P, Sairam MR, Sairam J (1982) Studies on pituitary follitropin. X. Biochemical, receptor binding and immunological properties of deglycosylated ovine hormone. *Mol Cell Endocrinol* 28: 125-138.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP (1991) Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* 47:155-189.
- Marshall JC, Kelch RP (1986) Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 315: 1459-1468.
- Marshall WA, Tanner JM (1970) Variations of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45: 15-23.

- Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, Guillemin R, Niall H, Seeburg PH (1985) Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 318: 659-663.
- Matsumoto AM, Bremner WJ (1984) Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 609-614.
- McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ (1979) The production of progesterone, androgens and estrogens by human granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 49: 687-699.
- Means AR, Huckins C (1974) Coupled events in the early biochemical actions of FSH on the Sertoli cells of the testis. *En: Hormone binding and target cell activation in the testis*. Editado por: Dufau ML, Means AR; pág. 145-165. New York, Plenum Press.
- Metcalf MG, Donald RA, Livesey JH (1985) Pituitary-ovarian function before, during and after the menopause: A longitudinal study. *Clin Endocrinol* 104: 357-362.
- Metcalf MG, Livesey JG (1985) Gonadotropin excretion in fertile women: Effect of age and the onset of the menopausal transition. *J Endocrinol* 104: 357-362.
- Midgley Jr. AR, Jaffe RB (1971) Regulation of human gonadotropins: X. Episodic fluctuation of LH during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol* 33: 962-969.
- Midgley Jr. AR (1973) Autoradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Adv Exp Med Biol* 36: 365-378.
- Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, Chappel SC (1983) Pituitary FSH heterogeneity: assessment of biological activities of each FSH form. *Fertil Steril* 40: 242-247.
- Montreuil J (1984) Spatial conformation of glycans and glycoproteins. *Biol Cell* 51: 115-132.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G (1971) The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246: 1461-1467.
- Morris PL, Vale WW, Cappel S, Bardin CW (1988) Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: regulation by follicle-stimulating hormone, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 122: 717-725.
- Moyle WR, Campbell RK, Myers RV, Bernard MP, Han Y, Wang X (1994) Coevolution of ligand-receptor pairs. *Nature* 368: 251-255.
- Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell GG, Robertson WR, Knight PG (1994) Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod* 9: 1634-1642.
- Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E (1978) On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 102: 1008-1014.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Tatani K, Sugino H (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247: 836-838.
- Narasimhan S, Schachter H, Rajalakshmi S (1988) Expression of N-acetylglucosaminyltransferase III in hepatic nodules during rat liver carcinogenesis promoted by orotic acid. *J Biol Chem* 263: 1273-1281.

- Narasimhan S, Tsai D, Schachter H (1981a) An N-acetylglucosaminyltransferase (Gn-T) in hen oviduct which adds GlcNAc to the β -linked Man of the trimannosyl core of Asn-linked oligosaccharides. *Fedn Proc Fedn Am Socs Exp Biol* 40: 1597-1603.
- Narasimhan S, Tsai D, Schachter H (1981b) An N-acetylglucosaminyltransferase (Gn-T) in hen oviduct which adds GlcNAc to the β -linked Man of the trimannosyl core of Asn-linked oligosaccharides: in vitro synthesis of the bisecting GlcNAc residue. *En: Glycoconjugates (Proc. of the Sixth International Symposium on Glycoconjugates)*. Editado por: T. Yamakawa, T Osawa, S Handa; pág. 282-283. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Narasimhan S, Wilson JR, Martin E, Schachter H (1979) A structure basis for four distinct elution profiles on concanavalin A-sepharose affinity chromatography of glycopeptides. *Can J Biochem* 57: 83-96.
- Nelson JD, Jato-Rodriguez JJ, Mookerjee S (1975) Effect of ovarian hormones on glycosyltransferase activities in the endometrium of ovariectomized rats. *Arch Biochem Biophys* 169: 181-191.
- Nilsson B, Rosen SW, Weintraub BD, Zopf DA (1986) Differences in the carbohydrate moieties of the common α subunits of human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and thyrotropin: preliminary structural inferences from direct methylation analysis. *Endocrinology* 119: 2737-2743.
- Nilus SJ, Wide L (1971) Effects of progesterone on the serum levels of FSH and LH in postmenopausal women treated with oestrogen. *Acta Endocrinol* 67: 362-370.
- Odell WD, Swerdloff RS (1968) Progesterone-induced luteinizing and follicle-stimulating hormone surge in postmenopausal women: a simulated ovulatory peak. *Proc Natl Acad Sci USA* 61: 529-536.
- Ogata S, Muramatsu T, Kobata A (1975) Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography of Concanavalin-A Sepharose. *J Biochem* 78: 687-696.
- Ondo JG, Pass KA, Baldwin R (1976) The effects of neurally active amino acids on pituitary secretion. *Neuroendocrinology* 21: 79-87.
- Padmanabhan V, Chappel SC, Beitins IZ (1987) An improved in vitro bioassay for follicle-stimulating hormone (FSH) suitable for measurement of FSH in unextracted human serum. *Endocrinology* 121: 1089-1098.
- Padmanabhan V, Kelch RP, Sostein J, Foster CM, Beitins IZ (1988b) Bioactive follicle-stimulating hormone responses to intravenous gonadotropin-releasing hormone in boys with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 793-800.
- Padmanabhan V, Lang LIL, Sonstein J, Kelch RP, Beitins IZ (1988a) Modulation of serum FSH bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 465-473.
- Padmanabhan V, Miehler CD, Borondy M, l'Anson H, Wood IR, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ (1992) Circulating bioactive follicle-stimulating hormones isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 131: 213-220.
- Papandreou MJ, Asteria C, Pettersson K., Ronin C, Beck-Peccoz P (1993) Concanavalin A affinity chromatography of human serum gonadotropins: evidence for changes of carbohydrate structure in different clinical conditions. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1008-1013.

- Papavasiliou SS, Zmeili S, Khoury S, Landefeld TD, Chin VW, Marshall JC (1986) Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone α and β subunits in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4026-4029.
- Parsons TF, Pierce JG (1980) Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: bovine lutropin resists enzymatic deglycosilation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7089-7093.
- Paul SJ, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Stewart JM, Shupnik MA, Marshall JC (1990) Gonadotropin subunit mRNA concentrations after blockade of GnRH action: testosterone selectively increases FSH beta mRNA by posttranscriptional mechanisms. *Mol Endocrinol* 4: 1943-1955.
- Peckham WD, Yamaji T, Dierschke DJ, Knobil E (1973) Gonadal function and the biological and physicochemical properties of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 92: 1660-1666.
- Peters BP, Krzesicki RF, Hartle RJ, Perini F, Ruddon RW (1984) A kinetic comparison of the processing and secretion of the $\alpha\beta$ dimer and the uncombined α and β subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 259: 15123-15130.
- Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L (1997) Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3103-3106.
- Phillips DJ, Wide L (1994) Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 814-819.
- Pierce JG, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495.
- Reichert Jr. LE (1971) Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. *Endocrinology* 88: 1029-1044.
- Reinhart J, Mertz L, Catt KJ (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267: 21281-21284.
- Reiter EO, Grumbach MM (1982) Neuroendocrine control mechanism and the onset of puberty. *Annu Rev Physiol* 44: 595-619.
- Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C, Chemes H (1995) Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. *Biol Reprod* 52: 997-1002.
- Richards JS (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60: 51-88.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga S, Calandra RS, Campo S (1997) Polimorfismo de FSH hipofisaria en distintos estadios del desarrollo sexual en la rata macho. *Medicina* 57: Sup. 4 N°170.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga S, Calandra RS, Campo S (1999) Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in male rat. *Neuroendocrinology*, en prensa.
- Ryan RJ, Keutman HT, Charlesworth MC, Mc Cormick DJ, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T (1987) Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res* 43: 383-429.
- Sairam MR (1980) Deglycosilation of ovine pituitary lutropin subunits: effects on subunit interaction and hormone activity. *Arch Biochem Biophys* 204: 199-206.

- Sairam MR, Manjunath P (1982) Studies on pituitary follitropin. XI: Induction of hormonal antagonistic activity by chemical deglycosilation. *Mol Cell Endocrinol* 28: 139-150.
- Santen RJ, Bardin CW (1973) Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest* 52: 2617-2628.
- Schaaf L, Leiprecht A, Saji M, Hübner U, Usadel KH, Khon LD (1997) Glycosilation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways. *Mol Cell Endocrinol* 132: 185-194.
- Schaaf L, Trojan J, Helton TE, Usadel KH, Magner JA (1995) Serum thyrotropin (TSH) heterogeneity in euthyroid subjects and patients with subclinical hypothyroidism: the core fucose content of TSH-releasing hormone-released TSH is altered, but not the net charge of TSH. *J Endocrinol* 144: 561-571.
- Schachter H (1984) Coordination between enzyme specificity and intracellular compartmentation in the control of protein-bound oligosaccharide synthesis. *Biol Cell* 51: 133-146.
- Schachter H (1986) Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem Cell Biol* 64: 163-181.
- Schachter H (1991) The "yellow brick road" to branched complex N-glycans. *Glycobiology* 1: 453-461.
- Schachter H, Narasimhan S, Gleeson P, Vella G (1983) Control of branching during the biosynthesis of asparagine-linked oligosaccharides. *Can J Biochem Cell Biol* 61: 1049-1066.
- Schally AV (1978) Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. Its implications for the control of reproductive processes. *Science* 202: 18-28.
- Schally AV, Arimura A, Baker Y (1971) Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393-399.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989) Origin of luteinizing hormone neurons. *Nature* 338: 161-164.
- Sherins RJ, Loriaux LD (1973) Studies on the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentrations in men. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 886-893.
- Shimasaki S, Koga M, Esch F, Cooksey K, Mercado M, Koba A, Ueno N, Ying SY, Ling N, Guillemin R (1988) Primary culture of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4218-4222.
- Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N (1991) Follistatin binds both activin and inhibin through the common β -subunit. *Endocrinology* 128: 3313-3315.
- Shupnik MA, Gharib SD, Chin WW (1988) Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcript in vivo. *Endocrinology* 122: 1842-1846.
- Shupnik MA, Gharib SD, Chin WW (1989) Divergent effects of estradiol on gonadotropin gene transcription in pituitary fragments. *Mol Endocrinol* 3: 474-480.
- Shupnik MA, Rosenzweig BA (1991) Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH β gene. *J Biol Chem* 266: 17084-17091.
- Silman RE, Leone RM, Hooper RJM, Preece MA (1979) Melatonin, the pineal gland and human puberty. *Nature* 282: 301-301.
- Skarulis MC, Wehmann RE, Nisula BC, Blithe DL (1992) Glycosilation changes in human chorionic gonadotropin and free α -subunit as gestation progresses. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 91-96.

- Sklar CA, Mueller PD, Gluckman PD, Kaplan SL, Rudolph AM, Grumbach MM (1981) Hormone ontogeny in the ovine fetus. VII. Circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in mid- and late gestation. *Endocrinology* 108: 874-880.
- Sluyterman LAE, Elgersma O (1978) Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I: General principles. *J Chromatogr* 150: 17-30.
- Sollenberger MJ, Carlsen EC, Johnson ML, Veldhuis JD, Evans WS (1990) Specific physiological regulation of luteinizing hormone secretory events throughout the human menstrual cycle: new insights into the pulsatile mode of gonadotropin release. *J Neuroendocrinol* 2: 845-852.
- Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH (1990) The testicular receptor for follicle-stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 4: 525-530.
- Stadtmauer L, Dittkoff EC, Session D, Kelly A (1994) High dosages of gonadotropin are associated with poor pregnancy outcomes after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 61: 1058-1064.
- Stojilkovic SS, Catt KJ (1995) Expression and signal transduction pathways of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Recent Prog Horm Res* 50: 161-205.
- Svensson EC, Soreghan B, Paulson JC (1990) Organization of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem* 265: 20863-20868.
- Tai T, Yamashita K, Ito S, Kobata A (1977) Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and difference in specificity of endo-beta-N-acetylglucosaminidases CII and H. *J Biol Chem* 252: 6687-6694.
- Thotakura NR, Szkudlinski MW, Weintraub BD (1994) Structure-function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrotrophin by sequential deglycosylation and resialylation. *Glycobiology* 4: 525-533.
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R (1987) Isolation and partial characterization of follistatin: a single chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8282-8286.
- Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C, Chappel S (1983) Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. *Acta Endocrinol* 102: 343-350.
- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V (1992a) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human FSH. *Hum Reprod* 7: 23-30.
- Ulloa-Aguirre A, Chappel SC (1982) Multiple species of follicle stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol* 95: 257-266.
- Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinosa R, Dominguez R, Morales L, Flores A (1990) Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol* 126:323-332.
- Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V (1992c) Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum Reprod* 7: 1371-1378.

- Ulloa-Aguirre A, Espinosa R, Damian-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Dominguez R (1988) Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 38: 70-78.
- Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz-Sanchez V, Larrea F (1986) Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *Biol Reprod* 110: 539-549.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley Jr. AR, Beitins IZ, Padmanabhan V (1995) Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 16: 765-787.
- Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E, Damián-Matsumara P (1992b) Effects of gonadotropin-releasing hormone, recombinant human activin-A, and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by the anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol* 134: 97-106.
- Valove FM, Finch C, Anasti JN, Froehlich J, Flack R (1994) Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 135: 2657-2661.
- Wang X, O'Hanlon TP, Lau TJY (1989) Regulation of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone. *J Biol Chem* 264: 1854-1859.
- Watkins PC, Eddy R, Beck AK, Vellucci V, Leverone B, Tanzi RE, Gusella JF, Shows TB (1987) DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone β subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA* 6: 205-212.
- Wen DW, Livingston BD, Medzihradzsky KF, Kelm S, Burlingame AL, Paulson JC (1992) Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. Evidence for a protein motif in the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem* 267: 21011-21019.
- Wide L (1982) Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 682-688.
- Wide L (1985) Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. II-Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol* 109: 190-197.
- 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* 112: 336-344.
- Wide L (1989) Follicle-stimulating hormone in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol* 123: 519-529.
- Wide L, Albertsson-Wikland K (1990) Change in electrophoretic mobility of human follicle stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 271-276.
- Wide L, Hobson BM (1982) Qualitative difference in follicle stimulating hormone activity in the pituitaries of young women compare to that of men and elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 371.
- Wide L, Naessén T (1994) 17 β -Oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol* 40: 783-789.

- Wide L, Wide M (1984) Higher plasma disappearance rate in the mouse for pituitary follicle-stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 426-429.
- Wilkes MM, Yen SSC (1981) Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci* 28: 2355-2359.
- Winters SJ, Troen P (1982) Episodic luteinizing hormone (LH) secretion and the response of LH and follicle-stimulating hormone to LH-releasing hormone in aged men: Evidence for coexistent primary testicular insufficiency and an impairment in gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 560-565.
- Wondisford FE, Radovick S, Moates JM, Usala SJ, Weintraub BD (1988) Isolation and characterization of the human thyrotropin β -subunit gene: differences in gene structure and promoter function from murine species. *J Biol Chem* 263: 12538-12542.
- World Health Organization (1981) Report of a WHO Scientific Group: Research on the menopause. Geneva, WHO Technical Report Series 670.
- Yamamoto K, Tsuji T, Matsumoto I, Osawa T (1981) Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides on immobilized Wheat Germ Agglutinin. *Biochemistry* 20: 5894-5899.
- Yamashita K, Hitoi A, Taniguchi N, Yokosawa N, Tsukada Y, Kobata A (1983) Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidases purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. *Cancer Res* 43: 5059-5063.
- Yen SSC (1991) The human menstrual cycle: Neuroendocrine regulation. *En: Reproductive Endocrinology*. Editado por: Yen SSC, Jaffe R; pág. 273-308. W.B.Saunders, Philadelphia.
- Yen SSC, Tsai CC, Vandenberg G, Rebar R (1972) Gonadotropin dynamics in patients with gonadal dysgenesis. A model for the study of gonadotropin regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 897-904.
- Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis JD, 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.
- Zitta KS, Rulli SB, Campo, S, Calandra RS (1998) Efecto de dihidrotestosterona (DHT) y un antagonista de GnRH sobre las isoformas de FSH en la rata macho. *Medicina* 58: 643; Abs. 338.

