



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**“Regulación hormonal del grado de sialización de la FSH  
y su posible implicancia fisiológica”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

**Bioquímica Verónica Ana Ambao**

Directora de Tesis: Dra. Stella Campo

Directora Adjunta de Tesis: Dra. Susana Rulli

Consejero de Estudios: Dr. Belisario Fernández

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Hipófiso-Gonadal

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá

(CEDIE/CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Junio de 2016

*“No importa a donde llegues en la vida,  
sino de donde partiste y cuanto avanzaste”*

*Ernesto Sábato*

*A Manuel*  
*A mis padres y mis hermanos*

## AGRADECIMIENTOS

### **Mis más sinceros agradecimientos**

*A mi Directora, la Dra. Stella Campo, por mostrarme el mundo de la investigación científica cuando aún era una estudiante, por brindarme la posibilidad de desarrollar esta Tesis, por su compromiso y paciencia, por su constante estímulo de superación personal, por enseñarme y guiarme en este extenso camino.*

*A mi Codirectora, la Dra. Susana Rulli, por su dedicación y apoyo constante que hicieron posible la realización de esta Tesis, por su cariño y calidad humana.*

*Al Dr. Ricardo Calandra, por su invaluable colaboración y apoyo y por estar siempre dispuesto a responder todas mis preguntas.*

*Al Dr. Belisario Fernández, mi Consejero de Estudios, por sus atinados consejos y sugerencias.*

*Al Dr. Ulloa-Aguirre, por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir generosamente su conocimiento y experiencia.*

*Al Dr. Rodolfo Rey, por brindarme el ámbito y condiciones adecuadas para la realización de esta Tesis.*

*A la Dra. Silvia Gottlieb, por brindarme el acceso al material clínico, por su enorme paciencia y disposición para explicarme los aspectos clínicos.*

*A las Dras. Selva Cigorraga, Eliana Pellizzari y Silvina Meroni, por su valiosa colaboración en los cultivos celulares, por su excelente predisposición y por su constante asesoramiento.*

*A las Dras. Gloria Cónsole y Mónica Carino, por su generosa colaboración en el desarrollo y realización de la inmunohistoquímica.*

*A la Dra. María Luján Calcagno, por su desinteresada ayuda y asesoramiento con el análisis estadístico.*

*A Mercedes Astarloa, por su colaboración constante e incondicional.*

*A Susana Mancini, la bibliotecaria, por su dedicación y preocupación en conseguir siempre las referencias bibliográficas.*

*A mis compañeras del laboratorio, presentes y pasadas, a Silvina, Gabio, Luz, Nachi, Manuela y Pato, por los momentos compartidos, el apoyo constante, por su colaboración incondicional, por haber sido parte de este trabajo.*

*A todos mis compañeros del CEDIE, por su cariño y apoyo.*

*Al grupo de trabajo del Instituto de Investigación Médica en Medicina Reproductiva de la ciudad de México, por el afecto que me han brindado durante mi estadía con ellos; a Carlos y Angélica por su colaboración y asesoramiento.*

*A TODOS los que, de una manera u otra, me acompañaron y contribuyeron al desarrollo de este trabajo.*

**Este trabajo ha sido realizado con el apoyo de los siguientes Organismos:**

- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS, PIP N° 5479, 2006-2008.

- AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, PICT N° 25365, 2006-2009.

- CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS, PIP N° 11220090100615, 2010-2013.

Los resultados incluidos en la presente Tesis han originado las siguientes presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

**Comunicaciones presentadas en congresos nacionales:**

- **Ambao V**, Ulloa-Aguirre A, Rulli S, Calandra R, Campo S. Regulación hormonal del polimorfismo de FSH: actividad y expresión génica de sialiltransferasas. L Reunión Anual de la SAIC. Mar del Plata, 29 de noviembre al 2 de diciembre de 2005. Medicina 65, II, R 20, 2005.

- **Ambao V**, Carino M, Cónsole G, Rulli S, Calandra R, Campo S. Efecto del tiempo de castración sobre el grado de sialización y complejidad de carbohidratos de FSH hipofisaria en la rata macho. Presentado en la LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, Noviembre de 2007. Medicina 67, III, R 035, 2007.

**Comunicaciones presentadas en congresos internacionales:**

- **Ambao V**, Ulloa-Aguirre A, Rulli S, Calandra R, Campo S. Regulación hormonal del polimorfismo de FSH: actividad y expresión de sialiltransferasas. XIX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana, ALIRH, Cartagena de Indias, Colombia; Mayo de 2005.

- **Ambao V**, Rulli S, Calandra R, Campo S. Efecto del tiempo de castración sobre la microheterogeneidad molecular de la FSH hipofisaria en la rata macho. Presentado en la XX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH) Buenos Aires, Argentina, 25 al 27 de Abril de 2007. Presentación Oral. Medicina 67, I, R 50.

**Publicaciones en Revistas Científicas Internacionales:**

- Campo S, **Ambao V**, Creus S, Gottlieb S, Fernández Vera G, Benencia H, Bergadá C. Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. Molecular & Cellular Endocrinology, 2007, 260-262: 197-204.

- **Ambao V**, Rulli S, Carino M, Cónsole G, Ulloa-Aguirre A, Calandra R, Campo S. Hormonal regulation of pituitary FSH sialylation in male rats. Molecular & Cellular Endocrinology, 2009, 309, 39-47.

*“Regulación hormonal del grado de sialización de la FSH y su posible implicancia fisiológica”*

La FSH se sintetiza y secreta como una familia de variantes glicosiladas, las cuales difieren en el grado de sialización y complejidad de sus oligosacáridos y en la inducción de respuestas biológicas en células blanco. El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue determinar la regulación hormonal y el mecanismo por el cual se producen cambios en el grado de sialización de la molécula de FSH y su posible implicancia sobre la regulación de la función testicular. En pacientes anórquidos se observaron alteraciones en el grado de sialización de la FSH sérica, en la acción del GnRH y andrógenos. El grado de sialización de FSH se incrementó durante el desarrollo sexual de la rata. La castración, los andrógenos y un antagonista de GnRH afectaron la glicosilación de la FSH hipofisaria y la expresión génica de la *St6gal1*. Variantes glicosiladas de FSHrh indujeron respuestas diferenciales en la producción de estradiol, AMPc e inhibinas en células de Sertoli inmaduras. Los resultados obtenidos demuestran que la regulación de la expresión génica de sialiltransferasas, del grado de sialización de la FSH – involucrado en la respuesta diferencial de la célula blanco – requiere de la integridad funcional del eje hipotálamo-hipófiso-testicular.

**Palabras clave:** FSH, Grado de sialización, Sertoli, Sialiltransferasas, Expresión Génica.

*“Hormonal regulation of FSH sialylation and its physiological relevance”*

FSH is produced and secreted as a family of glycosylation variants which differ from each other in the sialylation and complexity degree of its oligosaccharides and in the induction of biological responses. El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue determinar la regulación hormonal y el mecanismo por el cual se producen cambios en el grado de sialización de la molécula de FSH y su posible implicancia sobre la regulación de la función testicular.

The aim of this Doctoral Thesis was to determine the mechanisms involved in the hormonal regulation of FSH sialylation and the impact of this characteristic on the testicular function. Alterations in serum FSH sialylation, in GnRH and in androgen actions were observed in anorquid patients. An increment in FSH sialylation was observed during sexual development in the rat. Castration, androgens and GnRH antagonist affected FSH glycosylation and the gene expression of *St6gal1*. Different charge analogues isolated from FSHrh induced differential responses on the estradiol, cAMP and inhibins production by immature Sertoli cells.

These results show that the regulation of sialyltransferases gene expression, FSH sialylation degree – involved in the differential response of the target cell – require the functional integrity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis.

**Keywords:** FSH, Sialylation, Sertoli, Sialiltransferases, Gene Expression.

## ABREVIATURAS

ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ACTH	Hormona corticotrofina
ActRIA/B	Receptor de activina tipo I A/B
ActRIIA/B	Receptor de activina tipo II A/B
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMH	Hormona antimülleriana
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
antGnRH	Antagonista de GnRH
AR	Área de referencia
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASGP-R	Receptor hepático de asialoglicoproteínas
Asn	Asparagina
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Animales intactos
CG	Gonadotrofina coriónica
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato
Ci	Curie
cm	Centímetros
CMP-AS	Citidina monofosfato – ácido siálico
Con-A	Concanavalina A
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
CV	Coefficiente de variación
Cx	Castrado
DAB	Tetrahydrocloruro de 3-3'' diaminobencidina
DC	Densidad de células
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHT	Dihidrotestosterona
DMEM	medio Dubelcco modificado por Eagle
DN-t	Dominio N-terminal
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DOI	Densidad óptica integrada
DR	Débilmente Retenidas
DTM	Dominio transmembrana
DTT	Ditiotreitol
DV	Densidad de volumen
E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
EC	Edad cronológica
EDTA	Ácido etilén diamino tetra acético
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoensayo
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
ET	Enantato de testosterona
FMF	Formaldehído - MOPS - Formamida
FS	Folistatina
FR	Fuertemente Retenidas
FSH	Hormona folículo-estimulante

FSHh	Hormona folículo-estimulante humana
FSHhh	Hormona folículo-estimulante hipofisaria humana
FSHR	Receptor de la hormona folículo-estimulante
FSHr	Hormona folículo-estimulante de rata
FSHrh	Hormona folículo-estimulante recombinante humana
FSHrh <sub>3.00-4.09</sub>	Análogos de carga de FSHrh aislados en el intervalo de pH 3.00-4.09
FSHrh <sub>4.10-4.99</sub>	Análogos de carga de FSHrh aislados en el intervalo de pH 4.10-4.99
FSHrh <sub>&gt;5.00</sub>	Análogos de carga de FSHrh aislados a pH >5.00
Fuc	Fucosa
Fut-8	Fucosiltransferasa
g	Aceleración de la gravedad
G	Estadio de desarrollo genital según Tanner
GABA	Ácido $\gamma$ aminobutírico
Gal	Galactosa
Gapdh	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosina difosfato
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
Glc	Glucosa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
h	Hora/s
hCG	Gonadotropina coriónica humana
IEF	Isoelectroenfoque
IFMA	Ensayo inmunofluorométrico
Inh	Inhibina
IRP	Preparación internacional de referencia
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramos
L	Litro
LH	Hormona luteinizante
M	Molar
Man	Manosa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MOPS	(3-N-Morfolino) ácido propanesulfónico
MSH	Hormona melanocito-estimulante
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ m	Micrometros
$\mu$ M	Micromolar
NAcGal	N-acetilgalactosamina
NAcGlc	N-acetilglucosamina
ng	Nanogramos
NIAMDD	National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases
NICHD	National Institute of Child Health and Human Development
NIDDK	National Institute of Diabetes and Kidney Diseases
NIH	National Institute of Health
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
nmol	Nanomol

---

## Abreviaturas

NR	No Retenidas
NS	No significativo
Oligo-dT	Oligonucleótidos de desoxitimidina
OST	Oligosacariltransferasa
p	Probabilidad estadística
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
P-Dol	Dolicol fosfato
pg	Picogramos
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PM	Peso molecular
pmol	Picomoles
P-P-Dol	Dolicol pirofosfato
PRL	Prolactina
Pro- $\alpha$ C	Precursor de la subunidad $\alpha$ de inhibinas
PT	Propionato de testosterona
P/V	Peso en Volumen
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RIE	Radioinmunoensayo
RT	Retrotranscripción
s	Segundos
Ser	Serina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SHBG	Proteína ligadora de esteroides sexuales
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
ST3GAL	$\beta$ -galactósido $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa
ST6GAL	$\beta$ -galactósido $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa
ST6galnac	N-acetilgalactosamida $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa
T	Testosterona
Ta	Temperatura de hibridación
TBS	Solución amortiguadora de Tris salina
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	Treonina
tPA	Activador de plasminógeno
TRH	Hormona liberadora de tirotrófina
TRIS	Hidroximetil aminometano
TSH	Tirotrófina
U	Unidades
UDP	Uridina difosfato
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VP	Vello pubiano
V/V	Volumen en Volumen
W	Watts

---

**ÍNDICE****INTRODUCCIÓN**

<b>1. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal</b>	1
<b>2. Hormona folículo-estimulante</b>	4
2.1 Estructura molecular	4
2.2 Mecanismo de acción	6
2.3 Regulación hormonal de la secreción de FSH inmunológica	8
<b>3. Regulación de la función testicular</b>	15
3.1 Características de la secreción de FSH durante el periodo fetal, postnatal, infancia y pubertad en el varón	15
3.2 Implicancia de la ausencia de tejido testicular en la secreción de FSH	19
3.3 Regulación de la producción de inhibinas en la gonada masculina	20
3.4 Acción de la FSH sobre la célula de Sertoli	21
<b>4. Microheterogeneidad molecular de FSH</b>	24
4.1 Procesamiento de los oligosacáridos en las glicoproteínas	24
4.1.1 Transferencia del precursor de oligosacáridos a proteínas nacientes	25
4.1.2 Procesamiento de los oligosacáridos unidos al polipéptido	26
4.1.3 Elongación de las cadenas carbohidratadas por el agregado de azúcares terminales	31
4.2 Glicosidasas y glicosiltransferasas	33
4.2.1 Estructura y función de las glicosidasas y glicosiltransferasas	34
4.2.2 Sialiltransferasas	35
4.3 Estructura de los oligosacáridos presentes en la FSH	36
4.4 Implicancia de los oligosacáridos en la regulación de la actividad biológica de la FSH	38
4.5 Cambios en la microheterogeneidad molecular de FSH en condiciones fisiológicas y patológicas	41

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

<b>Hipótesis</b>	45
<b>Objetivo general</b>	45
<b>Objetivos específicos</b>	45

**MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>1. Drogas y reactivos</b>	47
<b>2. Pacientes anórkidos prepuberales y puberales</b>	49
<b>3. Animales</b>	50
3.1 Diseño experimental	50
3.2 Obtención de los citosoles de hipófisis	52
3.3 Obtención de los sueros	52
<b>4. Aislamiento de variantes glicosiladas de FSH</b>	53
4.1 FSH sérica humana	53
4.2 FSH hipofisaria de rata	53
4.3 FSH hipofisaria humana	53
4.4 FSH recombinante humana	54
4.5 Isoelectroenfoque preparativo	54
4.5.1 Fundamento	54
4.5.2 Procedimiento	55
4.5.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por la técnica de isoelectroenfoque	57
4.6 Cromatografía de afinidad en Concanavalina-A	58
4.6.1 Fundamento	58
4.6.2 Procedimiento	59
4.6.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por la técnica de cromatografía en Concanavalina-A	61
<b>5. Aislamiento y cultivo de células de Sertoli inmaduras</b>	61
5.1 Aislamiento de los análogos de carga de FSHrh	62
5.2 Cultivo de células de Sertoli	62
<b>6. Determinaciones hormonales</b>	64
6.1 Determinación de hormonas en sueros humanos	64
6.2 Determinación de testosterona en suero de rata	64
6.3 Determinación de FSH	65
6.4 Determinación de los niveles de AMP cíclico	66
6.5 Determinación de estradiol	66
6.6 Determinación de los niveles de inhibina B y de la subunidad $\alpha$ de inhibinas	67
<b>7. Análisis de la expresión del ARNm de las sialiltransferasas hipofisarias <i>St3gal3</i> y <i>St6gal1</i></b>	69
7.1 Extracción del ARN total	69

7.2 Cuantificación del ARN total	70
7.3 Tratamiento con ADNasa	71
7.4 Verificación de la integridad del ARN total	71
7.5 Reacción de retrotranscripción del ARNm	72
7.6 Reacción en cadena de la polimerasa	73
7.6.1 Diseño de cebadores	73
7.6.2 Optimización de las condiciones de reacción para la semicuantificación	75
7.6.3 Electroforesis de los productos de PCR y cuantificación de la expresión	78
<b>8. Inmunohistoquímica de las sialiltransferasas hipofisarias St3gal3     y St6gal1</b>	78
<b>9. Análisis estadístico</b>	79
 <b>RESULTADOS</b>	
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de     FSH sérica en pacientes anórcidos</b>	81
1.1 Pacientes anórcidos en edad prepuberal	81
1.1.1 Datos clínicos y perfil hormonal sérico	81
1.1.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica. Efecto de GnRH	83
1.1.3 Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos Efecto de GnRH	85
1.2 Pacientes anórcidos en edad puberal	87
1.2.1 Perfil hormonal sérico	87
1.2.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica. Efecto del enantato de testosterona	88
1.2.3 Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos. Efecto del enantato de testosterona	90
 <b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de     FSH hipofisaria en ratas macho</b>	93

2.1 Variaciones en el grado de sialización de FSH hipofisaria en distintos estadios del desarrollo sexual	93
2.1.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos	93
2.1.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria	94
2.2 Microheterogeneidad molecular de FSH hipofisaria en animales castrados	96
2.2.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos	96
2.2.2 Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria	97
2.2.3 Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de glicofomas de FSH hipofisaria con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos	100
2.3 Grado de sialización de FSH hipofisaria en ratas macho adultas castradas. Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH	106
2.3.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos	103
2.3.2 Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria	105

### **CAPÍTULO III**

<b>3. Regulación hormonal de la expresión de sialiltransferasas hipofisaria en ratas macho</b>	<b>108</b>
3.1 Expresión génica de sialiltransferasas St3gal3 y St6gal1 en distintos estadios del desarrollo sexual	108
3.2 Efecto de los distintos tiempos de castración sobre la expresión de las sialiltransferasas hipofisarias	109
3.2.1 Expresión génica de sialiltransferasas St3gal3 y St6gal1	109
3.2.2 Detección de sialiltransferasas por inmunohistoquímica	110
3.3 Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH a ratas adultas castradas	114

**CAPÍTULO IV**

<b>4. Efecto del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras</b>	116
4.1 Efecto de FSHhh y FSHrh sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras	117
4.1.1 Producción de AMPc	117
4.1.2 Producción de estradiol	118
4.1.3 Producción del precursor de subunidad alfa de inhibina	119
4.1.4 Producción de inhibina B	120
4.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh y FSHhh	121
4.2.1 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh	122
4.2.1 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHhh	123
4.3 Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras	125
4.3.1 Producción de AMPc	126
4.3.2 Producción de estradiol	127
4.3.3 Producción del precursor de subunidad alfa de inhibina	128
4.3.4 Producción de inhibina B	130
 <i>Resumen de resultados</i>	 132
 <b>DISCUSIÓN</b>	 133
 <b>CONCLUSIONES</b>	 157
 <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	 159
 <b>ANEXO</b>	 178

# ***Introducción***

## Introducción

La interacción de los órganos involucrados en el proceso de la reproducción, el cual asegura la continuidad de las especies ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, se desconocen hasta el momento algunos aspectos de los mecanismos que participan en la regulación de la función reproductiva.

### 1. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal

La función reproductiva en los mamíferos es el resultado de complejas interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y las gonadas.

El hipotálamo y la glándula hipófisis son estructuras anatómica y fisiológicamente muy relacionadas, las cuales constituyen una unidad funcional que regula la actividad de las glándulas endocrinas (Figura 1).

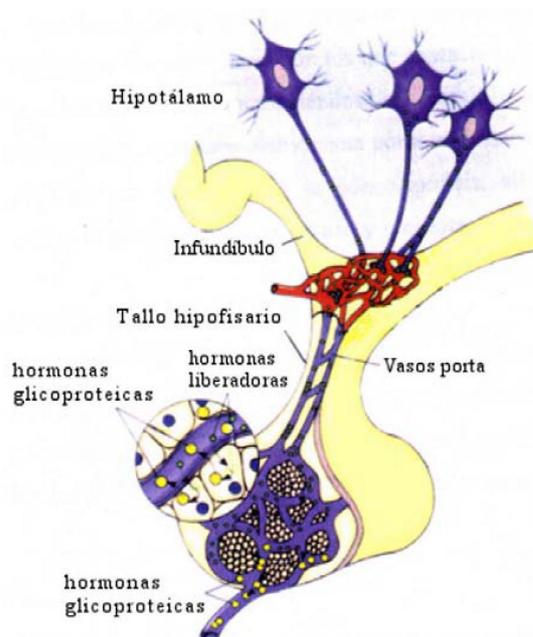


Figura 1: Esquema del eje hipotálamo-hipofisario

El hipotálamo ocupa la región ventromedial del diencefalo y está comunicado con la hipófisis a través del infundíbulo. Contiene a las neuronas secretoras de factores liberadores de hormonas proteicas: GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas), TRH (hormona liberadora de tirotrófina), CRH (hormona liberadora de corticotrofina) y GHRH (hormona liberadora de hormona de crecimiento). Estos factores son liberados a los vasos del sistema porta hipotálamo-hipofisario, los cuales establecen la comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis, para ejercer su acción sobre la adenohipófisis.

El principal producto de secreción del hipotálamo relacionado con la reproducción, es el GnRH, el cual es sintetizado y secretado en forma pulsátil por las neuronas localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal y en el área preóptica del hipotálamo anterior. Estas neuronas operan de manera sincronizada y constituyen el denominado generador de pulsos de GnRH. Este factor estimula la síntesis y secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo-estimulante (FSH), actuando a través de receptores específicos en los gonadotropos de la hipófisis (Schally, 1978; Dan-Cohen y col., 1990).

La hipófisis es una pequeña glándula situada en la base del cráneo, en una hendidura del hueso esfenoideas denominada silla turca. Se divide anatómicamente en un lóbulo anterior o adenohipófisis, un lóbulo intermedio (*pars intermedia*) y un lóbulo posterior o neurohipófisis.

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

El lóbulo intermedio consiste en una capa delgada de células en la zona que

limita la adenohipófisis con la neurohipófisis. En muchas especies, en esta región se sintetiza la hormona melanocito estimulante (MSH).

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. Almacena las hormonas antidiurética (ADH) y oxitocina secretadas por estas neuronas.

Las gonadas, los ovarios en la hembra y los testículos en el macho, son los órganos reproductivos en los cuales residen las células germinales. Su principal función es proveer el soporte necesario para que las gametas se desarrollen y alcancen su máximo potencial, es decir que adquieran la capacidad de unirse a la célula germinal del sexo opuesto y producir un embrión capaz de desarrollarse normalmente. Además, las gonadas producen esteroides los cuales son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios.

Las gonadotrofinas LH y FSH, interaccionando con factores de producción local, regulan el crecimiento, diferenciación y funcionalidad del ovario y del testículo. En consecuencia, constituyen las señales esenciales en el control de la actividad cíclica del ovario y la espermatogénesis en distintas especies.

El ovario sintetiza estrógenos y progestágenos y produce ovocitos fertilizables. La FSH, actuando sobre las células de la granulosa, es el principal estímulo para el crecimiento y maduración folicular. La LH induce 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 síntesis de andrógenos y la producción de espermatozoides maduros. Los testículos están constituidos por dos compartimientos: el intersticial, sitio en el cual se sintetizan andrógenos, y el tubular, donde tiene lugar el ciclo espermatogénico (Fawcett y col., 1973).

El compartimiento intersticial es una región altamente vascularizada que rodea a los túbulos y en su interior se halla el fluido del mismo nombre, las células de Leydig, macrófagos, mastocitos, fibroblastos y linfocitos. En las células de Leydig se encuentran las enzimas necesarias para la síntesis de andrógenos, siendo la actividad de las mismas estimuladas por la LH.

El compartimiento tubular está formado por los túbulos seminíferos, que se encuentran rodeados por el tejido peritubular, fibras elásticas y miofibrillas. Presentan un epitelio que contiene las células germinales, en distintos estadios de su desarrollo, y las células de Sertoli, las cuales se extienden desde la membrana basal hacia el lumen tubular emitiendo proyecciones que rodean a las células germinales y conforman la barrera hematotesticular.

## **2. Hormona folículo-estimulante**

La FSH secretada por la hipófisis anterior, regula procesos reproductivos esenciales tales como el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis y el desarrollo folicular. Esta hormona se sintetiza y secreta como un continuo de variantes moleculares de glicosilación, las cuales difieren en sus características físico-químicas y biológicas (Chappel y col., 1983; Baenziger y Green, 1988; Stockell y Renwick, 1992). A estas diferentes formas moleculares, que varían en la estructura y composición de sus cadenas carbohidratadas, se las denomina variantes de glicosilación ó glicoformas.

### **2.1 Estructura molecular**

La FSH, junto a la LH, la TSH y la gonadotropina coriónica (CG), integran una familia de hormonas glicoproteicas relacionadas estructuralmente entre sí. Son heterodímeros compuestos por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , asociadas en forma no

covalente. Dentro de una misma especie, la subunidad  $\alpha$  es común a todos los miembros de la familia, y está codificada por un mismo gen. Por el contrario, la subunidad  $\beta$  es distinta para cada hormona, y otorga especificidad bioquímica y biológica a la molécula (Pierce y Parsons, 1981).

La subunidad  $\alpha$  está constituida por una cadena polipeptídica de 92 aminoácidos en humanos y 96 en otras especies, y posee dos sitios de N-glicosilación en los residuos asparagina (Asn) ubicados en las posiciones 56 y 82 en la FSH ovina y bovina, ó 52 y 78 en la FSH humana (Pierce y Parsons, 1981). Si bien dentro de una misma especie, la ubicación de los sitios de glicosilación de las subunidades  $\alpha$  de las cuatro hormonas glicoproteicas es la misma (Ryan y col., 1987), la estructura de las cadenas de oligosacáridos de esta subunidad difiere en cada una de ellas (Nilsson y col., 1986). La subunidad  $\beta$  posee 111 aminoácidos y dos sitios de N-glicosilación en los residuos Asn ubicados en las posiciones 7 y 24 (Pierce y Parsons, 1981).

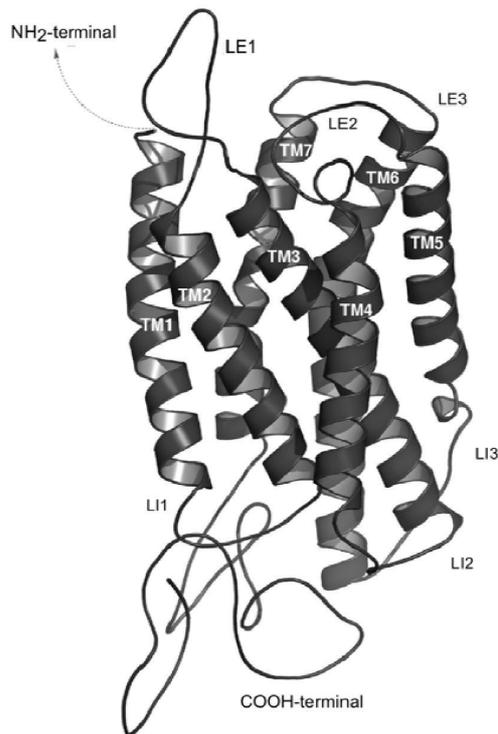
La Figura 2 muestra el modelo propuesto para la estructura molecular de la FSH humana (Fox y col., 2001).



**Figura 2:** Modelo de la estructura molecular de la FSH humana. La cinta gris claro representa la subunidad  $\alpha$  y la cinta gris oscuro, la subunidad  $\beta$ . Cada subunidad posee dos cadenas de oligosacáridos (tomado y modificado de Fox y col., 2001).

## 2.2 Mecanismo de acción

Al igual que las demás hormonas glicoproteicas, la FSH ejerce sus efectos en las células de la granulosa y de Sertoli a través de su unión a receptores específicos de membrana, que pertenecen a una subfamilia de receptores acoplados a proteína G. Los mismos están constituidos por una cadena polipeptídica que presenta un dominio N-terminal extracelular hidrofílico, relativamente largo, y siete  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas que constituyen los típicos dominios transmembrana, conectados por tres lazos cortos extracelulares y tres intracelulares. Por último, un dominio C-terminal corto, que se localiza intracelularmente (Sprengel y col., 1990; Minegishi y col., 1991) (Figura 3).



**Figura 3:** Estructura del receptor de FSHh. Se muestran los 7 dominios transmembrana (TM 1-7) en forma de  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, conectados por los lazos extracelulares (LE) e intracelulares (LI) (tomado y modificado de Ulloa-Aguirre y col., 2009).

El receptor de FSH (FSHR) es una glicoproteína de 75 kDa codificada por un solo gen que se localiza en el cromosoma 2 del genoma humano (Sprenguel y col., 1990). Si bien las dos subunidades de la gonadotropina interactúan con el receptor, éste distingue y reconoce al dímero por su subunidad  $\beta$ . La unión de la hormona con el dominio aminoterminal de su receptor induce una serie de cambios conformacionales activándolo y permitiendo la transducción de la señal a través de sus dominios transmembrana y de las asas intracelulares, resultando en la activación de las proteínas G.

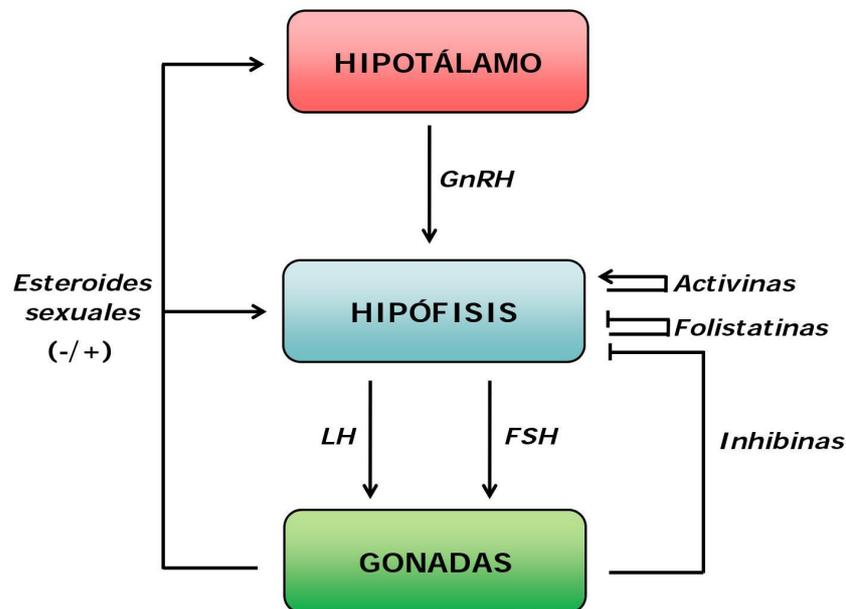
El mecanismo clásico de acción de FSH es la vía de señalización AMPc, a través de la activación de una proteína G estimuladora (Walker y Cheng, 2005; Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006). La activación de esta proteína G conduce a la disociación de la subunidad  $\alpha$ , la cual estimula la adenilato ciclasa provocando un

incremento en los niveles de AMPc intracelular. Como consecuencia, se produce la activación de la proteína quinasa A (PKA). La fosforilación específica por PKA origina cambios en la estructura y función de enzimas, factores regulatorios o proteínas estructurales de la célula blanco (Griswold, 1993).

Sin embargo, se han descrito otros mecanismos de señalización por activación del complejo FSH/FSHR (revisados en Walker y Cheng, 2005; Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006; Ulloa-Aguirre y col., 2007; Gloaguen y col., 2011) ya que numerosos efectos no pudieron ser explicados por el mecanismo clásico. Se ha sugerido que otras vías alternativas podrían ser activadas por FSH en células gonadales. Por ejemplo, se ha reportado que esta gonadotropina es capaz de inducir el aumento de calcio intracelular, activando la vía PI3K/PKB en forma independiente de PKA en células de Sertoli (Gorczyńska y Handelsman, 1991; Meroni y col., 2002, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que las vías p38MAPK y ERK1/2 dependientes también están involucradas en la acción de FSH en estas células (Meroni y col., 2004).

### **2.3 Regulación hormonal de la secreción de FSH**

La síntesis y secreción de FSH depende de la interacción de los componentes del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. El hipotálamo, participa en este proceso a través de la secreción de GnRH; la hipófisis, a través de la secreción de activinas y folistatinas y las gonadas, a través de la secreción de péptidos y esteroides (Figura 4).



**Figura 4:** Regulación de la función eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. La secreción del gonadotropo hipofisario es regulada por la integración de la señal del GnRH, de los esteroides sexuales y de los péptidos hipofisarios y gonadales.

Para mantener una adecuada funcionalidad del gonadotropo, se requiere una secreción pulsátil de GnRH (Plant, 2015). Se ha demostrado que la exposición continua a altas dosis de GnRH provoca la desensibilización de la respuesta celular asociada a una disminución en el número de receptores de membrana y al desacople de los sistemas de transducción en las células productoras de gonadotropinas (Clayton, 1982; Chang y col., 1988; Cheng y Leung, 2005).

La amplitud y la frecuencia de los pulsos de GnRH regulan la expresión génica diferencial de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las gonadotropinas (Albanese y col., 1996). En modelos animales se ha demostrado que la expresión del gen de la subunidad  $\beta$  de LH (*Lhb*) es altamente dependiente de la amplitud del pulso de GnRH, mientras que la expresión de la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas (*Cga*) y de la subunidad  $\beta$  de FSH (*Fshb*) son relativamente independientes de la amplitud del mismo (Papavasiliou y col., 1986; Marshall y col., 1991).

A su vez, los gonadotropos pueden responder en forma diferencial a las

variaciones en la frecuencia de la pulsatilidad de GnRH. Pulsos de GnRH de alta frecuencia (aprox. cada 30 minutos) favorecen la expresión del gen *Lhb*, mientras que pulsos de baja frecuencia (2 a 4 horas) estimulan preferencialmente la expresión de *Fshb* y en consecuencia, la secreción de esta gonadotropina (Papavasiliou y col., 1986; Dalkin y col., 1989). Se ha propuesto que la activación transcripcional de *Fshb* estaría relacionada con la activación diferencial de determinadas vías de señalización y con la abundancia relativa de factores de transcripción estimulatorios e inhibitorios en el promotor de este gen, tales como FOS, JUN, SKIL y TIGF1 (Kanasaki y col., 2005; Bernard y col., 2010; Mistry y col., 2011).

El GnRH actúa sobre receptores específicos en la membrana plasmática de los gonadotropos, que pertenecen 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 (Clayton y Catt, 1981; Reinhart y col., 1992). El complejo hormona-receptor se acopla a la proteína  $G_{\alpha_q/11}$  con la subsecuente activación de la fosfolipasa  $C\beta$ , liberación de calcio de depósito, y activación de la proteína quinasa C (PKC). La activación del receptor de GnRH también lleva a la activación de quinasas de la vía MAPK; este mecanismo culmina con la activación de la transcripción de los genes de las subunidades de gonadotropinas (Thackray y col., 2010).

Los esteroides sexuales producidos por las células de Leydig, las células de la teca y las células de la granulosa regulan la síntesis y secreción de LH y FSH.

En el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, los estrógenos ejercen efectos inhibitorios y estimulatorios sobre la secreción de gonadotropinas (Nakai y col., 1978; Plant, 2015). A bajas concentraciones, los estrógenos ejercen una acción inhibitoria sobre el hipotálamo, modificando la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH; y sobre la hipófisis, modulando el número de receptores de este péptido

(Kamel y col., 1987; Kaiser y col., 1993). Por el contrario, una exposición prolongada a altas concentraciones de estrógenos induce la liberación de GnRH, estimulando la secreción de ambas gonadotrofinas (Levine y col., 1985). La acción de la progesterona sobre la secreción de gonadotrofinas es compleja; se ha observado que pueden ejercer un efecto inhibitorio o estimulador de acuerdo al tono estrogénico que la acompaña y a la presencia de activina (Leadem y Kalra, 1984; Miyake y col., 1993).

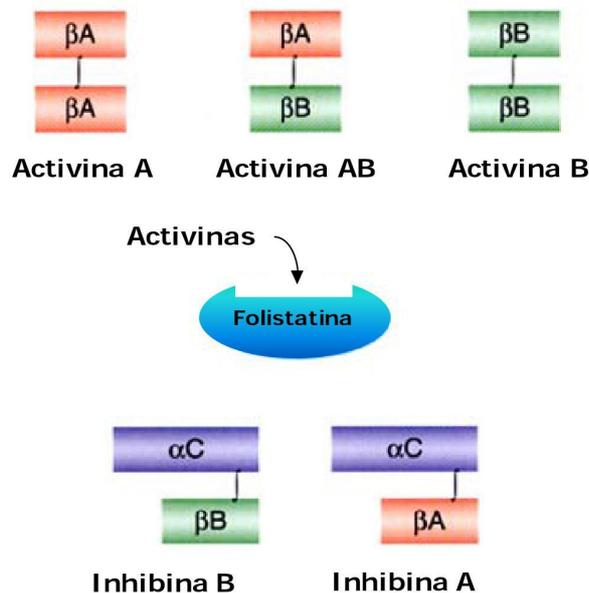
La acción de los andrógenos sobre la función del eje hipotálamo-hipófiso-testicular es claramente inhibitoria a nivel de la secreción de LH (Sherins y Loriaux, 1973; Pitteloud y col., 2008a). El mecanismo por el cual los andrógenos regulan la secreción de FSH es complejo. Existen evidencias sobre el efecto inhibitorio que la testosterona ejerce sobre la síntesis de FSH a nivel hipotalámico, el cual sería mediado por la conversión de testosterona a estradiol (Matsumoto y Bremner, 1984; Finkelstein y col., 1991; Bagatell y col., 1994; Lindzey y col., 1998; Pitteloud y col., 2008b). Sin embargo, otros trabajos han sugerido que los andrógenos pueden ejercer un efecto estimulador a nivel hipofisario (Rea y col., 1986; Bhasin y col., 1987; Arslan y col., 1989). En estudios posteriores, en coincidencia con estos hallazgos, diversos autores han observado que la testosterona estimularía la transcripción del ARNm de *Fshb* en tejido hipofisario, tanto *in vivo* como *in vitro* (Wierman y Wang, 1990; Paul y col., 1990; Winters y col., 1992; Leal y col., 2003; Burger y col., 2004). Más recientemente, estudios realizados en una línea celular de gonadotropos han demostrado que la activación del promotor de *Fshb* por andrógenos se debe a la unión del receptor de andrógenos con elementos de respuesta a hormonas en el promotor proximal (Spady y col., 2004; Thackray y col., 2006).

La síntesis y secreción de FSH también está regulada por un mecanismo específico, en el cual intervienen péptidos pertenecientes a la superfamilia del

factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ): las activinas, inhibinas y folistatinas.

Las activinas ejercen un efecto estimulador sobre la síntesis y secreción de FSH. Por otro lado, actúan como factores de crecimiento en distintos tipos celulares (Vale y col., 1990). Estos péptidos son dímeros compuestos por dos subunidades  $\beta$ , que se combinan para formar los homodímeros activina A ( $\beta A\beta A$ ) y activina B ( $\beta B\beta B$ ); así como el heterodímero activina AB ( $\beta A\beta B$ ) (Nakamura y col., 1992; Vale y col., 1986; Ling y col., 1986) (Figura 5). Las activinas actúan en forma autocrina; Roberts y col. (1989) utilizando un cultivo de hipófisis, reportaron que las subunidades  $\beta B$  de inhibina/activina se localizan en los gonadotropos. Estimulan la expresión génica de *Fshb*, la secreción de la gonadotropina e incrementan la sensibilidad de los gonadotropos al GnRH, estimulando la expresión del receptor de este factor liberador (Weiss y col., 1995; Ling y col., 1986; Braden y Conn., 1992; Fernández-Vázquez y col., 1996).

Las activinas interactúan con receptores específicos de tipo serín-treonín quinasa. La unión del ligando al receptor de activina tipo II (ActRIIA/B) conduce a la heterodimerización y fosforilación del receptor tipo I (ActRIA/IB); éste fosforila a las proteínas SMADS 2 y 3, las cuales se unen a la proteína SMAD 4 en el citoplasma y traslocan al núcleo, para activar la transcripción de los genes blanco (Lebrun y col., 1999; Massagué, 2000).



**Figura 5:** Representación esquemática de las estructuras de activinas, folistatinas e inhibinas (tomado y modificado de Bilezikjian y col., 1994).

Las inhibinas son sintetizadas en las células gonadales y ejercen su acción sobre los gonadotropos inhibiendo específicamente la síntesis y secreción de FSH (Steinberger y Steinberger, 1976; Erickson y Hsueh, 1978; Robertson y col., 1985). Están formadas por dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas entre sí por puentes disulfuro. La subunidad  $\beta$  existe en dos formas altamente homólogas llamadas  $\beta A$  y  $\beta B$ , las cuales dan origen a los heterodímeros inhibina A ( $\alpha\beta A$ ) e inhibina B ( $\alpha\beta B$ ), respectivamente. Ambos dímeros contienen idénticas subunidades  $\alpha$  (Mason y col., 1985; Ling y col., 1985; Forage y col., 1986) (Figura 5). Hasta el momento no se ha identificado un receptor específico para las inhibinas; se ha observado que se unen a ActRIIA/B y a una proteína accesoria de unión o correceptor, el betaglicano, formando el complejo betaglicano-inhibina-ActRIIA/B que, al ser incapaz de reclutar al receptor tipo I, no desencadena la cascada de señales (Martens y col., 1997; Lewis y col., 2000; Wiater y col., 2006 y 2009).

La producción de inhibinas a nivel gonadal es, a su vez, estimulada por la FSH y modulada por diversos factores producidos localmente en las gonadas (Bicsak y

col., 1986 y 1987).

La subunidad alfa de inhibina (Pro- $\alpha$ C), que se sintetiza como precursor de alto peso molecular, contiene la región Pro del péptido y no se ha demostrado hasta el momento que ejerza alguna actividad biológica con relación a la producción y secreción de FSH. Diversos estudios han reportado que la inmunización contra la porción N-terminal de la Pro- $\alpha$ C afecta la fertilidad en hembras (Findlay y col., 1989 y 1994; Russell y col., 1994 y 1995). En un estudio reciente, Cai y col. (2011) reportaron que la Pro- $\alpha$ C sería importante para el desarrollo de las espermátides redondas durante la primer onda espermatogénica en el ratón, así como en el establecimiento de la barrera hemato-testicular.

Las folistatinas son glicoproteínas aisladas por primera vez de fluido folicular, las cuales inhiben la producción de FSH (Esch y col., 1987; Ueno y col., 1987; Vale y col., 1988). También son producidas en la hipófisis, particularmente por las células folículoestrelladas de la hipófisis anterior, donde actuarían como un modulador local de la señalización de la activina en los gonadotropos (Gospodarowicz y Lau, 1989; Kogawa y col., 1991; Bilezikjian y col., 1993 y 2003). Su efecto inhibitorio sobre la producción de FSH se ejerce como consecuencia de la unión con alta afinidad a la activina, bloqueando la actividad biológica de este péptido (Figura 5) (Nakamura y col., 1990; Shimonaka y col., 1991). En estudios posteriores se demostró que dos moléculas de folistatina forman un complejo con una molécula de activina, de forma tal que enmascaran los sitios de unión de este dímero a su receptor (Fischer y col., 2003; Keutmann y col., 2004; Thompson y col., 2005; Harrison y col., 2006).

Si bien inicialmente se las describió en fluidos biológicos como factores inhibidores de la FSH, en la actualidad se conoce que están ampliamente distribuidas y ejercen diversas funciones regulatorias (Welt y col., 2002).

Se han descrito múltiples isoformas, generadas por corte y empalme de

exones alternativos. Este mecanismo produce dos isoformas principales (FS-315 y FS 288). A partir de las cuales, por clivaje y glicosilación, se originan varias isoformas; hasta seis formas moleculares fueron identificadas en fluidos biológicos (Shimasaki y col., 1988; Inouye y col., 1991; Sugino y col., 1993).

### **3. Regulación de la función testicular**

#### **3.1 Características de la secreción de FSH durante el periodo fetal, postnatal, infancia y pubertad**

Las características de la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal difieren en las distintas etapas de la vida.

Durante la gestación, los cambios en el contenido hipofisario y en las concentraciones séricas de gonadotrofinas en el feto reflejan el desarrollo y maduración del eje. Esta maduración comprende el establecimiento de la regulación de la secreción fetal de gonadotrofinas y el desarrollo del mecanismo de retroalimentación negativo (Kaplan y col., 1976). El sistema porta hipotálamo-hipofisario se establece en las semanas 11 a 13 de la gestación en humanos (Figura 6).

Los gonadotropos se diferencian entre las semanas 8 y 10, y poco tiempo después se detecta FSH en circulación fetal (Kaplan y Grumbach, 1976). En coincidencia con estos hallazgos, otros autores identificaron la subunidad  $\alpha$  de gonadotrofinas a partir de la 9ª semana de gestación, mientras que las subunidades  $\beta$  se expresan a partir de la semana 12 (Asa y col., 1986). Si bien la producción de gonadotrofinas ocurre cuando el sistema porta hipotálamo-hipofisario aún no se encuentra totalmente desarrollado, se ha postulado que en este momento de la gestación la secreción de gonadotrofinas no sería dependiente de GnRH (Kaplan y Grumbach, 1976).

Durante el tercer trimestre de la gestación aumentaría la sensibilidad del hipotálamo a la acción de los esteroides sexuales, produciendo la disminución de los niveles de gonadotrofinas a partir de la semana 25 y alcanzando los niveles mínimos hacia el final de la gestación (Kaplan y Grumbach, 1976; Sklar y col., 1981; Beck-Peccoz y col., 1991).

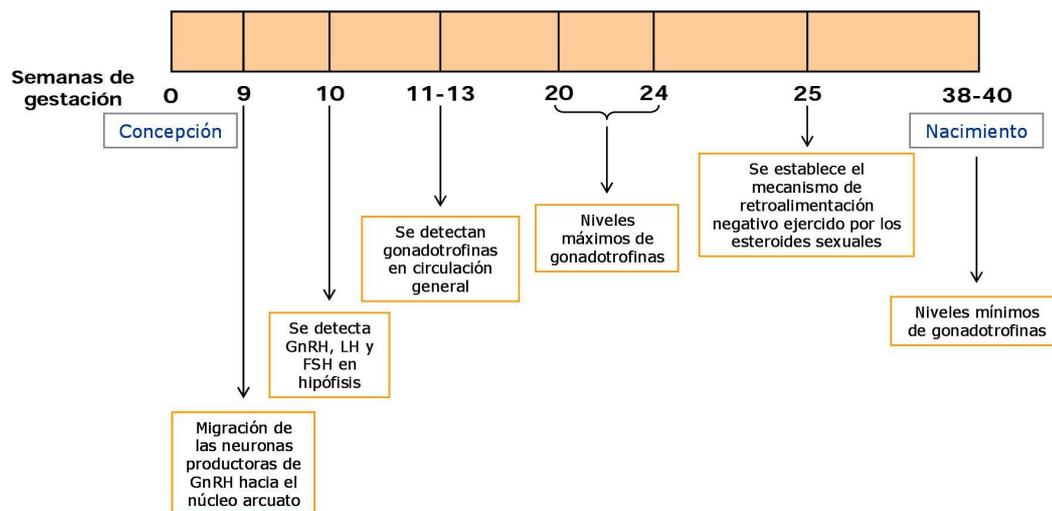


Figura 6: Esquema del desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal durante la gestación en humanos.

Si bien los datos en la literatura sobre la producción de inhibinas fetales son escasos, existen evidencias que muestran que el testículo fetal humano expresa las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta A$  y  $\beta B$  de inhibinas, aunque no se conoce aún la posible contribución de estos péptidos a la regulación de la secreción de FSH en este periodo de la vida (Rabinovici y col., 1991; Anderson y col., 2002).

Después del nacimiento, debido a la inhibición producida por las altas concentraciones de estrógenos placentarios, los niveles séricos de gonadotrofinas se encuentran transitoriamente disminuidos en los primeros días de edad (Corbier y col., 1990; Massa y col., 1992; Andersson y col., 1998; Bergadá y col., 2006). A partir de la segunda semana, las gonadotrofinas aumentan progresivamente, permaneciendo elevadas hasta aproximadamente los 3 meses de edad en los

niños (Andersson y col., 1998; Bergadá y col., 2006). En este periodo, la función principal de la FSH es la estimulación de la proliferación de las células de Sertoli y la producción de inhibina B y hormona antimülleriana (AMH); mientras que la LH, actuando sobre las células de Leydig, estimula la producción de testosterona. Es interesante destacar que en las niñas las concentraciones séricas de gonadotrofinas permanecen elevadas hasta los 2-3 años de edad (Andersson y col., 1998; Resende y col., 2007). Posteriormente, los niveles de gonadotrofinas descienden, manteniéndose en sus valores mínimos hasta el momento en que se inicia la pubertad (Forest y col., 1974 y 1976).

Se han propuesto dos mecanismos que actuarían relacionados entre sí para explicar el periodo de aparente quiescencia o pausa juvenil: el mecanismo de retroalimentación negativo, ejercido por los esteroides gonadales, y el mecanismo inhibitorio intrínseco del sistema nervioso central (SNC), que sería independiente de los esteroides gonadales. El primer mecanismo propone que en este periodo de la vida, el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal poseería una alta sensibilidad al efecto de retroalimentación negativo ejercido por los andrógenos; así, las bajas concentraciones de andrógeno durante la infancia y prepubertad serían suficientes para inhibir el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Grumbach y Kaplan, 1990). Por otro lado, el mecanismo intrínseco propone que existe un componente neural inhibitorio que actúa sobre el hipotálamo (Terasawa y Fernandez, 2001).

El periodo de quiescencia finaliza cuando se inicia la pubertad, como consecuencia de la reactivación del generador de pulsos de GnRH hipotalámico, e involucra a los dos mecanismos responsables de la pausa juvenil. Por un lado, se produce una disminución en la sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa ejercida por los esteroides sexuales. Por otro lado, en forma independiente a los esteroides gonadales, se produce una disminución de la acción inhibitoria del mecanismo intrínseco del SNC. El aumento de la actividad a nivel

hipotalámico parece ser consecuencia de dos factores principales: i) la activación de impulsos interneuronales excitatorios (aminoácidos excitatorios, sistema noradrenérgico, kisspeptina, neuropéptido Y, leptina, factores de crecimiento), y ii) la reducción de impulsos inhibitorios (GABA, sistema opioide, dopamina) (Terasawa y Fernandez, 2001; Grumbach, 2002).

El resultado de estas interacciones es un aumento de la secreción pulsátil de GnRH que desencadena el proceso puberal. La primera manifestación endócrina del comienzo de la pubertad es el aumento de la secreción pulsátil de LH nocturna (Wennink y col., 1988). A medida que avanza el desarrollo puberal, aumenta gradualmente la frecuencia de los pulsos de LH, hasta alcanzar una periodicidad de 1 pulso/90 minutos, que es el patrón observado en adultos (Spratt y col., 1988; Albertsson-Wickland y col., 1997).

Se ha clasificado al desarrollo puberal en 5 estadios, conocidos como los estadios de Tanner I a V (Marshall y Tanner, 1970) que describen en forma progresiva las características de este periodo de la vida en base al grado de desarrollo genital y del vello pubiano. Así, el estadio de Tanner I comprende la etapa prepuberal; el estadio de Tanner II o pubertad temprana comprende el comienzo de la pubertad, el cual se caracteriza por el aumento del volumen testicular en los niños y por el comienzo del crecimiento mamario en las niñas. En el estadio de Tanner III o pubertad media se profundizan las características puberales. Finalmente, en la pubertad avanzada (estadios de Tanner IV y V) se adquieren las características que persistirán en la vida adulta.

Los niveles de FSH aumentan a través del desarrollo puberal; sin embargo, las variaciones en los niveles de esta gonadotropina producidas entre los estadios de Tanner IV y V no son significativas, probablemente debido al mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por la inhibina B, el cual se establecería durante el estadio de Tanner III (Andersson y col., 1997; Crofton y col., 1997 y

2002; Radicioni y col., 2005).

El aumento del volumen testicular, que determina el comienzo de la pubertad, se produce a expensas de la proliferación de las células germinales, seguido luego de unos meses por la aparición del vello pubiano. A partir de ese momento se desarrollan los caracteres sexuales secundarios, los cuales se acompañan con cambios en el crecimiento, la maduración ósea, el comportamiento, etc. y variaciones hormonales determinantes de todas estas manifestaciones.

### **3.2 Implicancia de la ausencia de tejido testicular en la secreción de FSH**

La anorquia, definida como la ausencia de tejido testicular en un individuo 46 XY normalmente virilizado, puede ser congénita o adquirida. Si bien la etiología de esta patología aún no ha sido completamente dilucidada, el tejido testicular funcional debe estar presente durante el primer trimestre de vida fetal, para permitir que la AMH, secretada por las células de Sertoli, provoquen la regresión de los conductos de Müller y los andrógenos, sintetizados por las células de Leydig, induzcan la diferenciación de los conductos de Wolff y la virilización de los genitales externos (Rey y Grinspon, 2011).

Diversos autores han reportado que el incremento en los niveles de FSH en pacientes anórquidos es mayor al incremento en los niveles de LH (Brauner y col., 2011; Grinspon y col., 2012). Estos hallazgos probablemente se deban a la ausencia del mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por inhibina B en forma específica sobre la FSH. En pacientes anórquidos, si bien se mantiene el patrón de secreción de gonadotropinas observado en niños normales, los niveles de las mismas se encuentran elevados. Durante los primeros meses de vida, ambas gonadotropinas se encuentran francamente aumentadas; luego disminuyen en la infancia. La LH disminuye más rápidamente que la FSH, pudiendo incluso

alcanzar los valores normales. Al comienzo de la pubertad, ambas gonadotrofinas aumentan nuevamente, alcanzando valores muy superiores al rango observado en niños normales (Grinspon y col., 2012). Los elevados niveles de gonadotrofinas en estos pacientes son atribuidos a la ausencia del mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la gonada.

### **3.3 Regulación de la producción de inhibinas en la gonada masculina**

Clásicamente se ha aceptado que la FSH es el principal estímulo para la secreción de inhibinas en las células de Sertoli. Los primeros estudios realizados en roedores demostraron que el estímulo de FSH sobre la producción de inhibina se ejerce a nivel de la expresión de la subunidad  $\alpha$  pero no se observaron efectos significativos sobre la expresión de la subunidad  $\beta$ B (Toebosch y col., 1988 y 1989; Pineau y col., 1990; Klaij y col., 1990). Utilizando técnicas más sensibles se logró demostrar que la subunidad  $\beta$ B también puede ser estimulada por FSH (Najmabadi y col., 1993; Okuma y col., 2006).

Con el desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia específica que diferencia la subunidad  $\beta$ A de la  $\beta$ B de inhibina/activina, la región Pro y la región  $\alpha$ C de la subunidad  $\alpha$  de inhibina, se pudo demostrar que la inhibina B es la única forma dimérica de inhibina detectada en el hombre (Groome y O'Brien, 1993). Illingworth y col. (1996) demostraron por primera vez, en condiciones fisiológicas y patológicas, la relación inversa que existe entre los niveles séricos de inhibina B y la FSH. En base a estas evidencias se propuso a la inhibina B como regulador endocrino de la secreción de FSH mediante un sistema de retroalimentación negativo. Trabajos realizados por Jensen y col. (1997) y Pierik y col. (1998) demostraron que los niveles circulantes de inhibina B se correlacionan con el volumen testicular y la concentración espermática en hombres fértiles e infértiles, confirmando el estímulo ejercido por las células germinales presentes en el túbulo seminífero sobre la producción de este dímero

en el adulto.

Cuando se determinó el perfil de inhibina B circulante en el varón desde el nacimiento hasta la edad adulta se observó que los niveles de FSH y de inhibina B se incrementan simultáneamente en dos periodos de la vida: la etapa postnatal y la peripuberal. En la etapa postnatal, en la cual los niveles circulantes alcanzan o superan los observados en el adulto, la correlación positiva entre la inhibina B y la FSH se mantiene durante los primeros 3 meses de vida (Andersson y col., 1998; Chada y col., 2003). Posteriormente, los niveles de FSH circulante descienden rápidamente hasta alcanzar valores prepuberales; sin embargo, la inhibina B disminuye en forma lenta y progresiva, alcanzando los niveles más bajos entre los 4 y los 10 años de edad (Bergadá y col., 1999; Crofton y col., 2002). En consecuencia, es difícil determinar la posible acción que tendría la FSH sobre la producción de inhibina B en el periodo postnatal y durante la infancia. Si bien se puede postular que otros factores estimularían su síntesis, el perfil sérico demuestra claramente que la célula de Sertoli es capaz de producir inhibina B en ausencia de espermatogénesis.

### **3.4 Acción de la FSH sobre la célula de Sertoli**

Las células de Sertoli proveen soporte estructural, nutrientes y factores regulatorios esenciales para la diferenciación de las células germinales. Cada célula de Sertoli puede sostener el desarrollo de un número limitado de células germinales; en consecuencia, el número y funcionalidad de las células de Sertoli determinará en el adulto su capacidad espermatogénica (Johnson y col., 1984; Orth y col., 1988).

La función de las células de Sertoli se encuentra regulada por FSH, por la testosterona sintetizada en las células de Leydig y por distintos factores producidos en el túbulo seminífero.

Las acciones biológicas de la FSH sobre las células de Sertoli son complejas y varían de acuerdo al grado de maduración de estas células (Meachem y col., 2005). En la rata, el receptor de FSH se expresa en estas células a partir de los últimos días de la vida fetal y en el animal adulto su expresión varía en los distintos estadios del ciclo del epitelio seminífero (Heckert y Griswold, 1991).

Una de las funciones más relevantes de la FSH sobre las células de Sertoli inmaduras es la estimulación de su proliferación (Orth, 1984). Sólo las células de Sertoli inmaduras tienen la capacidad de proliferar y lo hacen durante dos periodos de la vida: el periodo fetal-neonatal y el periodo peripuberal (Steinberger y Steinberger, 1971; Orth, 1982; Cortes y col., 1987; Sharpe y col., 2003).

La FSH también participa en la regulación del proceso de maduración terminal de las células de Sertoli. Este proceso involucra importantes cambios morfológicos y funcionales, la pérdida de la capacidad proliferativa y la conformación de las uniones intercelulares que originan la barrera hemato-testicular.

Asimismo, la FSH estimula la producción de diversas proteínas y esteroides secretados por las células de Sertoli, como la proteína ligadora de andrógenos (ABP), la transferrina, el activador de plasminógeno, la aromatasa, la AMH y la inhibina inmunoreactiva (Fritz y col., 1976; Skinner y Griswold, 1982; Lacroix y col., 1977; Dorrington y Armstrong, 1978; Al-Attar y col., 1997; LeGac y de Kretser, 1982). Esta actividad secretoria de las células de Sertoli es modificada a lo largo de su desarrollo: la capacidad de sintetizar AMH y estrógenos es característica de las células de Sertoli inmaduras; en cambio, la capacidad de sintetizar ABP y transferrina es característica de etapas más avanzadas de maduración.

Otras funciones de las células de Sertoli moduladas por la FSH incluyen el transporte de glucosa y su conversión a lactato, el cual es el sustrato metabólico más importante de las células germinales (Riera y col., 2001).

Como se mencionó anteriormente en el ítem 2.2, los efectos biológicos de la FSH en las células de Sertoli son mediados a través de la activación de diversos mecanismos de señalización intracelular. Entre ellos, la vía de ERK1/2 regula principalmente señales mitogénicas. Crépieux y col. (2001) mostraron que la FSH puede ejercer efectos opuestos sobre esta cascada de señalización: en células de Sertoli inmaduras, la gonadotropina ejerce su efecto mitogénico por activación de la quinasa ERK1/2; por el contrario, en células de Sertoli que se encuentran en la etapa de maduración terminal, esta quinasa es inhibida por FSH. Estos hallazgos sugieren que la FSH puede inducir respuestas diferenciales según el grado de maduración de las células de Sertoli.

Un estudio del análisis de la expresión génica global utilizando microarreglos identificó alrededor de 300 genes regulados por FSH en células de Sertoli (McLean y col., 2002). Entre ellos se encontraron genes clásicamente descritos como regulados por esta gonadotropina, como la proteína STAT, la subunidad  $\alpha$  de inhibina, el activador de plasminógeno, el protooncogen cMyc, y otros genes que no han sido reportados como genes blanco de FSH. En un trabajo reciente, se observó un patrón de expresión génica diferencial en células de Sertoli durante la progresión de la espermatogénesis (Zimmermann y col., 2015). Este patrón reflejó el estado de maduración de estas células; los autores observaron que en células de Sertoli inmaduras se estimula la expresión de genes relacionados con proliferación celular, replicación de ADN y activadores del ciclo celular. Por el contrario, las células de Sertoli maduras expresan genes relacionados con la formación de la barrera hemato-testicular y con proteínas involucradas en la síntesis de lactato y piruvato.

#### **4. Microheterogeneidad molecular de FSH**

Las diferencias en la estructura y composición de los oligosacáridos presentes en la FSH origina su microheterogeneidad molecular. Los péptidos que forman las subunidades de FSH se sintetizan en los ribosomas como cadenas pre- $\alpha$  y pre- $\beta$ , ya que contienen en la región N-terminal señales de clivaje y glicosilación. El procesamiento de estos péptidos señal ocurre mientras la cadena polipeptídica aún está siendo sintetizada en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) (Pierce y Parsons, 1981). Asimismo, la formación del heterodímero  $\alpha\beta$  tiene lugar en esta organela (Hoshina y Boime, 1982; Peters y col., 1984). La glicosilación de FSH comienza en el RER del gonadotropo, con la transferencia co-traduccional del precursor de la cadena de carbohidratos (un oligosacárido unido a dolicol) al residuo de asparagina que se encuentra en un sitio de consenso para la N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). Esta cadena es posteriormente modificada en las cisternas cis, media y trans del aparato de Golgi, por una serie de enzimas (glicosidasas y glicosiltransferasas) que actúan en forma estrictamente ordenada y consecutiva (Kornfeld y Kornfeld, 1985). Si el proceso se completa, la proteína presentará oligosacáridos de estructura compleja (biantenarios, bisectados y de alto grado de ramificación); por el contrario, estructuras cuyo procesamiento ha sido interrumpido corresponden a cadenas de oligosacáridos de tipo híbrido o que tienen un alto contenido en manosa. Las variantes de glicosilación de FSH difieren, además, en el grado de sialización presente en las cadenas de carbohidratos unidas al dominio peptídico (Chappel y col., 1983; Creus y col., 2001).

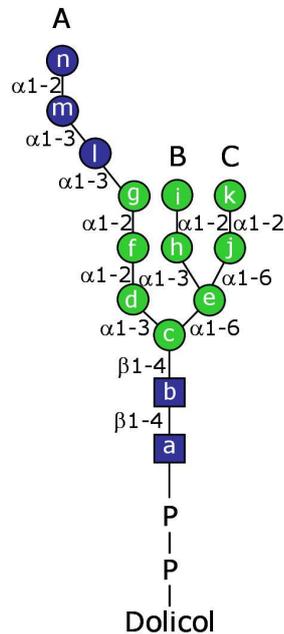
##### **4.1 Procesamiento de los oligosacáridos en las glicoproteínas**

La N-glicosilación de proteínas es una modificación fundamentalmente post traduccional que resulta en la unión covalente de un oligosacárido en un residuo

de Asn de una cadena polipeptídica.

#### ***4.1.1 Transferencia del precursor de oligosacáridos a proteínas nacientes***

El proceso de glicosilación se inicia en el RER, con la transferencia co-traduccional de un oligosacárido precursor común compuesto por 14 residuos de azúcar ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ ) desde el transportador lipídico dolicol pirofosfato (P-P-Dol, Figura 8) a un aminoácido Asn en la cadena polipeptídica. Esta reacción es catalizada por el complejo multiproteico oligosacariltransferasa (OST), el cual reconoce una secuencia específica Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina y ácido aspártico (Figura 9, reacción 1) (Knauer y Lehle, 1999a). El complejo OST, que en mamíferos está compuesto por 8 subunidades diferentes, se une al  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$ -P-P-Dol anclado en la membrana del RER de forma tal que la cadena carbohidratada se oriente hacia el lumen, y transfiere el glicano a la cadena polipeptídica naciente clivando la unión de alta energía  $\text{NAcGlc}_2$ -P, y liberando dolicol fosfato (P-Dol) en el proceso (Knauer y Lehle, 1999b; Kelleher y Gilmore, 2006).



**Figura 8:** Estructura del oligosacárido precursor. El oligosacárido precursor de las N-glicoproteínas está compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina (NAcGlc, cuadrados azules), nueve residuos de manosas (Man, círculos verdes) y tres residuos de glucosa (Glc, círculos azules). Las letras mayúsculas A, B y C indican las antenas; las letras minúsculas a-n designan cada azúcar y se usan en el texto. Se muestra en tipo de enlace entre cada residuo de azúcar (tomado y modificado de Aebi y col., 2010).

#### 4.1.2 Procesamiento de los oligosacáridos unidos al polipéptido

Inmediatamente después de su transferencia a la proteína, los tres residuos de glucosa son removidos por la acción secuencial de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa 1 y 2 (Figura 9, reacción 2 y 3). Ambas enzimas actúan en el lumen del RER; la  $\alpha$ -glucosidasa 1 remueve el residuo glucosa  $\alpha$ 1-2 terminal (glucosa n, Figura 8), y la  $\alpha$ -glucosidasa 2 actúa sobre los dos residuos internos de glucosa  $\alpha$ 1-3 (glucosas m y l, Figura 8). Posteriormente, por acción de la  $\alpha$ -manosidasa 1 del RER se remueve un residuo manosa terminal del brazo central (manosa i Figura 8 y reacción 4 Figura 9) originando la estructura  $\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2$ . El polipéptido con la cadena de carbohidratos en formación es transportado a la cisterna cis del aparato de Golgi, donde seguirá su procesamiento.

En la cisterna cis del aparato de Golgi, se produce la remoción de los tres

residuos restantes de manosas  $\alpha$ 1-2 (manosas g, f y k, Figura 8) por acción de las  $\alpha$ -manosidasas 1a, 1b y 1c para rendir el oligosacárido  $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$  (Figura 9, reacción 5). Estas tres manosidasas son isoenzimas que catalizan la misma reacción, diferenciándose entre ellas en su expresión tejido-específica y en el orden en que remueven los residuos de manosas de la estructura  $\text{Man}_8\text{NAcGlc}_2$  (Herscovics, 2001). Durante este proceso, se forman una serie de intermediarios con alto contenido en manosa con seis, siete u ocho residuos de este azúcar, aunque la estructura  $\text{Man}_5\text{NAcGlc}_2$  es la única con alto contenido en manosa encontrada en cantidades apreciables en las glicoproteínas maduras. Además esta estructura es el intermediario en la síntesis de oligosacáridos de tipo híbrido y complejos.

A continuación, la glicoproteína es transportada a la cisterna media del aparato de Golgi, donde dependiendo de las reacciones enzimáticas que ocurran pueden obtenerse dos tipos de estructuras carbohidratadas: precursores de oligosacáridos de tipo híbrido o precursores de oligosacáridos de tipo complejo.

❖ La primer reacción involucra el agregado de un residuo de N-acetilglucosamina al C-2 de la manosa  $\alpha$ 1-3 (manosa d, Figura 8). Esta reacción es catalizada por la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (Figura 9, reacción 6). El producto de esta reacción,  $\text{NAcGlcMan}_5\text{NAcGlc}_2$ , puede ser sustrato de dos enzimas diferentes, originando así los precursores de oligosacáridos de tipo complejos o precursores de oligosacáridos de tipo híbrido:

❖ Precursor de oligosacáridos de tipo complejo: el agregado del residuo  $\text{NAcGlc}$  produce un reordenamiento estérico de los residuos  $\alpha$ -manosas unidos al brazo  $\text{Man}\alpha$ 1-6 (manosas h y j, Figura 8) permitiendo que los mismos sean eliminados por las enzimas  $\alpha$ -manosidasa 2 (Tulsiani y col., 1982) o su isoenzima 2x (Chui y col, 1997) (Figura 9 reacción 7). De esta forma se origina una estructura de tipo monoantennaria que será precursora de estructuras de tipo

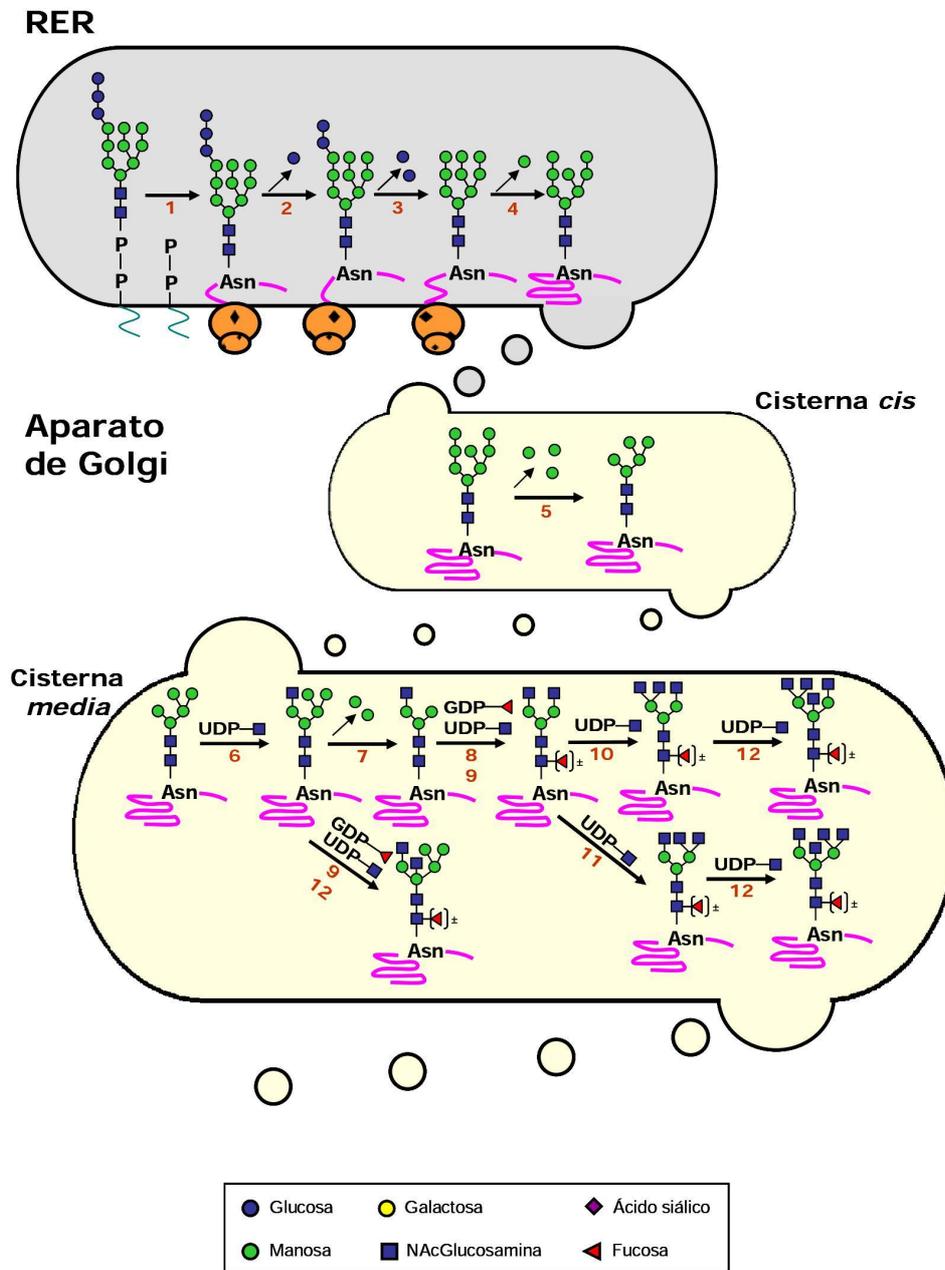
complejo, pues permitirá la incorporación de varios residuos NAcGlc por la acción sucesiva de distintas N-acetilglucosaminiltransferasas.

El primer producto es una estructura biantenaria, producida por la acción de la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa 2, que agrega un residuo NAcGlc al brazo  $\text{Man}\alpha 1-6$  (manosa e, Figura 8 y reacción 8 Figura 9). Esta misma estructura puede ser convertida en productos altamente ramificados (tri- o tetra-antenas) por la incorporación de sucesivos residuos de NAcGlc al C-4 de la manosa  $\alpha 1-3$  (residuo d, Figura 8) y/o al C-6 de la manosa  $\alpha 1-6$  (residuo e, Figura 8) mediante la acción de las N-acetilglucosaminiltransferasas 4 y 5, respectivamente (Figura 9, reacciones 10 y 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  $\beta$ -manosa del *core* (manosa c, Figura 8 y reacción 12 Figura 9), reacción catalizada por la N-acetilglucosaminiltransferasa 3. La presencia de este residuo bisectado de NAcGlc inhibe la acción posterior de las N-acetilglucosaminiltransferasas 2, 4 y 5 en ensayos *in vitro*; sin embargo, se pueden encontrar estructuras bi-, tri- y tetra-antenas bisectadas cuando la N-acetilglucosaminiltransferasa 3 actúa después de las otras N-acetilglucosaminiltransferasas (2, 4 y 5).

❖ Precursor de oligosacáridos de tipo híbrido: Se producen si la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa 3 (Figura 9 reacción 12) agrega un residuo NAcGlc por unión  $\beta 1-4$  al residuo interno de manosa  $\beta 1-4$  del core (manosa c, Figura 8). Esta transferencia impide que la enzima  $\alpha$ -manosidasa 2/2x elimine los dos residuos terminales de manosas del brazo  $\text{Man}\alpha 1-6$  (manosas h y j, Figura 8), de forma que estos residuos de manosas estarán presentes en la glicoproteína madura. El otro brazo puede continuar su elongación en la cisterna trans del aparato de Golgi, con la incorporación de residuos de galactosa y ácido siálico.

Por otro lado, en la cisterna media del aparato de Golgi también se encuentra la enzima fucosiltransferasa 8 (Fut8) que agrega fucosa al residuo NAcGlc unido a la Asn (Longmore y Schachter, 1982) (Figura 9, reacción 9).



**Figura 9:** Biosíntesis de N-glicoproteínas I. Se muestra el proceso de glicosilación de proteínas en el RER y en los compartimentos cis y medio del aparato de Golgi. 1) Oligosacariiltransferasa; 2 y 3)  $\alpha$ -glucosidasa 1 y 2; 4)  $\alpha$ -manosidasa 1 del RER; 5)  $\alpha$ -manosidasas 1a, 1b y 1c; 6) N-acetilglucosaminiltransferasa 1; 7)  $\alpha$ -manosidasa 2; 8) N-acetilglucosaminiltransferasa 2; 9) fucosiltransferasa; 10) N-acetilglucosaminiltransferasa 4; 11) N-acetilglucosaminiltransferasa 5; 12) N-acetilglucosaminiltransferasa 3.

#### ***4.1.3 Elongación de las cadenas carbohidratadas por el agregado de azúcares terminales***

La etapa final en la síntesis de los oligosacáridos complejos, que ocurre en la cisterna trans del aparato de Golgi, consiste en la adición de galactosa, N-acetilgalactosamina, ácido siálico y/o sulfato.

Cada residuo NAcGlc perteneciente a cualquiera de las estructuras que se muestran en la Figura 9 puede ser aceptor de un residuo galactosa a través de una unión  $\beta$ 1,4 por acción de la enzima galactosiltransferasa (Figura 10, reacción 13). Finalmente, las enzimas responsables de la adición de ácido siálico a las cadenas de oligosacáridos, la sialiltransferasas, incorporan un residuo de ácido siálico al residuo galactosa terminal (Figura 9, reacción 14).

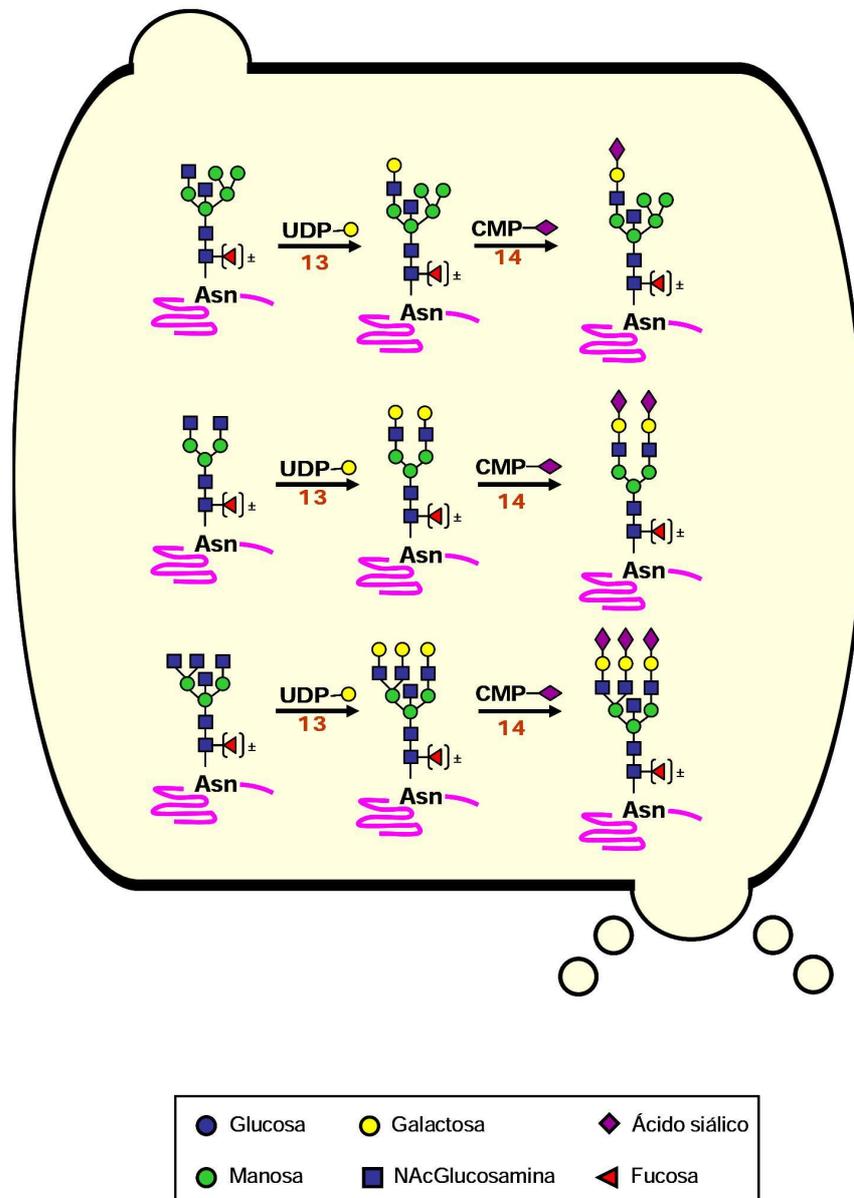


Figura 10: Biosíntesis de N-glicoproteínas II. Se muestra el proceso de elongación de las cadenas oligosacáridas en la cisterna *trans* del aparato de Golgi. 13) galactosiltransferasa; 14) sialiltransferasa.

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). Por lo tanto, la

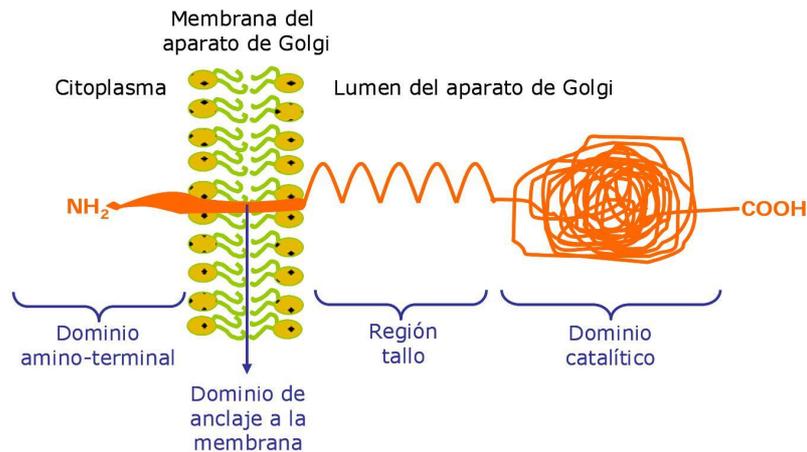
presencia de oligosacáridos sulfatados depende de la acción de la enzima N-acetilgalactosaminiltransferasa; esta enzima es proteína-específica, ya que reconoce una secuencia consenso en la cadena polipeptídica a la cual está unido el oligosacárido (Smith y Baenziger, 1992). Curiosamente, esta secuencia se encuentra presente en la subunidad  $\alpha$  de gonadotrofinas, en la subunidad  $\beta$  de LH y en la subunidad  $\beta$  de CG, por lo que la LH y la gonadotrofina coriónica humana (hCG) poseen oligosacáridos sulfatados. Sin embargo, la FSH humana (FSHh) posee predominancia de oligosacáridos con ácido siálico terminal (Baenziger y Green, 1988) debido a que la secuencia aminoacídica reconocida por la N-acetilgalactosaminiltransferasa no se encuentra presente en la subunidad  $\beta$  de FSHh, y a que los oligosacáridos de la subunidad  $\beta$  influyen en el procesamiento de los oligosacáridos de su subunidad  $\alpha$  unida, de forma que la subunidad  $\alpha$  de FSH no posee oligosacáridos sulfatados (Smith y Baenziger, 1990).

#### **4.2 Glicosidasas y glicosiltransferasas**

Las enzimas que actúan en la biosíntesis de N-glicanos pueden clasificarse en dos grandes grupos: glicosidasas y glicosiltransferasas. El primer grupo comprende aquellas enzimas que remueven monosacáridos para formar los intermediarios que serán sustrato de las distintas glicosiltransferasas. Un ejemplo de estas enzimas son las glucosidasas y manosidasas que actúan en el RER y en la cisterna cis del aparato de Golgi removiendo los residuos de glucosas y manosas del oligosacárido precursor. El segundo grupo comprende las enzimas que catalizan la transferencia de un hidrato de carbono a un glicano aceptor, el que generalmente está covalentemente unido a una proteína o un lípido.

#### 4.2.1 Estructura y función de las glicosidasas y glicosiltransferasas

En la Figura 11 se muestra un diagrama de la estructura de las glicosiltransferasas.



**Figura 11:** Estructura de las glicosiltransferasas. Se muestra un diagrama de una glicosiltransferasa con su típica estructura transmembrana tipo II. Se observa el dominio amino-terminal corto hacia el citosol, el dominio de anclaje a la membrana, la extensa región tallo, y el dominio catalítico globular en el extremo carboxilo-terminal.

Estas enzimas tienen una estructura correspondiente a proteínas transmembrana tipo II: poseen un dominio amino-terminal corto ubicado hacia el citoplasma (también llamado cola citoplasmática), un dominio de anclaje en la membrana, una región tallo y un dominio catalítico globular en el extremo carboxilo-terminal, el cual está ubicado hacia el lumen del aparato de Golgi (Paulson y Colley, 1989).

La reacción general catalizada por las glicosiltransferasas se muestra en la Figura 12. El carbohidrato transferido por cada enzima es cedido por un nucleótido de azúcar de alta energía, que es sintetizado en el citoplasma y debe ser transportado al lumen del aparato de Golgi. Este transporte se realiza a través de transportadores de nucleótidos de azúcar (Berninsone y Hirschberg, 2000).



**Figura 12:** Esquema de la reacción catalizada por las glicosiltransferasas (tomado y modificado de Rini y col., 2009).

La especificidad de las glicosiltransferasas es definida no sólo por el azúcar que transfiere sino también por la estructura del aceptor y el tipo de enlace glicosídico formado.

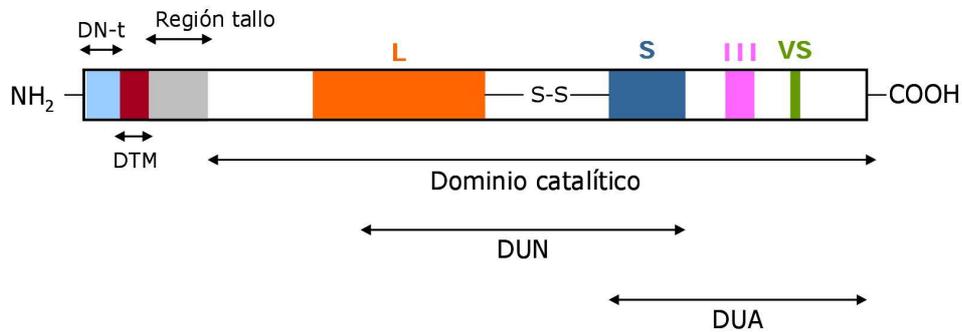
Cada glicosiltransferasa transfiere un azúcar a un aceptor específico generado por otra glicosiltransferasa, por lo tanto, debe actuar en un estadio particular de la vía de glicosilación. En consecuencia, las glicosiltransferasas deben estar correctamente localizadas en las distintas cisternas del aparato de Golgi.

#### **4.2.2 Sialiltransferasas**

Las sialiltransferasas<sup>1</sup> son glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de ácido siálico desde el nucleótido de azúcar citidina monofosfato (CMP-AS) a una variedad de moléculas aceptoras, usualmente estructuras que terminan en galactosa, N-acetilgalactosamina, u otro ácido siálico.

Al igual que las demás glicosiltransferasas, todas las sialiltransferasas tienen una topología de proteínas transmembrana tipo II (Figura 13). En el dominio catalítico, se encuentran cuatro regiones altamente conservadas llamadas "sialilmotifs" o motivos de ácido siálico, que comprenden el motivo L ("long-sialilmotif"), S ("short-sialilmotif"), III y VS ("very short-sialilmotif"). Un puente disulfuro estabiliza los motivos L y S (Datta y col., 2001).

<sup>1</sup> La nomenclatura usada en la presente Tesis para las sialiltransferasas es la propuesta por Tsuji y col. (1996).



**Figura 13:** Representación esquemática de las sialiltransferasas. Se muestran los dominios N-terminal (DN-t), transmembrana (DTM) y la región tallo. El resto corresponde al dominio catalítico, que contiene los cuatro motivos de ácido siálico (L, S, III y VS). Se marca la posición del dominio de unión al nucleótido (DUN), que abarca los motivos L y S; y del dominio de unión al aceptor (DUA) que abarca los motivos S, III y VS. Se observa un puente disulfuro entre los motivos L y S (tomado y modificado de Datta 2009).

Hasta el momento, se han caracterizado alrededor de 20 sialiltransferasas, las que se clasifican en cuatro grupos según el tipo de enlace formado y la naturaleza del aceptor (Harduin-Leppers y col., 2001 y 2005).

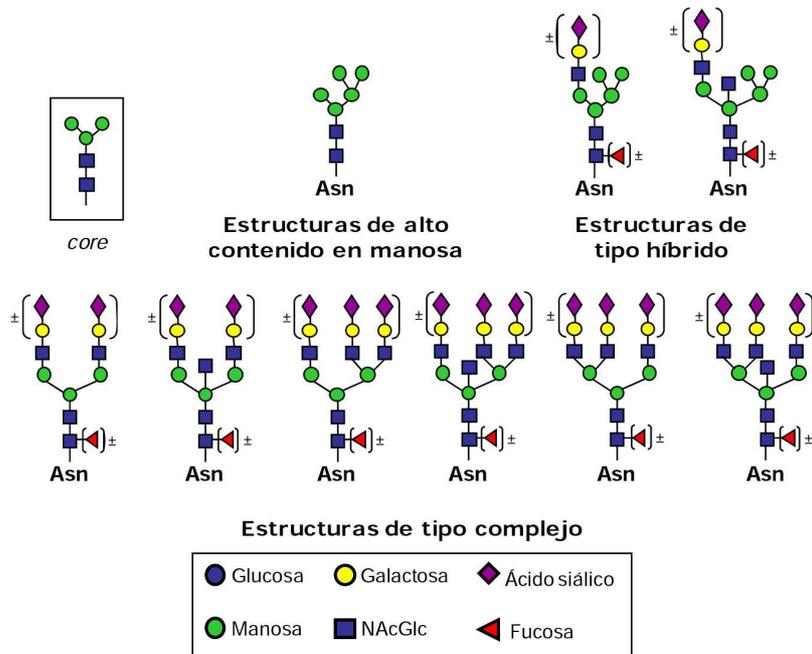
En el caso particular de la FSH, la adición de los residuos de ácido siálico la realizan dos enzimas, la ST3GAL3 y la ST6GAL1, ya que esta hormona posee las estructuras oligosacáridas  $AS_{\alpha 2-3}Gal\beta 1-3/4NAcGlc$  y  $AS_{\alpha 2-6}Gal\beta 1-3/4NAcGlc$  terminales (Baenziger y Green 1988), que son sustratos de estas sialiltransferasas.

#### 4.3 Estructura de los oligosacáridos presentes en la FSH

Los carbohidratos constituyen una parte importante de la molécula de FSH ya que representan entre el 20 y 30 % de su peso molecular. Las diferencias en la estructura y composición de los oligosacáridos unidos a la cadena peptídica origina la heterogeneidad molecular característica de estas hormonas.

La estructura molecular de la porción carbohidratada de la FSH hipofisaria humana ha sido determinada por Renwick y col. (1987), y Baenziger y Green (1988). Los oligosacáridos unidos a la molécula de FSH pueden clasificarse en tres

grandes categorías: estructuras de alto contenido en manosa, estructuras de tipo híbrido, y estructuras de tipo complejo (Figura 7).



**Figura 7:** Estructura de los distintos oligosacáridos presentes en la molécula de FSFhh. Se muestra la estructura de los oligosacáridos con alto contenido en manosa, de tipo híbrido, y de tipo complejo. Los residuos indicados entre corchetes (galactosa, ácido siálico y/o fucosa) pueden o no estar presentes.

Todas comparten un *core* común, formado por la estructura  $\text{Man}\alpha\text{1-3}(\text{Man}\alpha\text{1-6})\text{Man}\beta\text{1-4NAcGlc}\beta\text{1-4NAcGlc-Asn}$ , pero difieren en las antenas exteriores.

- ❖ Estructuras de alto contenido en manosa: no han completado las etapas de remoción e incorporación de nuevos azúcares en la cisterna media del aparato de Golgi. Poseen entre 2 y 6 residuos manosa unidos a las manosas del *core*.

- ❖ Estructuras de tipo híbrido: no han completado las etapas de remoción e incorporación de nuevos azúcares. Combinan las características estructurales de los oligosacáridos con alto contenido en manosa y complejos. Poseen una antena con un número variable de residuos manosa unidos a la  $\text{Man}\alpha\text{1-6}$  del *core*; mientras que la otra antena posee la estructura típica de las cadenas complejas,

con N-acetilglucosamina y pueden o no haber incorporado galactosa y ácido siálico. La mayoría de los oligosacáridos de tipo híbrido contienen un residuo de NAcGlc "bisectado", unido por enlace  $\beta$ 1-4 al residuo  $\beta$ -Man del *core*.

❖ Estructuras de tipo complejo: han sido completamente procesadas en todas las cisternas del aparato de Golgi y tienen mayor variación estructural. Presentan un número variable de cadenas unidas a las  $\alpha$ -Man del *core*, formadas por residuos de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. El número de antenas es variable. Cada antena puede contener la estructura completa (N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico) ó estructuras intermedias terminando en galactosa ó NAcGlc. Por otro lado, se pueden encontrar residuos sustituyentes unidos al *core*, contribuyendo a la variación estructural de estos oligosacáridos complejos. Pueden incorporar un residuo de NAcGlc "bisectado" unido por enlace  $\beta$ 1-4 al residuo  $\beta$ -Man del *core*, o un residuo fucosa $\alpha$ 1-6 unido al residuo NAcGlc más interno del *core*. Estos residuos sustituyentes pueden o no estar presentes.

#### **4.4 Implicancia de los oligosacáridos en la regulación de la actividad biológica de la FSH**

Los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas poseen un papel fundamental en determinar las características físico-químicas y biológicas de las moléculas. Participan tanto en el plegado, ensamblaje, heterodimerización y estructura conformacional de la hormona, como en determinar el tiempo de permanencia en circulación, la interacción con el receptor específico y la activación de la señal de transducción (Ulloa-Aguirre y col., 2009).

En particular, estudios realizados *in vitro* han demostrado que los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH son fundamentales para su actividad biológica ya que la hormona deglicosilada químicamente mantiene su capacidad de unión al receptor pero es completamente inactiva para estimular la

producción de AMPc (Sairam y Manjunath, 1982; Manjunath y col., 1982).

Numerosos estudios muestran que las distintas variantes glicosiladas de FSH presentan diferencias en su actividad biológica (Ulloa-Aguirre y col., 1992; Timossi y col., 2000; Barrios de Tomasi y col., 2002). Como se mencionó anteriormente, el ácido siálico, residuo terminal de las cadenas de carbohidratos de la molécula de FSH, está directamente involucrado en regular su tasa de depuración plasmática (vida media o tiempo de permanencia en circulación) (Morell y col., 1971) y, en consecuencia, su actividad biológica *in vivo*. Se ha demostrado que las glicoproteínas a las que se les han removido todos los residuos de ácido siálico reducen drásticamente su tiempo de permanencia en circulación cuando se compara con las formas nativas, debido a que son removidas de la circulación por un receptor específico presente en el hígado, que reconoce los residuos expuestos de galactosa (Ashwell y Harford, 1982). A este receptor se lo conoce como el receptor hepático para asialoglicoproteínas (ASGP-R). El ácido siálico actúa por enmascaramiento, encubre los residuos de galactosa evitando que éstos sean reconocidos por el ASGP-R. En consecuencia, las glicofomas con mayor contenido de ácido siálico permanecen más tiempo en circulación (Wide, 1986; Ulloa-Aguirre y col., 1992).

El ácido siálico también modula la biopotencia *in vitro* de la hormona, ya que su presencia disminuye la afinidad de unión de la FSH a su receptor (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982; Ulloa-Aguirre y col., 1992; Cerpa-Poljak y col., 1993). En consecuencia, las variantes de glicosilación más sializadas presentan una menor afinidad por el receptor de membrana y producen una menor respuesta biológica en las células blanco (Zambrano y col., 1999; Timossi y col., 2000).

El efecto biológico del grado de sialización de la FSH ha sido estudiado *in vitro*. Utilizando como modelo experimental el cultivo de folículos intactos aislados de ratón, se ha demostrado que variantes glicosiladas de FSH fraccionadas de

acuerdo a su punto isoeléctrico (pI, determinado principalmente por el contenido de ácido siálico) y mezclas de estas variantes, producen diferentes patrones de desarrollo folicular. Así, las variantes glicosiladas de FSH con menor grado de sialización son más bioactivas debido a que inducen un mayor crecimiento de los folículos preantrales a expensas de un incremento en el número de células de la granulosa, rápida formación del antro y temprana producción de estradiol. Sin embargo, dosis altas de estas variantes glicosiladas pueden tener efectos negativos, que son evitados cuando se cultivan los folículos con una mezcla de variantes con distinto pI (Vitt y col., 1998; Nayudu y col., 2002). Estos datos sugieren que se requieren diferentes formas de FSH para lograr el crecimiento y la maduración folicular, de tal manera que cada mezcla de variantes de FSH circulante conduciría a un patrón característico de desarrollo folicular. La heterogeneidad molecular de FSH puede representar entonces un mecanismo fisiológico a través del cual se regula la potencia del estímulo gonadotrófico (Ulloa-Aguirre y col., 2001).

El grado de ramificación y la composición de las cadenas de carbohidratos también modulan la actividad biológica de la FSH (Rulli y col., 1999; Creus y col., 2001). Más recientemente, se ha observado que glicofomas de FSH con diferente estructura en sus cadenas de carbohidratos tienen la capacidad de generar respuestas diferenciales tanto en un cultivo primario de células de granulosa de rata (Loreti y col., 2013a), como en una línea celular de granulosa humana (Loreti y col., 2013b).

Las diferentes variantes de glicosilación de la FSH tendrían, a su vez, la capacidad de utilizar distintos caminos de transducción de señales. Se ha propuesto que dependiendo de la estructura de los oligosacáridos, FSH puede permitir y/o estabilizar conformaciones distintas del complejo hormona-receptor que capaciten al receptor para activar efectores y cascadas de transducción

determinadas y de este modo promover distintas respuestas biológicas (Ulloa-Aguirre y col., 1999 y 2003). Estudios realizados en cultivos celulares que expresan un único tipo de receptor, han demostrado que variantes de FSH menos sializadas inducen de manera más efectiva caminos de señalización intracelulares mediados por proteínas Gs (Zambrano y col., 1999). Por otro lado, variantes de origen hipofisario deglicosiladas o moléculas de FSH recombinante con alto contenido en manosa activarían selectivamente proteínas  $G\alpha_i$ , mientras que moléculas de hormona nativa no activan este tipo de proteína G (Arey y col., 1997). Asimismo, la FSH puede inducir aumento de calcio y activación de la vía PI3K/PKB en células de la granulosa (Flores y col., 1990; Zeleznik y col., 2003; Wayne y col., 2007) por mecanismos que son independientes de PKA.

#### **4.5 Cambios en la microheterogeneidad molecular de FSH en condiciones fisiológicas y patológicas**

Numerosos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* en animales experimentales y en humanos, muestran que el entorno hormonal regula la microheterogeneidad molecular de FSH y, en consecuencia, su potencia biológica. Esta regulación se ejerce tanto a nivel del grado de sialización como de la complejidad de los oligosacáridos unidos a la cadena polipeptídica.

Las primeras evidencias que describieron cambios en la microheterogeneidad molecular de 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 edad, coincidentemente con una elevación significativa del contenido de GnRH hipotalámico, se incrementaba en la hipófisis la proporción de glicoformas de FSH con menor grado de sialización. Estos resultados sugieren que los cambios en la microheterogeneidad molecular de FSH estarían regulados por la acción del GnRH. Por otro lado, Kennedy y Chappel (1985) fueron pioneros

al describir que la testosterona aumenta el grado de sialización de la FSH secretada por células hipofisarias de ratas macho en cultivo. Resultados similares se describieron *in vivo* al observar el aumento en el grado de sialización de la FSH hipofisaria en ratas adultas respecto de las inmaduras (Ulloa-Aguirre y col., 1986). Este efecto fue atribuido a los andrógenos, ya que al eliminar la acción de los mismos utilizando la castración o la administración de antiandrógenos disminuye el grado de sialización de la gonadotropina (Robertson y col., 1982; Ulloa-Aguirre y col., 1986; Simoni y col., 1992).

La regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de FSH también ha sido descrita en la rata hembra. Damián-Matsumura y col. (1999) han demostrado que los estrógenos inhiben la expresión del ARNm de la sialiltransferasa *St3gal3* hipofisaria en ratas hembras. Estos resultados sugieren que los esteroides sexuales regularían la expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias, afectando así el grado de sialización de esta gonadotropina.

En el hombre, diversos estudios reportan variaciones en la microheterogeneidad molecular de la FSH durante el desarrollo puberal (Phillips y col., 1997; Olivares y col., 2004).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se han observado cambios, tanto en el grado de sialización como en la complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH circulante durante el desarrollo puberal masculino (Campo y col., 2007). En la pubertad temprana, se observó un predominio de hormona con alto grado de sialización y baja bioactividad (Tabla 1). En la pubertad media se produce un aumento transitorio en la proporción de gonadotropina con menor grado de sialización; esta hormona presenta una alta bioactividad *in vitro*. Cuando el desarrollo puberal se ha completado, se produce una disminución de la heterogeneidad de la hormona, la cual presenta un alto grado de sialización. Esta FSH posee una bipotencia similar a la observada en la

pubertad temprana.

**Tabla 1:** Caracterización de la microheterogeneidad molecular de FSH circulante durante el desarrollo puberal masculino

	<i>Pubertad temprana</i>	<i>Pubertad media</i>	<i>Pubertad avanzada</i>
<i>Grado de sialización</i>	41% intervalo de pH 3.5-4.0	40% intervalo de pH 4.0-4.5	56% intervalo de pH 4.0-4.5
<i>Grado de complejidad</i>	61%	54%	77%
<i>Bioactividad</i>	baja	alta	baja

Grado de sialización: se muestra el intervalo de pH en el que se aísla la mayor proporción de hormona. Grado de complejidad: se muestra la proporción de glicofomas de FSH sérica con oligosacáridos de tipo complejo. Bioactividad: evaluada en base a la producción de estradiol en un cultivo de células de Sertoli inmaduras. Tomado y modificado de Campo y col. (2007).

Cuando se analizó la FSH considerando el grado de complejidad de los oligosacáridos, se observó que durante el desarrollo puberal se produce un aumento progresivo de la proporción de glicofomas de FSH con oligosacáridos con alto grado de complejidad. Concomitantemente, disminuyó la proporción de glicofomas de FSH con oligosacáridos que no han completado su procesamiento.

Los efectos del GnRH han sido demostrados tanto en cultivos de células hipofisarias de ratas hembra, en varones y mujeres normales y niñas con síndrome de Turner (Ulloa-Aguirre y col., 1992; Phillips y Wide, 1994; Wide y Albertsson-Wikland, 1990). Durante la pubertad se producen modificaciones en la pulsatilidad del GnRH que podrían afectar la microheterogeneidad molecular de FSH. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se ha observado que en todos los estadios del desarrollo puberal masculino, el estímulo agudo con GnRH produce una disminución en el grado de sialización de la hormona secretada (Ambao y col., 1999).

# ***Hipótesis y Objetivos***

## **Hipótesis**

Sobre la base de los antecedentes mencionados en la Introducción, se planteó la siguiente ***Hipótesis de trabajo***:

La regulación de la función de la gonada masculina incluye la acción de diferentes mezclas de variantes glicosiladas de FSH. El entorno hormonal regularía el grado de sialización de los oligosacáridos presentes en esta gonadotropina a nivel de la expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias. A su vez, el grado de sialización de la FSH modularía la actividad endocrina de la célula blanco en la gonada masculina.

Para validar esta hipótesis se realizaron estudios clínicos y se utilizaron modelos experimentales seleccionados especialmente para este fin.

## **Objetivo General**

El objetivo general de la presente Tesis fue determinar la regulación hormonal y el mecanismo por el cual se producen cambios en el grado de sialización de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH y su posible implicancia fisiológica sobre la regulación de la función testicular.

## **Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1) Determinar el efecto de la ausencia de función testicular desde etapas tempranas de la vida sobre el grado de sialización de la FSH sérica y su regulación hormonal.

2) Determinar el efecto de la castración y de la acción de andrógenos y GnRH sobre el grado de sialización de la FSH hipofisaria en ratas macho.

3) Determinar el mecanismo de regulación hormonal de sialiltransferasas a nivel molecular.

4) Determinar el posible efecto diferencial del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endocrina de la célula de Sertoli.

# ***Materiales y Métodos***

## **Materiales y métodos**

### **1. Drogas y reactivos**

El análogo de GnRH, Luteolibarina<sup>®</sup>, fue provisto por Laboratorios Elea (Buenos Aires, Argentina); el enantato de testosterona, Testoviron<sup>®</sup> Depot, por Bayer (Leverkusen, Alemania); la ketamina y la xilasina fueron adquiridas en Holliday-Scott S.A (Buenos Aires, Argentina). El antagonista de GnRH, Acyline, fue gentilmente cedido por la Dr. Diana Blithe (NIH/NICHD, USA). El propionato de testosterona (PT) fue adquirido en Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

La FSH hipofisaria humana (FSHhh, NIAMDD-hFSH-2), la FSH recombinante humana (FSHrh, AFP8468A), los estándares de referencia de FSH, LER 907 y rat-FSH-RP-2, los estándares de FSH utilizados para la marcación, hFSH-I-SIAFP-2 y rat-FSH-I-9 y los anticuerpos de FSH, anti-hFSH-6 y anti-ratFSH-S-11, fueron provistos por el National Hormone & Peptide Program, NIDDK (Bethesda, MD, USA). El anticuerpo anti-IgG de conejo fue provisto por el Dr. Enriori (Buenos Aires, Argentina).

Las membranas de celulosa para diálisis, los anfolitos (Pharmalyte, con rango de pH 3.5-10 y 2.5-5), el  $\alpha$ D-glucopiranosido y el metil  $\alpha$ D-manopiranosido fueron obtenidos en Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA). La lectina Concanavalina A (Con-A) conjugada a Sepharosa 4B, el detergente CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano sulfonato) y las columnas utilizadas para purificar la FSH marcada (Sephadex G-25, PD-10), fueron adquiridos en GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia). Las membranas concentradoras Centriprep, con un tamaño de poro de 10.000 fueron provistas por Amicon (Beverly, MA, USA).

El dietilpirocarbonato (DEPC) y la agarosa fueron provistos por GE Healthcare Bio-Sciences AB, (Uppsala, Suecia). El reactivo Trizol<sup>®</sup>, la transcriptasa reversa

SuperScript® II, los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el inhibidor recombinante de ribonucleasas (RNase OUT Inhibitor), la Taq ADN polimerasa, el marcador de pares de bases (100-bp DNA ladder) y el bromuro de etidio fueron provistos por Invitrogen by Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Los cebadores fueron adquiridos en Promega, Biodynamics (Buenos Aires, Argentina). El reactivo RNAlater® Solution, la ADNasa I recombinante (DNA-free™) y el MOPS (3-N[Morpholino] Propane Sulfonic Acid) fueron adquiridos en Ambion®-Life Technologies™ (Carlsbad, CA, USA).

El anticuerpo anti-FSH (IgG de ratón) y el sistema de revelado EnVision para inmunohistoquímica, fueron adquiridos en Dako (CA, USA).

El medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), la solución nutritiva de Ham F10, los antibióticos penicilina y anfotericina B fueron suministrados por Gibco® by Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA). La seroalbúmina bovina (BSA), la insulina, la transferrina y el ácido ascórbico fueron obtenidos en Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

El estradiol radiactivo [6,7-<sup>3</sup>H(N) estradiol] (actividad específica 49.7 Ci/mmol) y la testosterona [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N) testosterona] (actividad específica 80.4 Ci/mmol) fueron provistos por Perkin Elmer NEN® (Boston, USA). La solución centelleadora Optiphase Hisafe 3 fue provista por Perkin Elmer (Boston, USA). Los esteroides no radioactivos utilizados en los radioinmunoensayos se adquirieron en Steraloids Inc. (Wilton, USA). El anticuerpo anti-estradiol fue adquirido en Immunocorp (Montreal, Canadá) y el anticuerpo anti-testosterona (testosterone-7- $\alpha$ -butirato-BSA) en Medicorp (Montreal, Canadá). Los antisueros anti-ST3GAL 3 y anti-ST6GAL1 fueron gentilmente cedidos por el Dr. E. Berger (Universidad de Zurich, Suiza) y el Dr. J. Paulson (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), respectivamente.

Las placas adsorbidas con los anticuerpos monoclonales para la detección de

inhibina B y subunidad  $\alpha$  de inhibinas (C5, R1 e INPRO), los anticuerpos de detección (R1 acoplado a fosfatasa alcalina) y el kit amplificador para enzimoimmunoensayo (ELISA) fueron provistos por Oxford Bio-Innovation Ltd. (Oxfordshire, Inglaterra). La inhibina B recombinante humana utilizada como estándar para la determinación del péptido dimérico fue adquirida en Genentech (San Francisco, CA, USA). Para la cuantificación de subunidad  $\alpha$  de inhibinas se utilizó una preparación que alcanza un 75 % de pureza para Pro- $\alpha$ C preparada a partir de fluido folicular humano.

Todos los reactivos empleados para la preparación de soluciones fueron de calidad analítica o del mayor grado de pureza disponible.

## **2. Pacientes anórqidos prepuberales y puberales**

Las características de nuestro Centro nos permiten acceder al estudio de pacientes con diferentes patologías reproductivas los cuales son derivados desde otros Centros de Salud a la División de Endocrinología del Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez.

Para determinar el efecto de la ausencia de gonada desde etapas tempranas de la vida, se estudiaron las características de la microheterogeneidad molecular de la FSH sérica en pacientes anórqidos.

Se incluyeron en este estudio 13 pacientes; ocho de ellos en edad prepuberal los cuales fueron estudiados en condiciones basales y luego de la administración de una dosis única del análogo GnRH (100  $\mu$ g). Cinco pacientes en edad puberal fueron estudiados en condiciones basales y luego de la administración de enantato de testosterona; en este caso las dosis fueron variables de acuerdo a la edad del paciente (entre 25 y 100 mg). Estos tratamientos fueron realizados para evaluar la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en el grupo prepuberal y para

mantener los caracteres sexuales secundarios masculinos en los pacientes puberales.

El diagnóstico de anorquia fue realizado mediante un examen clínico en el cual se comprobó la ausencia de gonadas por palpación, la falta de respuesta testicular a la estimulación aguda con hCG y confirmado por exploración quirúrgica.

La etiología de la anorquia fue torsión intrauterina bilateral o unilateral con atrofia testicular postquirúrgica por corrección de la criptorquidia en el testículo contralateral.

Los sueros fueron conservados en la seroteca de la División de Endocrinología del Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sin identificación y almacenados por patología y por pruebas funcionales. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez.

### **3. Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, mantenidas en condiciones de humedad y temperatura controladas, con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, a las cuales se les suministró una dieta balanceada y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales *in vivo* fueron realizados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental de la Ciudad de Buenos Aires (IBYME-CONICET), respetándose en todo momento las reglas de la "Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, USA); los procedimientos fueron supervisados por la Comisión del Bioterio del IBYME.

#### **3.1 Diseño experimental**

Con el objetivo de estudiar el efecto de los cambios en el entorno hormonal

sobre las características de la microheterogeneidad de la FSH y la expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias se utilizaron animales en las siguientes condiciones fisiológicas y experimentales:

- ✓ *Para analizar los cambios durante el desarrollo sexual:* ratas macho de 15, 23 y 60 días de edad.
- ✓ *Para determinar el efecto de la castración:* se utilizaron ratas macho adultas sacrificadas a los 2, 5, 10 y 20 días posteriores a la castración.
- ✓ *Para evaluar el efecto de factores regulatorios:* se administraron andrógenos y/o un antagonista de GnRH a ratas adultas castradas.

Los animales se dividieron en 5 grupos: i) intactas (C); ii) castrado (Cx); iii) castrado + propionato de testosterona (Cx+PT); iv) castrado + antagonista de GnRH (Cx+antGnRH); v) castrado + PT + antagonista GnRH (Cx+PT+antGnRH). El tiempo de castración se definió según los resultados obtenidos en los experimentos realizados para determinar los periodos castración que se considerarían en este estudio.

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina:xilasina (80 mg/kg peso y 10 mg/kg peso, respectivamente); la castración bilateral se realizó por vía escrotal, manteniendo intactos los epidídimos. Los animales del grupo C fueron sometidos a operación simulada.

Los tratamientos hormonales se iniciaron inmediatamente luego de la castración. Se inyectó 0.250 mg de PT durante dos días consecutivos por vía subcutánea disuelto en aceite de maíz (volumen máximo 0.2 mL) y/o una dosis única (2 mg/kg de peso) del antagonista de GnRH Acyline (Porter y col., 2006). Los grupos C y Cx fueron inyectados con vehículo.

Todos los grupos de animales se sacrificaron por decapitación entre las 9 y las 11 h de la mañana y se recolectó sangre troncal para la obtención de suero. Las hipófisis fueron disecadas y congeladas inmediatamente en hielo seco ó inmersas

en RNAlater<sup>®</sup>, según su uso, y posteriormente fueron almacenadas a -80°C ó a -20°C, respectivamente, hasta el momento del procesamiento.

Para analizar los posibles cambios en la microheterogeneidad molecular de la FSH y en la expresión de las sialiltransferasas hipofisarias durante el desarrollo sexual, se utilizaron animales de 15 (n=30), 23 (n=30) y 60 días de edad (n=6).

### **3.2 Obtención de los citosoles de hipófisis**

Se obtuvo la fracción soluble a partir de los homogenatos de tejido hipofisario correspondientes a cada condición experimental por ultracentrifugación según la metodología descrita por Rulli y col. (1996). Brevemente, las hipófisis fueron pesadas y homogeneizadas en 1.2 mL de solución reguladora fosfato salina (PBS; 10 mM, pH 7.4) con un homogeneizador manual de vidrio-teflón. Todo el proceso se realizó en frío. Los homogenatos se ultracentrifugaron a 100000xg durante 1 h (centrífuga Sorvall CombiPlus, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Los sobrenadantes (citosoles) fueron separados, divididos en alícuotas y congelados a -80°C hasta su posterior procesamiento. Las hipófisis provenientes de animales adultos fueron procesadas combinando dos glándulas por grupo, mientras que las provenientes de animales de 15 y 23 días de edad se combinaron en grupos de 10 hipófisis para alcanzar la cantidad de FSH necesaria para el análisis posterior.

### **3.3 Obtención de los sueros**

La sangre recolectada se colocó a 4°C durante 30 min para la formación del coágulo, y se centrifugó a 1200xg durante 10 min. Se separó el suero y se guardaron alícuotas a -20°C para ser utilizadas posteriormente en las distintas determinaciones hormonales.

## **4. Aislamiento de variantes glicosiladas de FSH**

El aislamiento de variantes glicosiladas de FSH se realizó por utilizando las metodologías de isoelectroenfoque (IEF) preparativo y cromatografía de afinidad en Con-A. Se utilizaron estas metodologías para aislar variantes glicosiladas de FSH a partir de sueros humanos de pacientes anórquidos, hipófisis de ratas en distintas condiciones experimentales, una preparación altamente purificada de hipófisis humana y FSHrh.

### **4.1 FSH sérica humana**

Los sueros a analizar por IEF preparativo y cromatografía en Con-A fueron dializados para disminuir la fuerza iónica y adecuarla a las condiciones de las metodologías. Para ello, se utilizaron membranas de diálisis con un tamaño de poro de 12 kDa. La diálisis se realizó a 4°C durante 90 min, en una relación de volúmenes de 1 mL de suero: 1 L de NaCl 10 mM, realizando un cambio de la solución salina transcurridos los primeros 45 minutos.

### **4.2 FSH hipofisaria de rata**

Se utilizaron los citosoles de hipófisis de rata preparados según lo descrito en el ítem 3.2. Los mismos no requirieron diálisis previa.

### **4.3 FSH hipofisaria humana**

La FSHhh NIAMDD-hFSH-2, provista por el NIH, es una preparación altamente purificada que se utiliza como estándar en estudios de radioreceptores o en ensayos biológicos. Particularmente, se utiliza como estándar en el cultivo de células de Sertoli inmaduras descrito por Padmanabhan y col. (1987).

Se utilizó esta gonadotropina en su estado nativo para estimular las células de Sertoli en cultivo y para determinar la abundancia relativa de los análogos de carga por IEF. La cantidad disponible de esta hormona permitió realizar solamente 2 fraccionamientos independientes, sembrando en cada uno de ellos 0.010 mg.

#### **4.4 FSH recombinante humana**

Las preparaciones de variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en su grado de sialización que se utilizaron para estimular las células de Sertoli inmaduras en cultivo, fueron aisladas a partir de FSHrh (AFP8468A).

El aislamiento de los análogos de carga de FSHrh se realizó mediante la técnica de IEF. Se resuspendieron 4 ampollas de FSHrh (equivalentes a 1 mg en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2) en 1.5 mL de agua ultrapura (Barnstead NANOPure II, Thermo Fisher Scientific, MA, USA); se reservó una alícuota de 0.1 mL para la determinación de FSH por radioinmunoensayo (RIE) y el remanente se sembró en la celda de isoelectroenfoque.

#### **4.5 Isoelectroenfoque preparativo**

##### **4.5.1 Fundamento**

El ácido siálico, último residuo de la cadena carbohidratada de la FSH, le otorga carga negativa a esta hormona y determina su pI. El aislamiento de análogos de carga de FSH con distinto grado de sialización se realizó mediante la metodología de IEF preparativo, que permite la separación de proteínas de acuerdo a sus pIs, según la técnica descrita previamente por Bedecarrás y col. (1998).

Esta metodología se basa en la migración de proteínas cargadas al ser sometidas a un campo eléctrico en un gradiente de pH. Este gradiente es

establecido por anfólitos, pequeños aminoácidos con carga. Las proteínas son electrolitos débiles, es decir que poseen carga de acuerdo al pH del medio en el cual se encuentran disueltas. Cuando las proteínas cargadas son sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el polo opuesto. Al alcanzar la zona de pH en la cual su carga neta es 0 se detiene su migración (Figura 14). Aquellas proteínas/análogos de carga con mayor grado de sialización poseerán menor pI que las que presenten un menor grado de sialización.

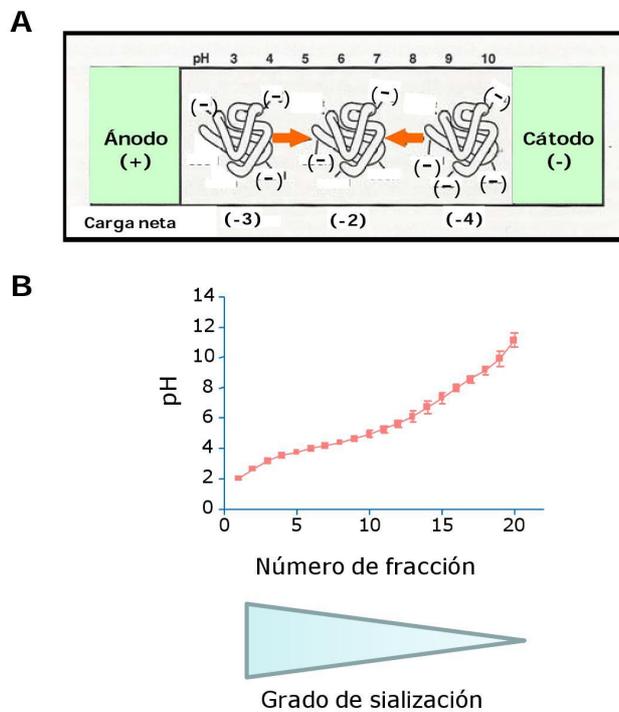


Figura 14: Separación de análogos de carga de acuerdo al punto isoeléctrico. A) Los análogos de carga migran hasta que llegan a la zona de pH en la cual tienen carga neta 0 (pI). B) A menor pI, mayor grado de sialización.

#### 4.5.2 Procedimiento

Se utilizó una celda de IEF preparativo en fase líquida (Rotofor, Bio Rad Laboratories Inc., CA, USA) con capacidad para 50 mL de muestra, una fuente de

poder de potencia constante (Power/Pac 3000, Bio Rad, Laboratories Inc., CA, USA) y un baño refrigerante (PolyScience, Niles, IL, USA).

La celda de isoelectroenfoco posee una cámara de enfoque de forma cilíndrica con una varilla cerámica de refrigeración ubicada en forma longitudinal en el centro de la misma. La cámara de enfoque está dividida en compartimientos determinados por membranas de poliéster de 10  $\mu\text{m}$  de poro, dispuestas en forma paralela, transversalmente 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 en fase líquida, conservando de esta manera la actividad biológica de la muestra analizada.

Antes de sembrar la muestra, se realizó un pre-enfoque con el objetivo de establecer el gradiente de pH y así evitar someter a las proteínas presentes en la muestra a ambientes extremos de pH. Este procedimiento se realizó llenando la cámara con 40 mL de agua ultrapura (Barnstead NANOPure II, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), una combinación de anfolitos y detergente no iónico CHAPS al 1 % P/V para los sueros o al 0.05 % P/V para los citosoles de hipófisis y la FSHhh y FSHrh. La combinación de anfolitos utilizada fue: 3 % V/V de anfolito con un rango de pH 3-10 y 0.75 % V/V de anfolito con un rango de pH 2.5-5.0. Este último anfolito se agrega con el objeto de incrementar la resolución en el intervalo de pH donde se aísla la mayor proporción de FSH. El pre-enfoque se realizó a potencia constante de 12 W durante 1 h, manteniendo siempre refrigerada la cámara. Finalizado este periodo de tiempo, se detuvo la electroforesis y se sembraron entre 0.5 y 1.5 mL de suero humano previamente dializado ó 1 mL de los citosoles de hipófisis, con el agregado de agua ultrapura, de forma tal que el volumen final en la cámara de enfoque alcance 50 mL.

Una vez sembrada la muestra, se conectó nuevamente la corriente para realizar el enfoque por un periodo de tiempo de entre 3 y 4 h, a potencia constante de 12 W, manteniendo siempre refrigerada la celda. Durante este periodo, se registraron las lecturas de intensidad de corriente cada 30 min; el enfoque se completó cuando la intensidad de corriente permanece constante durante al menos 3 registros consecutivos. Luego se procedió a cosechar las fracciones, aspirando el contenido de cada compartimento mediante un sistema de recolección simultánea. Así se recogieron 20 fracciones de 2.5 mL cada una. De cada fracción se separaron alícuotas de 100  $\mu$ L para la determinación del pH. El material remanente fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  con el agregado de 500  $\mu$ L de NaCl 4 M para evitar la interacción de los anfolitos con la proteína de interés.

La recuperación de FSH luego de completado el IEF varió entre 60 y 75 %.

#### **4.5.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por la técnica de isoelectroenfoque**

Luego de determinar el pH, las fracciones se dializaron exhaustivamente en forma individual para eliminar los anfolitos y el detergente, utilizando membranas de diálisis con un tamaño de poro de 12 kDa.

La diálisis se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , en una relación de volúmenes de 2.5 mL de muestra:1 L de solución, según el siguiente esquema de cambios:

- NaCl 1 M durante 4 h
- NaCl 1 M durante toda la noche
- NaCl 1 M durante 3 h
- Agua destilada durante 1 h
- Agua destilada durante 1 h
- NaCl 10 mM durante 1 h

Este procedimiento fue necesario para lograr la total eliminación de los

anfolitos y el detergente en las muestras, ya que los mismos interfieren en forma significativa en el RIE. Se tomaron alícuotas adecuadas de las fracciones dializadas para la posterior determinación de FSH inmunológica por RIE; todo el material fue almacenado a -80°C hasta su posterior análisis.

## **4.6 Cromatografía de afinidad en Concanavalina A**

### **4.6.1 Fundamento**

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune que poseen la capacidad de aglutinar células y precipitar oligosacáridos complejos. La cromatografía de afinidad en lectinas constituye un método simple para el fraccionamiento de variantes moleculares de una glicoproteína con diferentes estructuras en sus cadenas carbohidratadas. Se basa en la interacción de azúcares presentes en el oligosacárido, unido a la cadena polipeptídica, con una secuencia específica de la lectina.

La Con-A ha sido ampliamente usada para la separación de glicofomas 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 col. (1979):

- NR: no retenidas por la lectina, que corresponden a polipéptidos con cadenas de carbohidratos muy ramificadas y cadenas biantenarias complejas con un



con solución de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.5 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.4).

En la Figura 16 se muestra el esquema de elución utilizado en la cromatografía.

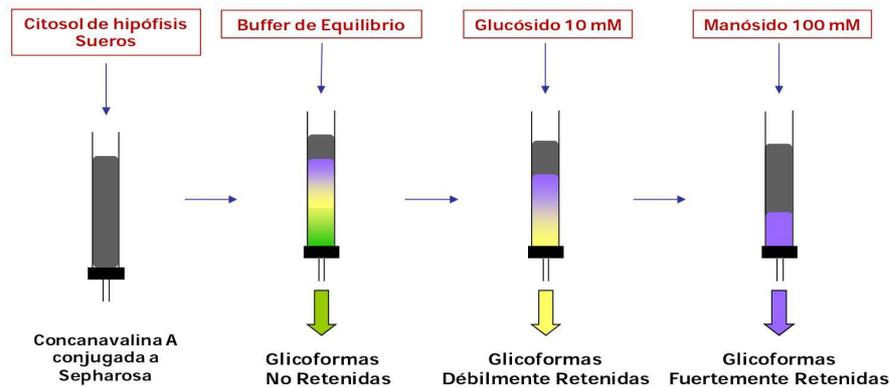


Figura 16: Esquema del procedimiento de la cromatografía de afinidad en Con-A.

El volumen de suero sembrado en la columna y las distintas etapas de elución fueron determinadas previamente utilizando glicoproteínas con estructuras de carbohidratos conocidas, como se describió en Creus y col. (1996).

Se sembraron 0.35 mL de suero de los pacientes previamente dializado ó 0.6 mL de los citosoles de hipófisis. Se permitió que el material ingrese en la columna y se añadieron 0.5 mL de solución de equilibrio. Se interrumpió el flujo durante 30 min para permitir la interacción de la muestra con la lectina. Finalizado este período de incubación, se agregaron a la columna 7 mL de solución de equilibrio y se recogieron las glicofomas NR. Posteriormente, se añadieron 0.5 mL de solución de equilibrio conteniendo metil  $\alpha$ D-glucopiranosido 10 mM (glucósido) y se interrumpió el flujo por 30 minutos. Se eluyeron las glicofomas DR con 7 mL de glucósido. Finalmente, se añadieron 0.5 mL de solución de equilibrio conteniendo metil  $\alpha$ D-manopiranosido 100 mM (manósido) y se dejó interactuar

durante 30 minutos. Se agregaron 7 mL adicionales de manósido y se recogieron las glicofomas FR. En todo momento, el flujo de la columna se mantuvo en 14 mL/h (Figura 16).

La recuperación de FSH luego de realizada la cromatografía varió entre 60 y 85 %.

#### **4.6.3 Tratamiento de las fracciones obtenidas por la cromatografía en Con-A**

Los eluidos cromatográficos conteniendo las glicofomas NR, DR y FR de FSH fueron dializados contra solución de NaCl 10 mM, con el objeto de eliminar los azúcares presentes en solución. La diálisis comenzó el mismo día que se realizó la cromatografía, dejándose durante toda una noche a 4°C, en una relación de volúmenes de 7 mL de muestra: 2 L de solución de NaCl 10 mM. Al día siguiente se cambió la solución salina y luego de 3 h se realizaron tres nuevos cambios a intervalos de 1 hora.

Las fracciones obtenidas en las cromatografías de los sueros de los pacientes fueron concentradas hasta un volumen menor a 1 mL. No fue necesario concentrar las fracciones de los citosoles de hipófisis debido a los altos niveles de FSH que contenían estas muestras. Se tomaron alícuotas para la determinación de FSH inmunológica por RIE (ver ítem 5.3) y el material fue almacenado a -80°C hasta su posterior análisis.

### **5. Aislamiento y cultivo de células de Sertoli inmaduras**

Se utilizó un cultivo de células de Sertoli inmaduras, aisladas de ratas de 8 días de edad, para evaluar el efecto del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endocrina de estas células, en términos de producción de AMPc,

estradiol, inhibina B y de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas.

### **5.1 Aislamiento de los análogos de carga de FSHrh**

Utilizando la metodología de IEF previamente descrito, se obtuvieron 3 preparaciones de variantes glicosiladas de FSHrh con diferencias en su grado de sialización:

- análogos de carga de FSH con mayor grado de sialización, combinando las fracciones correspondientes al intervalo de pH 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>);
- análogos de carga de FSH con grado de sialización intermedio, combinando las fracciones correspondientes al intervalo de pH 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>);
- análogos de carga de FSH con menor grado de sialización, combinando las fracciones correspondientes al intervalo de pH mayor de 5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>).

Estas preparaciones se conservaron en pequeñas alícuotas, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su posterior utilización.

### **5.2 Cultivo de células de Sertoli**

Las células de Sertoli inmaduras fueron aisladas a partir de testículos de ratas de 8 días de edad utilizando la técnica descrita por Schteingart y col. (1995). Estas células se caracterizan por su alta capacidad de respuesta a la FSH tanto en su actividad proliferativa como en la producción de esteroides y péptidos.

Los animales se sacrificaron por decapitación y los testículos se extrajeron en condiciones de esterilidad. Los testículos decapsulados se incubaron en medio de cultivo conteniendo 0.03% de colagenasa y 0.003% de inhibidor de tripsina de soja por 5 min a temperatura ambiente. El medio de cultivo consistió en una mezcla 1:1 de medio Ham F10 y DMEM, suplementado con 14.3 mM de bicarbonato de sodio, 100 U/L de penicilina y 1.1 mM de anfotericina B. Luego de

la dispersión inicial con colagenasa, los túbulos seminíferos se 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 mismos fueron incubados durante 10 min a temperatura ambiente con una solución de colagenasa 0.03%, inhibidor de tripsina 0.003% y desoxirribonucleasa 0.03%.

Para el cultivo se utilizó el método descrito por Padmanabhan y col. (1987). 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 mM, insulina 0.9 mM, 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  $\mu$ g ADN/pocillo en placas de 24 pocillos a 34°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%: aire 95%. Se cultivaron las células durante 72 h y luego se removió el medio. Las monocapas celulares se lavaron una vez con medio y se incubaron nuevamente con 0.7 mL del medio antes mencionado conteniendo 10 mg/L de factor de crecimiento epidérmico (EGF), BSA 1 %, 19-hidroxiandrostenediona 2 mM y diferentes preparaciones de FSH en un rango de concentraciones entre 0.08 y 5 ng/mL. Luego de una incubación de 90 min, se recogieron alícuotas de 0.2 mL que fueron almacenadas a -80°C hasta el momento en que se realizó el dosaje de AMPc. Se continuó la incubación con los 0.5 mL de medio restantes durante 16 h adicionales. Finalizado este periodo de tiempo, se recogieron los medios, los que se almacenaron a -80°C hasta el dosaje de estradiol e inhibinas.

## **6. Determinaciones hormonales**

### **6.1 Determinación de niveles hormonales en sueros humanos**

Los niveles de FSH y LH en el suero de los pacientes en estudio se determinaron por un ensayo inmunofluorométrico de alta sensibilidad (IFMA, DELFIA<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Boston, USA). La sensibilidad funcional del ensayo fue de 0.05 y 0.02 UI/L respectivamente, de acuerdo a la preparación internacional de referencia 94/632 para FSH (WHO IRP 94/632) y al 2<sup>do</sup> estándar internacional de referencia 80/552 para LH (2<sup>nd</sup> WHO IRP 80/552). Los coeficientes de variación (CV) intra- e interensayo fueron  $\leq 2.3\%$  y  $\leq 5.2\%$  para FSH  $\leq 3.2\%$  y  $\leq 7.3\%$  para LH, respectivamente (Ropelato y col., 1997). Los niveles de testosterona se determinaron por RIE, utilizando un método comercial (Coat-a-Count, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), como se describió previamente (Trigo y col., 2004). Los CV intra- e interensayo fueron menor al 10 %.

### **6.2 Determinación de los niveles de testosterona en suero de rata**

Los niveles de testosterona sérica se determinaron por RIE desarrollado, según el método descrito por Suescun y col. (1985). Alícuotas de 300  $\mu$ L de suero se extrajeron con 2 mL de éter dietílico; los extractos etéreos se evaporaron a sequedad bajo aire comprimido y los residuos se resuspendieron en solución PBS-gelatina 0.1 %, pH 7.4, en una proporción 1:1 (volumen de suero: volumen de resuspensión). La incubación con el anticuerpo (dilución de trabajo 1/140) y el trazador (testosterona [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H(N)]) se realizó a 4°C durante 18 h. La separación del esteroide libre del complejo esteroide-anticuerpo se realizó utilizando una suspensión de carbón Norit<sup>®</sup> A, 0.625 g/% P/V en solución amortiguadora de RIE. Luego se determinó la radioactividad presente en los

sobrenadantes, que contenían la fracción unida usando una solución centelleadora comercial en un contador de centelleo líquido (RackBeta 1214, Wallac, Abbott Laboratories, IL, USA).

El anticuerpo anti-testosterona presentó una reacción cruzada del 35 % con dihidrotestosterona (DHT). El límite inferior de detección fue de 12.5 pg/tubo. El CV intra- e interensayo fue menor al 12 %. Los resultados se expresaron como ng/mL de suero.

### **6.3 Determinación de FSH**

La determinación de los niveles de FSH se realizó utilizando un RIE de doble anticuerpo desarrollado en nuestro laboratorio, según la metodología previamente descrita por Creus y col. (2001) para la FSHh y Rulli y col., (1995) para la FSH de rata (FSHr).

Como trazador se utilizaron los estándares hFSH-I-SIAFP2 para FSHh y NIDDK-rFSH-I-9 (AFP-12828B) para FSHr, marcados con  $^{125}\text{I}$ ; la iodación se realizó siguiendo el método de cloramina-T (Greenwood y col., 1963) y la hormona iodada se purificó a través de una columna de Sephadex G-25. La incubación con el primer anticuerpo (NIDDK-anti-hFSH-6, dilución 1/80000 y NIDDK-anti-rFSH-S-11, dilución 1/40000) y el trazador se realizó a 4°C durante 18 horas. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo (suero de cabra anti-IgG de conejo; dilución 1:15) y se incubó durante 3 h a 4°C. Se precipitó la fracción libre de la unida con el agregado de polietilenglicol al 6 %. La hormona libre se separó por centrifugación y aspiración de los sobrenadantes y se determinó la radioactividad presente en los precipitados que contenían la fracción unida, en un contador de centelleo sólido Wizard Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Boston, USA). Como preparación de referencia para FSHh se utilizó el estándar LER-907. La sensibilidad del ensayo fue de 4.6 ng/tubo. Los CV intra-

e interensayo fueron 9 y 12 %, respectivamente. En el RIE de FSH de rata, se utilizó el estándar rat-FSH-RP-2. La sensibilidad de este ensayo fue de 0.47 ng/tubo. Los CV intra- e interensayo fueron menores al 10 %.

#### **6.4 Determinación de los niveles de AMPc**

Los niveles de AMPc de los medios condicionados se determinaron utilizando un RIE comercial, siguiendo las instrucciones del proveedor (Immunotech, Beckman Coulter, CA, USA). La sensibilidad del ensayo fue 0.2 nM y los CV intra- e interensayo fueron menores al 10 %. Los resultados se expresaron como pmol/mL.

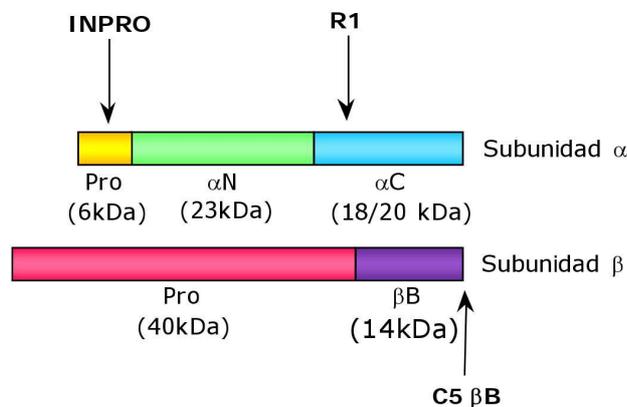
#### **6.5 Determinación de estradiol**

Los niveles de estradiol en los medios condicionados se determinaron por RIE como fue descrito previamente por Escobar y col. (1976). Alícuotas de 100  $\mu$ l de los medios condicionados se incubaron con el anticuerpo (dilución de trabajo 1/2000) y el trazador (estradiol [6,7-<sup>3</sup>H(N)]) a 4°C durante 18 h. La separación del esteroide libre del complejo esteroide-anticuerpo se realizó utilizando una suspensión de carbón Norit<sup>®</sup>A 0.625 g /% P/V en solución amortiguadora de RIE. Luego se determinó la radioactividad presente en los sobrenadantes, que contenían la fracción unida, como se describió en 10.2.

Este ensayo utiliza un anticuerpo específico que posee una reacción cruzada menor a 1 % con estrona y estriol. El límite inferior de detección fue de 6.25 pg/tubo. Los CV intra- e interensayo fueron 8 y 15 % respectivamente.

## 6.6 Determinación de los niveles de inhibina B y de la subunidad $\alpha$ de inhibinas

Los niveles de inhibina B y de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas, Pro- $\alpha$ C, se determinaron a través de un ELISA específico de dos sitios según se describió previamente por Groome y col. (1994, 1995 y 1996). Dicho inmunoensayo se basa en el uso de un anticuerpo monoclonal inmovilizado que actúa como anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo monoclonal el cual está conjugado a fosfatasa alcalina y actúa como anticuerpo de detección (R1). Los anticuerpos de captura se encuentran acoplados covalentemente a través de sus residuos carbohidratados en la región Fc a una placa especialmente tratada (Avidplate-HZ) y están dirigidos contra la región  $\beta$ B (C5) o Pro- $\alpha$  (INPRO) según la inhibina que se desee detectar (Figura 17).



**Figura 17:** Reactividad de los anticuerpos utilizados en el ELISA para inhibinas. El ensayo para Pro- $\alpha$ C utiliza INPRO y R1, el ensayo para inhibina B utiliza C5 y R1.

Las muestras se diluyeron con solución diluyente (Tritón X-100 4.5% V/V, BSA 10% P/V, azida sódica 0.01% P/V y NaCl 0.15 M en Tris-HCl 0.1M, pH 7.5) para la determinación de Pro- $\alpha$ C o con suero fetal bovino para la determinación de inhibina B, de acuerdo a la cantidad estimada de inhibina presente.

Para la determinación de inhibina B, las muestras fueron tratadas previamente.

Un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de SDS al 6 % P/V se adicionó a 100  $\mu\text{L}$  de las muestras diluidas y estándares y se llevaron a 100°C durante 3-5 minutos. Luego, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución diluyente y 50  $\mu\text{L}$  de una solución recién preparada de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Merck, Darmstadt, Alemania) 6 %. Se dejó en contacto por 30 min a temperatura ambiente, lográndose la oxidación total de los residuos metionina del epítipo del péptido a medir de forma de obtener una mejor interacción con el anticuerpo de captura.

Para la determinación de Pro- $\alpha\text{C}$ , no fue necesario realizar un tratamiento previo a las muestras.

Las muestras (100  $\mu\text{L}$  para inhibina B y 50  $\mu\text{L}$  para Pro- $\alpha\text{C}$ ) se sembraron en placas de 96 pocillos conteniendo el anticuerpo de captura inmovilizado y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Luego se realizó el lavado de las placas con solución de lavado (Tween 20 0.05% V/V y NaCl 0.15 M en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5) utilizando un lavador automático de microplacas (Wellwash 4M K2, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) para eliminar los compuestos no capturados presentes en la muestra y se adicionó el segundo anticuerpo. Éste es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la región  $\alpha\text{C}$  de la subunidad  $\alpha$  (R1) que está acoplado a fosfatasa alcalina. Las muestras se dejaron en contacto con este segundo anticuerpo durante 3 h a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se removió mediante un lavado muy exhaustivo con la misma solución mencionada anteriormente.

Con el objeto de optimizar la sensibilidad de los ensayos de inhibina, todos incluyen, en la última etapa del procedimiento, la amplificación de la señal de color generada por la fosfatasa alcalina acoplada al segundo anticuerpo. Con este fin, se utiliza un sistema especial de amplificación para ELISA. Este sistema se caracteriza por la interacción de la enzima con un sustrato que inicia una reacción enzimática secundaria, que resulta en desarrollo de color como producto final.

El resultado de la reacción es una coloración roja cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de inhibina presente en la muestra original. La absorción fue determinada en un lector de microplacas (Multiskan EX, Thermo Scientific, Baltimore, MD, USA) a una longitud de onda de 492 nm con un filtro de referencia a 620 nm.

La sensibilidad de estos ensayos fue de 15 pg/mL para inhibina B y de 6 pg/mL para Pro- $\alpha$ C. Los CV intra- e interensayo fueron menores del 10 % para ambas determinaciones.

El ensayo de inhibina B presenta una reacción cruzada menor del 0.1 % con la activina A, activina B y folistatina, y menor del 0.5 % con inhibina A.

## **7. Análisis de la expresión del ARNm de las sialiltransferasas hipofisarias *St3gal3* y *St6gal1***

La expresión del ARNm de las sialiltransferasas hipofisarias *St3gal3* y *St6gal1* se realizó por la técnica de retrotranscripción (RT) seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en condiciones semicuantitativas. Esta técnica se utilizó para el análisis en hipófisis de rata en todas las condiciones experimentales estudiadas. El procedimiento se realizó con material estéril y libre de nucleasas.

### **7.1 Extracción del ARN total**

Se extrajo el ARN total utilizando el reactivo comercial Trizol<sup>®</sup> Reagent, basado en la técnica desarrollada por Chomczynski y Sacchi (1987), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las hipófisis fueron pesadas y homogeneizadas con 1 mL de Trizol/100 mg de tejido usando un homogeneizador manual de vidrio-teflón. Luego, se transfirió el homogenato a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se incubó 5 min a

temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas. Se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo/mL de Trizol y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se dejó reposar 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 min a 12000xg a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo de 1.5 mL, se agregaron 500  $\mu$ L de isopropanol frío/mL de Trizol y se agitó suavemente por inversión para precipitar el ARN. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se guardó a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó durante 10 min a 12000xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 75% V/V (frío) en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 7500xg a 4°C por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Las muestras de ARN total así obtenidas se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

El H<sub>2</sub>O libre de nucleasas se obtuvo por esterilización de agua deionizada previamente tratada con DEPC (H<sub>2</sub>O-DEPC 0.1 % V/V).

## **7.2 Cuantificación del ARN total**

La concentración de ARN total en cada muestra se realizó por medición de la absorbancia a 260 nm, con un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, CA, USA). El grado de pureza del ARN total se determinó por el cociente obtenido de los valores de absorbancias determinadas a 260 y 280 nm, el cual evalúa la contaminación con proteínas (cociente óptimo entre 1.8 y 2.0) y a 260 y 230 nm, el cual evalúa la contaminación con solventes orgánicos (cociente óptimo mayor a 1.8).

### **7.3 Tratamiento con ADNasa**

Con el objetivo de eliminar una posible contaminación con ADN genómico, el ARN extraído fue sometido a una digestión con ADNasa I recombinante (DNA-free™) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se tomaron alícuotas de 10 µg de ARN total en microtubos de 0.2 mL de pared delgada, se agregaron 5 µL de buffer de reacción 10x, 1 µL de ADNasa (2 U) y se completó hasta un volumen de 50 µL con agua libre de nucleasas. La reacción enzimática se realizó a 37°C durante 30 min en un termociclador T-Gradient (Biometra, Goettingen, Alemania) y se detuvo por agregado de 5 µL de reactivo de inactivación. Se agitó vigorosamente durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000xg a 4°C por 2 min. Finalmente, el sobrenadante de cada muestra se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo.

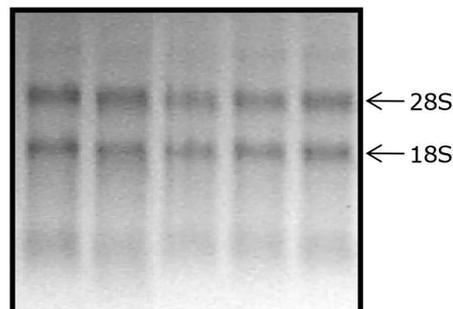
La concentración de ARN total de cada muestra luego del tratamiento se determinó como se mencionó en el ítem 7.2. Luego del tratamiento las muestras se almacenaron a -80°C.

### **7.4 Verificación de la integridad del ARN total**

La integridad del ARN total luego del tratamiento con ADNasa se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% P/V empleando la solución reguladora MOPS 1x (MOPS 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0) y 6% V/V de formaldehído como agente desnaturizante. Se tomó 1 µg de ARN total de cada muestra, se completó hasta un volumen de 10 µL con agua libre de nucleasas y se adicionaron 20 µL de la solución desnaturizante FMF (50 % V/V formamida, 2x MOPS, 7% V/V formaldehído). Las muestras se desnaturizaron por incubación a 75°C durante 5 min y posteriormente se mantuvieron en hielo. Se adicionaron 2 µL de la solución de carga para ARN (glicerol 50% V/V, azul de bromofenol 0.25%

P/V y xilén cianol 0.25% P/V) y 0.3  $\mu$ L de una solución 2.5 mg/mL de bromuro de etidio. Se sembraron las muestras en el gel y la corrida electroforética se realizó con solución de MOPS 1x durante 40 min a 70 V. Se fotografió el gel con un sistema digital de captación de imagen (Digi DocIt, UVP, Inc. Upland, CA, USA), usando una cámara Canon Powershot G10 14.7 MP y un transiluminador UV. Tanto la cuba electroforética como la cama y peines fueron pretratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaOH con el fin de inactivar nucleasas.

En la Figura 18 se muestra un gel representativo de la electroforesis de ARN total en condiciones desnaturalizantes.



**Figura 18:** Electroforesis de ARN total en condiciones desnaturalizantes. Imagen digital monocromática del gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio. Se observan claramente las bandas correspondientes a la subunidad mayor y menor del ARN ribosomal (28S y 18S).

El ARN ribosomal constituye más del 80% del ARN total, una clara visualización de las bandas correspondientes a la subunidad mayor (28S) y a la subunidad menor (18S) y una relación 28S/18S cercana a 2 indican la integridad del ARN total.

### **7.5 Reacción de retrotranscripción del ARNm**

Se realizó la RT de los ARNm a partir del ARN total utilizando como cebadores oligonucleótidos de desoxitimidina (oligo-dT). Estos cebadores están compuestos por 15 nucleótidos de base timina, complementario a la terminación poliadenilada

presente en el ARNm de organismos eucariotas, y permiten la retrotranscripción específica de este tipo de ARN.

En microtubos de 0.2 mL de pared delgada, se tomaron alícuotas de 1 µg de ARN total tratado con ADNasa, se agregó 1 µL de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM (cada uno), 1 µL de oligo-dT 0.5 µg/µL y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas suficiente para completar un volumen total de 12 µL. Se incubó a 65°C durante 5 min en un termociclador T-Gradient (Biometra, Goettingen, Alemania) seguido de 1 min en hielo y se agregaron 4 µL de buffer de reacción 5x (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 8.3), 2 µL de ditioneitol (DTT) 0.1 M y 1 µL de inhibidor de ribonucleasas recombinante 40 U/µL (RNaseOUT inhibitor). Se incubó a 42°C durante 2 min y se agregó 1 µL de la transcriptasa reversa SuperScript II (200 U/µL).

La reacción de RT se llevó a cabo a 42°C durante 50 min en un volumen final de 20 µL. Finalmente, la enzima se inactivó por incubación a 70°C durante 15 min y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización. Como control negativo se utilizó un tubo de reacción en ausencia de ARN.

## 7.6 Reacción en cadena de la polimerasa

### 7.6.1 Diseño de cebadores

Las secuencias de los cebadores usados en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Secuencia de los cebadores utilizados en la reacción de PCR

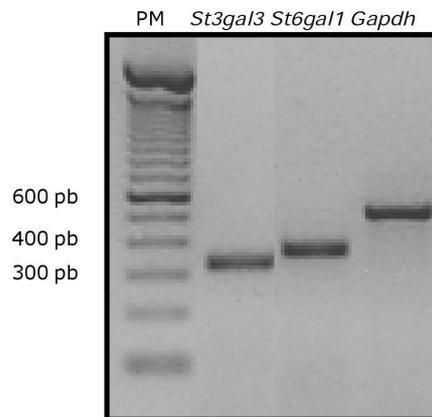
Gen	N° acceso a GenBank	Oligonucleótido sentido 5'-3'	Oligonucleótido antisentido 5'-3'	Producto (pb)
<i>St3gal3</i>	NM_031697	TCAAGTGGCTGAAGTACATC	GTTGTGTGTCCAGGACTCTT	346
<i>St6gal1</i>	NM_147205	GAGTTACCGAAGGCTGAACC	CAACGAATGTTCCGGAAGCCAGA	369
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GTAGCCATATTCATTGTCATA	ATTGCATCCTGCACCACCAA	515

Para la amplificación por PCR de los ADN copia (ADNc) de la sialiltransferasa St3gal3 se utilizaron los cebadores diseñados previamente por Damián-Matsumura y col. (1999). Estos cebadores están ubicados en dos exones diferentes de modo que salteen una región intrónica, con el fin de evitar la amplificación de material genómico.

Para la amplificación de los ADNc de la sialiltransferasa St6gal1 se diseñaron cebadores basados en la secuencia del ARNm reportada previamente por Weinstein y col. (1987). Se utilizó el programa computacional "Oligos" versión 4.0 de Wojciech Richlijk, considerándose la temperatura óptima, la adecuada relación de bases GC/AT y se evitó la formación de enlaces inter e intracatenarios.

Asimismo, se realizó la amplificación del ADNc de la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Gapdh) que se utiliza para normalizar la amplificación de los ADNc de interés, controlando posibles variaciones en la concentración del ARN total utilizado en la RT-PCR. Para la amplificación de un fragmento de 515 pb de *Gapdh* fueron utilizados los oligonucleótidos descritos previamente por Timossi y col. (2000).

La especificidad de los cebadores fue comprobada realizando una RT-PCR en condiciones estándar (Ta 55°C, 35 ciclos) a partir de ARN total extraído de cerebro de ratas macho adultas (Figura 19). Se visualizó una única banda a la altura correspondiente al tamaño molecular esperado para cada ADNc amplificado. La misma fue secuenciada en Macrogen Inc. (Seúl, Corea) y la secuencia obtenida coincidió con la esperada para cada gen en estudio.



**Figura 19:** Especificidad de los cebadores utilizados en la PCR. Imagen digital del gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Se amplificó a partir de ADNc de cerebro de ratas macho adultas. En la primera calle se observa el marcador de peso molecular (PM). Se visualizan bandas únicas del tamaño molecular esperado correspondientes a la amplificación por PCR del ADNc de las sialiltransferasas *St3gal3*, *St6gal1* y *Gapdh*.

### 7.6.2 Optimización de las condiciones de reacción para la semicuantificación

Con el fin de optimizar las condiciones de la reacción, se determinó para cada amplicón, el número de ciclos que se encuentran en la fase exponencial de amplificación. Esto se basa en la observación de que antes de alcanzar el plateau en una amplificación por PCR, existe una relación lineal entre la cantidad del ADNc inicial y el producto final (Gause y Adamovicz, 1994).

La reacción se realizó en microtubos de 0.2 mL de pared delgada; se utilizó 1  $\mu$ L de ADNc simple cadena obtenido de la RT; se agregaron 1  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM c/u, 1  $\mu$ L de cebadores sentido y antisentido 20  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ L) y solución reguladora de pH para Taq ADN polimerasa suficiente para completar un volumen final de 50  $\mu$ L. En cada reacción se incluyó un control negativo reemplazando el ADNc por  $H_2O$  libre de nucleasas.

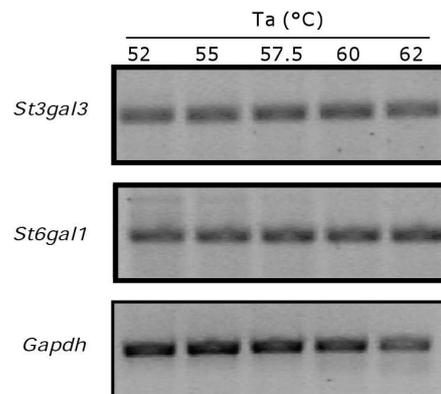
En primer lugar se evaluó la temperatura óptima de hibridación ( $T_a$ ) para cada juego de cebadores a partir de ADNc de cerebros de ratas macho adultas. La

reacción se llevó a cabo a  $T_a$  variables (52-62°C) utilizando 30 ciclos de amplificación.

Se siguió el siguiente ciclo de temperaturas:

- desnaturalización inicial a 94°C por 5 min
- desnaturalización a 94°C por 30 s
- hibridación a 52-62°C por 30 s x 30 ciclos
- extensión a 72°C por 1 min
- extensión final a 72°C por 7 min
- almacenamiento a 4°C

En la Figura 20 se observan las variaciones en la densidad óptica del producto de amplificación en función de la  $T_a$  para cada juego de cebadores. En base a estos resultados, se decidió utilizar una  $T_a=60^\circ\text{C}$  en todos los casos, ya que al ser la más alta entre las que permiten una buena amplificación de todos los productos, reduce los posibles alineamientos inespecíficos.



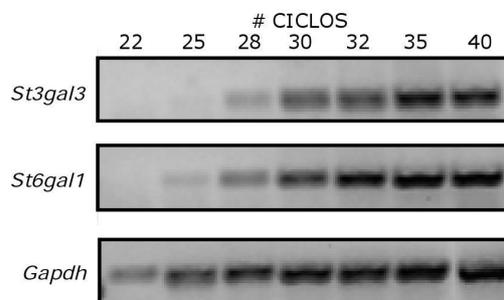
**Figura 20:** Evaluación de la  $T_a$  óptima para la PCR. Imagen digital del gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Se amplificó a partir de ADNc de cerebro de ratas macho adultas. Se observan las bandas correspondientes a la amplificación por PCR del ADNc de las enzimas *St3gal3*, *St6gal1* y *Gapdh* a distintas  $T_a$ .

Luego se evaluó el número óptimo de ciclos de amplificación para cada juego de cebadores. Como el número de ciclos depende de la cantidad de ADNc presente

en la muestra, la optimización se realizó a partir de ADNc obtenido por RT de 1 µg de ARN total extraído de hipófisis de ratas macho adultas. La reacción se llevó a cabo a Ta=60°C y un número variable de ciclos de amplificación. Se siguió el siguiente ciclo de temperaturas:

- desnaturalización inicial a 94°C por 5 min
- desnaturalización a 94°C por 30 s
- hibridación a 52-62°C por 30 s x 22-40 ciclos
- extensión a 72°C por 1 min
- extensión final a 72°C por 7 min
- almacenamiento a 4°C

En la Figura 21 se muestra un ejemplo de las variaciones en la densidad óptica del producto de amplificación en función del número de ciclos para cada juego de cebadores obtenidos a partir de ADNc de hipófisis de ratas macho adultas.



**Figura 21:** Evaluación del número óptimo de ciclos para la PCR. Imagen digital del gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio. Se amplificó a partir de ADNc de hipófisis de ratas macho adultas. Se observan las bandas correspondientes a la amplificación por PCR del ADNc de las enzimas *St3gal3*, *St6gal1* y *Gapdh*.

En todos los casos, se escogió un número de ciclos tal que se encuentre en la fase lineal de amplificación y permita la detección del producto sin saturación de la señal. Se utilizaron 30 ciclos para amplificar el ARNm de ambas sialiltransferasas y 25 ciclos para el ARNm de la *Gapdh*.

### **7.6.3 Electroforesis de los productos de PCR y cuantificación de la expresión**

Los productos de PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa 1.5% P/V conteniendo 0.15 µg/mL de bromuro de etidio junto a un marcador de pares de bases (100-bp DNA ladder). Para la preparación del gel se empleó una solución TBS 0.5x (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5). A cada muestra se adicionó 1/5 parte de solución de carga para ADN (glicerol 30% V/V, azul de bromofenol 0.25% P/V y xilén cianol 0.25% P/V). Se sembraron las muestras en el gel y la corrida electroforética se realizó con solución de TBS 0.5x durante 30 min a 75 V. Se fotografió el gel con el sistema digital de captación de imagen mencionado en el punto 6.4, utilizando un transiluminador UV. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, Bethesda, ND, USA) y se expresó como densidad óptica integrada (DOI). La expresión relativa de las sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1* para cada condición experimental se determinó calculando la relación entre la DOI correspondiente al gen de interés y la del gen de *Gapdh*.

## **8. Inmunohistoquímica de las sialiltransferasas hipofisarias STGAL3 y ST6GAL1**

En cortes de hipófisis de ratas macho provenientes de las distintas condiciones experimentales se realizó inmunohistoquímica para determinar la presencia de las sialiltransferasas en estudio. Se utilizaron los anticuerpos gentilmente cedidos por el Dr. E. Berger (Universidad de Zurich, Suiza) y el Dr. J. Paulson (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Las hipófisis se fijaron en solución de Bouin durante 8 h, luego se

deshidrataron e incluyeron en parafina. Los tacos fueron cortados en secciones seriadas de 4  $\mu\text{m}$  en diferentes niveles. Los cortes fueron tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% a fin de anular la actividad peroxidasa endógena de neutrófilos y hematíes. Se incubaron con los anticuerpos primarios anti-ST3GAL3 (dilución 1/50), anti-ST6GAL1 (dilución 1/50) y anti-FSH (dilución 1/100) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar exhaustivamente, se incubaron con el reactivo EnVision durante 30 minutos. La reacción se reveló con el cromógeno diaminobencidina (DAB) 0.5 mg/mL y  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 VOL, 1/1000 en solución amortiguadora Tris-HCl. Se incluyó un control negativo, reemplazando el anticuerpo específico por suero normal de conejo ó solución fosfato amortiguadora de pH; y un control positivo, utilizando cortes de hígado y/o cerebro de rata.

Se obtuvieron microfotografías que fueron analizadas mediante videomicroscopía computarizada (Imaging Technology, software Optimas, OPTIMAS Corporation, Bothell, WA, USA). Se estudiaron 4 hipófisis/grupo en 2 niveles. Se registró un mínimo de 10 imágenes por corte. Las mediciones fueron procesadas y se calcularon los siguientes parámetros estereológicos: la densidad de volumen (DV), definida como el promedio del área inmunomarcada/ área de referencia (AR) y la densidad de células (DC), definida como el número de células/ $\mu\text{m}^2$ . El AR es un valor fijo que representa el área total a través de la cual fueron contadas las células.

## **9. Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar (EEM).

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

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando la prueba t de Student cuando se compararon dos grupos. Para las comparaciones múltiples se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Tukey-Kramer. Para los análisis de las curvas dosis-respuesta se utilizó análisis de varianza de dos factores (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p resultó menor de 0.05.

Se utilizó para el análisis estadístico el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

# ***Resultados***

## Capítulo I

### **Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de FSH sérica en pacientes anórqidos**

El primer objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar 13 pacientes anórqidos, derivados a la División de Endocrinología del Hospital de Niños R. Gutiérrez, con el fin de determinar el efecto de la ausencia de testículo desde edades tempranas de la vida sobre el grado de sialización, la complejidad de los oligosacáridos de FSH y la acción de GnRH y testosterona sobre estas características moleculares de la gonadotropina.

#### **1.1 Pacientes anórqidos en edad prepuberal**

Se incluyeron 8 pacientes anórqidos, estudiados entre los 0.8 y los 13.4 años de edad; el diagnóstico fue confirmado por palpación durante el examen clínico, por la ausencia de respuesta gonadal al estímulo con hCG y por exploración quirúrgica.

Cinco de estos pacientes fueron analizados en condiciones basales y luego de la administración de un estímulo agudo con GnRH, prueba funcional que se realizó en la División de Endocrinología del Hospital de Niños R. Gutiérrez, para evaluar la actividad del eje hipófiso-gonadal.

##### **1.1.1 Datos clínicos y perfil hormonal sérico**

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos en el examen clínico y el perfil hormonal sérico determinado en los pacientes estudiados. Los parámetros evaluados fueron: la edad cronológica, el vello pubiano, el estadio de desarrollo

genital según Tanner (G), los niveles de testosterona plasmática y las gonadotropinas séricas (FSH y LH).

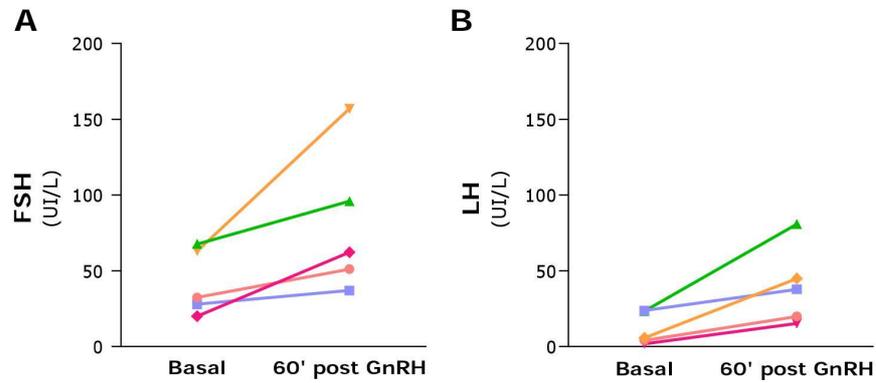
**Tabla 3:** Datos clínicos y perfil hormonal sérico basal

Pacientes	EC (años)	VP	G	T (nmol/L)	LH (UI/L)	FSH (UI/L)
1	0.8	1	I	< 0.35	16.8	66.0
2	1.3	1	I	< 0.35	0.5	7.8
3	2.4	1	I	< 0.35	5.9	63.0
4	5.7	1	I	< 0.35	0.2	14.0
5	6.6	1	I	< 0.35	1.9	20.1
6	11.7	2	I	< 0.35	4.1	32.5
7	12.3	1	I	< 0.35	23.8	28.0
8	13.4	1	I	< 0.35	23.5	67.7

EC: Edad cronológica; VP: Vello pubiano; G: Estadio de desarrollo genital según Tanner; T: Testosterona; LH: Hormona Luteinizante; FSH: Hormona Folículo-Estimulante. Los niveles de LH se expresan en UI/L del 2° WHO IRP 80/552 y los de FSH en UI/L del WHO IRP 94/632.

En este grupo de pacientes, la testosterona sérica se encontró dentro del rango prepuberal normal. A excepción de dos pacientes con valores bajos de LH (#2 y #4), los niveles de ambas gonadotropinas se hallaron marcadamente elevados con un alto grado de variabilidad individual; en todos los casos los niveles de FSH superaron a los de LH.

Al analizar el efecto del GnRH, evaluado luego de 60' de su administración, se observó un aumento de FSH de 1 a 3 veces mientras que los niveles de LH aumentaron de 2 a 9 veces respecto del valor basal (Figura 22).

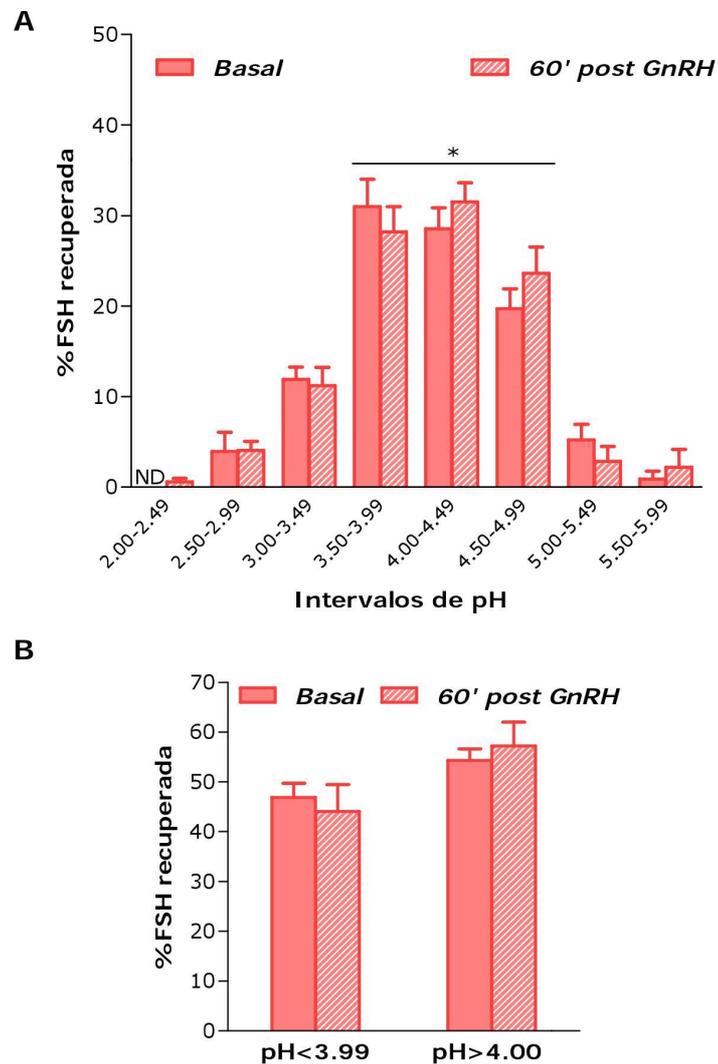


**Figura 22:** Niveles individuales de FSH (panel A) y de LH (panel B) en pacientes anórquidos en edad prepuberal en condiciones basales y luego de un estímulo agudo con GnRH.

### 1.1.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica. Efecto de GnRH

Los análogos de carga de FSH, con diferencias en su grado de sialización, fueron aislados utilizando IEF preparativo, como se describió en Materiales y Métodos.

La Figura 23 (paneles A y B) muestra los resultados obtenidos al analizar la abundancia relativa de los análogos de carga de FSH sérica, en condiciones basales y luego de 60' de la administración de GnRH.



**Figura 23:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica en pacientes anórkidos en edad prepuberal. Efecto de GnRH. A) Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga en intervalos de 0.49 unidades de pH, en condiciones basales y luego de 60' del estímulo con GnRH. \*  $p < 0.05$ : proporción predominante de hormona aislada en el rango de pH 3.50-4.99. ND: no detectable. B) Proporción de hormona (% del total de FSH recuperada) aislada a  $\text{pH} < 3.99$  y  $\text{pH} > 4.00$  en condiciones basales y luego de 60' del estímulo con GnRH. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM.

En condiciones basales se detectó hormona en un amplio rango de pH: 2.50-5.99. La marcada heterogeneidad molecular de la FSH circulante en los pacientes estudiados, no permitió identificar una proporción predominante de hormona en un intervalo acotado de pH (0.49 unidades); el  $79.3 \pm 3.0$  % de la FSH total recuperada se aisló en un rango de pH 3.50-4.99 (Figura 23, panel A).

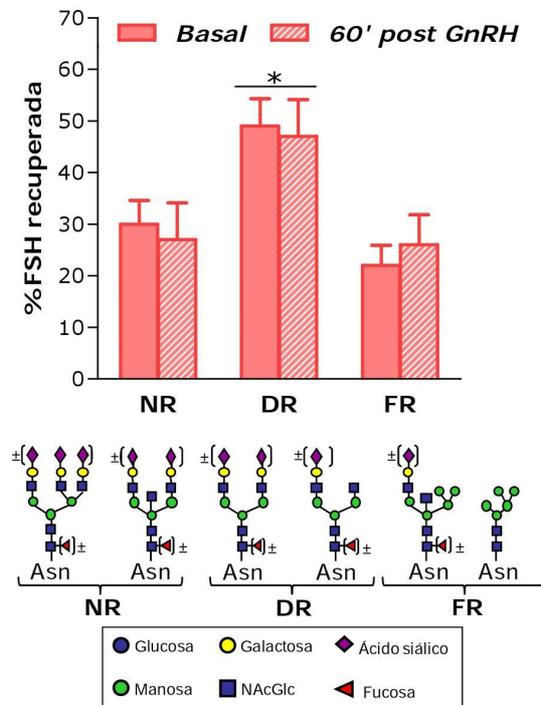
Cuando se analizó la proporción de hormona aislada por debajo de pH 3.99 (mayor grado de sialización) y por encima de pH 4.00 (menor grado de sialización) no se observaron diferencias en las proporciones relativas de análogos de carga: pH<3.99:  $46.8 \pm 2.9$  % y a pH>4.00:  $54.3 \pm 2.3$ % (Figura 23, panel B).

Estas características descritas en condiciones basales no fueron modificadas por la administración de GnRH (Figura 23, paneles A y B). Al igual que en la condición basal, no se observó una proporción predominante de FSH en un intervalo acotado de pH; el  $80.4 \pm 2.10$  % de la FSH total recuperada se aisló en un rango de pH 3.50-4.99 (Figura 23, panel A). Asimismo, no se observaron diferencias en las proporciones de hormona aisladas por debajo de pH 3.99 y por encima de pH 4.00:  $44.1 \pm 5.4$  y  $57.2 \pm 4.8$  %, respectivamente.

### **1.1.3 Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSH con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos. Efecto de GnRH.**

Las variantes glicosiladas de FSH con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos fueron aisladas mediante cromatografía de afinidad en Con-A, como se ha descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos al determinar la abundancia relativa de las glicofomas de FSH sérica con distinto grado de complejidad en sus oligosacáridos se muestran en la Figura 24.



**Figura 24:** Abundancia relativa de glicofomas de FSH sérica con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos en pacientes anórcidos en edad prepuberal. Efecto de GnRH. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSH no retenidas (NR), débilmente retenidas (DR) y fuertemente retenidas por la lectina (FR) en condiciones basales y luego de la administración de GnRH. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. \*:  $p < 0.05$  DR vs NR y FR.

En condiciones basales, se observó un predominio de glicofomas de FSH con oligosacáridos biantenarios y truncados, débilmente retenidos por la lectina: DR:  $49.0 \pm 5.3$  vs NR:  $30.0 \pm 4.6$  y FR  $22.0 \pm 3.9$  %,  $p < 0.05$ . No se observaron diferencias entre las proporciones de glicofomas con oligosacáridos altamente ramificados y las que contenían oligosacáridos con un menor grado de procesamiento, de tipo híbrido y de alto contenido en manosa.

La administración de GnRH no indujo cambios en estas proporciones relativas: DR:  $47.0 \pm 7.2$  vs NR:  $27.0 \pm 7.2$  y FR:  $26.0 \pm 5.8$  %,  $p < 0.05$ .

## 1.2 Pacientes anórkidos en edad puberal

Se incluyeron 5 pacientes entre 13.5 y 19.2 años de edad los cuales fueron estudiados en el día previo a la administración de enantato de testosterona (ET) y luego de 7/14 días de la administración de este andrógeno; este tratamiento se utilizó para mantener los caracteres sexuales secundarios en los pacientes en edad puberal con esta patología.

### 1.2.1 Datos clínicos y perfil hormonal sérico

En la Tabla 4 se muestra el perfil hormonal sérico determinado en los pacientes estudiados. Los parámetros evaluados fueron: la edad cronológica, los niveles de testosterona plasmática y de las gonadotrofinas séricas (FSH y LH) antes y después de la administración de ET.

**Tabla 4:** Perfil hormonal sérico de pacientes en edad puberal en condiciones basales y bajo tratamiento con ET.

Pacientes	EC (años)	T		LH		FSH	
		Pre-ET	Post-ET	Pre-ET	Post-ET	Pre-ET	Post-ET
1	13.5	0.5	8.5	28.6	23.0	99.2	114.0
2	14.0	0.4	6.0	25.8	20.0	32.5	77.7
3	15.7	0.9	5.6	23.5	29.3	67.7	73.9
4	14.4	1.4	4.0	13.4	10.5	56.1	79.3
5	19.2	1.2	9.3	38.2	28.9	50.3	68.3

EC: Edad cronológica; T: Testosterona (nmol/L); LH: Hormona Luteinizante (UI/L del 2° WHO IRP 80/552); FSH: Hormona Foliculo-Estimulante (UI/L del WHO IRP 94/632); ET: enantato de testosterona; Pre-ET: día previo a la administración de ET; Post-ET: luego de 7/14 días de administración de ET.

Los niveles de testosterona sérica determinados previamente a la administración del andrógeno se encontraron dentro del rango prepupal; la terapia hormonal de reemplazo elevó los niveles de testosterona al rango puberal; sin embargo, este aumento no alcanzó significancia estadística debido al número

de pacientes incluidos en este estudio.

Los niveles de gonadotrofinas permanecieron muy elevados. Si bien la LH disminuyó en 4 pacientes luego de la administración del andrógeno, este cambio no alcanzó significancia estadística. Resultados similares se obtuvieron con los niveles de FSH, los cuales mostraron una tendencia al aumento luego de la administración del andrógeno (NS).

### **1.2.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica. Efecto del enantato de testosterona**

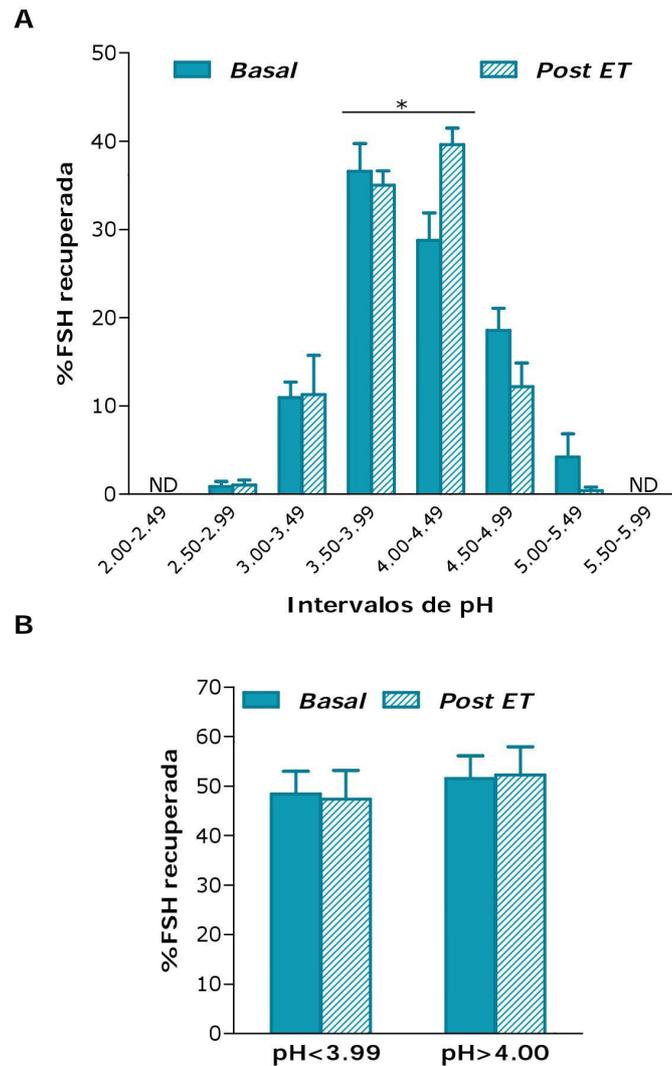
La Figura 25 (paneles A y B) muestra los resultados obtenidos al analizar la abundancia relativa de los análogos de carga de FSH sérica, en condiciones basales y luego de la administración de ET.

En los pacientes en edad puberal analizados previamente a la administración de ET se observó, en forma similar a lo descrito previamente en pacientes en edad prepuberal, una marcada heterogeneidad molecular de la FSH circulante. La hormona se recuperó en un amplio rango de pH: 2.50-5.49 (Figura 25, panel A). No se observó una proporción predominante en un intervalo acotado de pH; un  $65.4 \pm 4.9$  % se aisló en un rango de pH 3.50-4.49 ( $p < 0.05$ ).

Luego de la administración de ET, la mayor proporción de hormona se aisló en el mismo rango de pH que el observado en condiciones basales (3.50-4.49) y correspondió al  $74.5 \pm 7.0$  % de hormona total recuperada en el IEF ( $p < 0.05$ ) (Figura 25, panel A).

La proporción de hormona recuperada a  $pH < 3.99$ , no se modificó por efecto del andrógeno; en condiciones basales se recuperó un  $48.4 \pm 4.6$  % y luego de la administración de ET, el  $47.3 \pm 5.8$  % de la hormona; ambas proporciones se aislaron en el mismo rango de pH (NS). Del mismo modo, la proporción de FSH aislada a  $pH > 4.00$ , tampoco presentó variaciones luego del tratamiento: basal:

51.6 ± 4.6 vs post ET: 52.2 ± 5.7 %, NS (Figura 25, panel B).

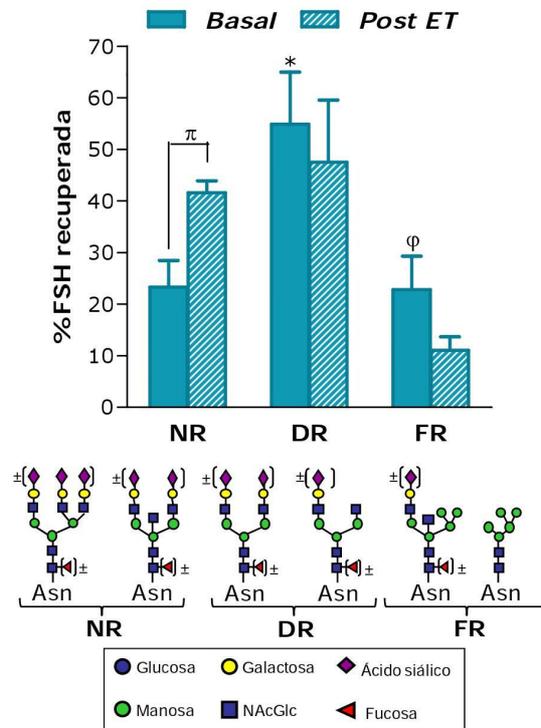


**Figura 25:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSH sérica en pacientes anórkidos en edad puberal. Efecto de la administración de enantato de testosterona (ET). A) Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.49 unidades de pH, en condiciones basales y luego de la administración de ET. \*  $p < 0.05$ : proporción predominante de hormona aislada en el rango de pH 3.50-4.49. B) Proporción de hormona (% del total de FSH recuperada) aislada a pH < 3.99 y > 4.00 en condiciones basales y luego de la administración de ET. Los resultados se expresan como media ± EEM.

### **1.2.3 Abundancia relativa de variantes glicosiladas de FSH con diferencias en el grado de complejidad de sus oligosacáridos. Efecto del enantato de testosterona**

Los resultados obtenidos al determinar la abundancia relativa de las glicoformas de FSH sérica con distinto grado de complejidad en sus oligosacáridos se muestran en la Figura 26.

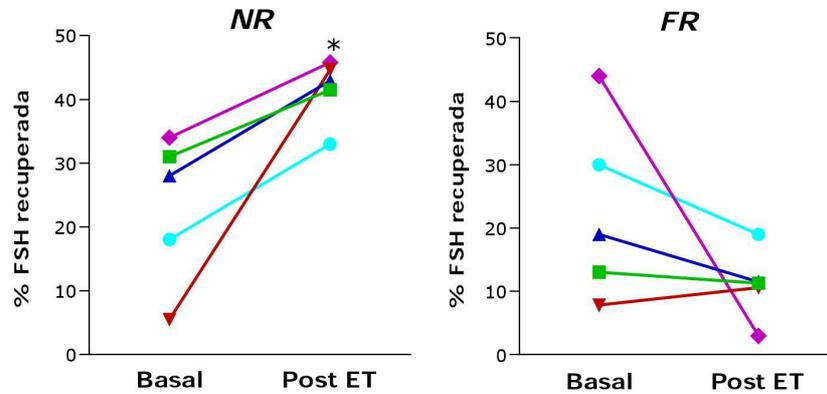
En condiciones basales, las glicoformas de FSH mostraron una distribución similar a la descrita en los pacientes en edad prepuberal. Se observó un predominio de glicoformas de FSH con cadenas carbohidratadas biantenarias y truncadas, mientras que las proporciones de glicoformas con oligosacáridos altamente ramificados y de tipo híbrido y de alto contenido en manosa resultaron de igual magnitud: DR:  $54.9 \pm 10.1$  vs NR:  $23.3 \pm 5.2$  y FR  $22.8 \pm 6.5$  %,  $p < 0.05$  (Figura 26).



**Figura 26:** Abundancia relativa de glicofomas de FSH sérica con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos en pacientes anórquidos en edad puberal. Efecto de la administración de enantato de testosterona (ET). Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSH no retenidas (NR), débilmente retenidas (DR) y fuertemente retenidas por la lectina (FR) en condiciones basales y luego de la administración de ET. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM. \*:  $p < 0.05$  DR basal vs NR y FR basal;  $\phi$ :  $p < 0.001$  FR post ET vs NR y DR post ET;  $\pi$ :  $p < 0.05$  NR basal vs NR post ET.

La administración de ET a este grupo de pacientes produjo modificaciones en la abundancia relativa de las glicofomas de FSH determinadas en la condición basal.

No se observó el predominio de glicofomas con cadenas carbohidratadas biantenarias y truncadas; la proporción de glicofomas con oligosacáridos altamente ramificados aumentó alcanzando un  $41.6 \pm 2.3$  % del total de hormona recuperada. Concomitantemente, el tratamiento con andrógenos indujo cambios en la proporción de glicofomas con oligosacáridos de tipo híbrido y de alto contenido en manosa (FR basal:  $22.8 \pm 6.5$  vs FR post-ET:  $11.1 \pm 2.6$  %). Esta diferencia no alcanzó significancia estadística (Figura 27).



**Figura 27:** Efecto de los andrógenos sobre la abundancia relativa de glicofomas de FSH sérica con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos en pacientes anórcidos en edad puberal. Valores individuales de la proporción (% del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSH no retenidas por la lectina (NR; panel A) y fuertemente retenidas por la lectina (FR; panel B). \*:  $p < 0.05$  respecto del basal. ET: enantato de testosterona.

En dos de los pacientes estudiados, la proporción de glicofomas cuyas cadenas de carbohidratos no completaron la incorporación de azúcares permaneció sin cambios luego de la administración de ET.

## Capítulo II

### **Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de FSH hipofisaria en ratas macho**

En base a trabajos previos en los cuales se describieron cambios en el grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH hipofisaria durante el desarrollo sexual de la rata macho (Rulli y col., 1999), se utilizó este mismo modelo experimental para evaluar posibles variaciones concomitantes en el grado de sialización de esta gonadotropina.

Se incluyeron en este estudio animales de tres edades diferentes: 15, 23 y 60 días de edad en condiciones basales.

Los animales adultos fueron estudiados: a) luego de la castración, para determinar el efecto de la ausencia de factores regulatorios sobre la microheterogeneidad de la FSH sintetizada y b) luego de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH, para determinar posibles efectos de estos factores regulatorios sobre las características inducidas por la castración.

#### **2.1 Variaciones en el grado de sialización de FSH hipofisaria en distintos estadios del desarrollo sexual**

##### **2.1.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos**

En primer lugar se determinaron los perfiles hormonales, concentración de FSH hipofisaria y los niveles de FSH y testosterona séricos, en los tres grupos de animales estudiados en diferentes estadios del desarrollo sexual (Tabla 5).

**Tabla 5:** Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos en distintos estadios del desarrollo sexual.

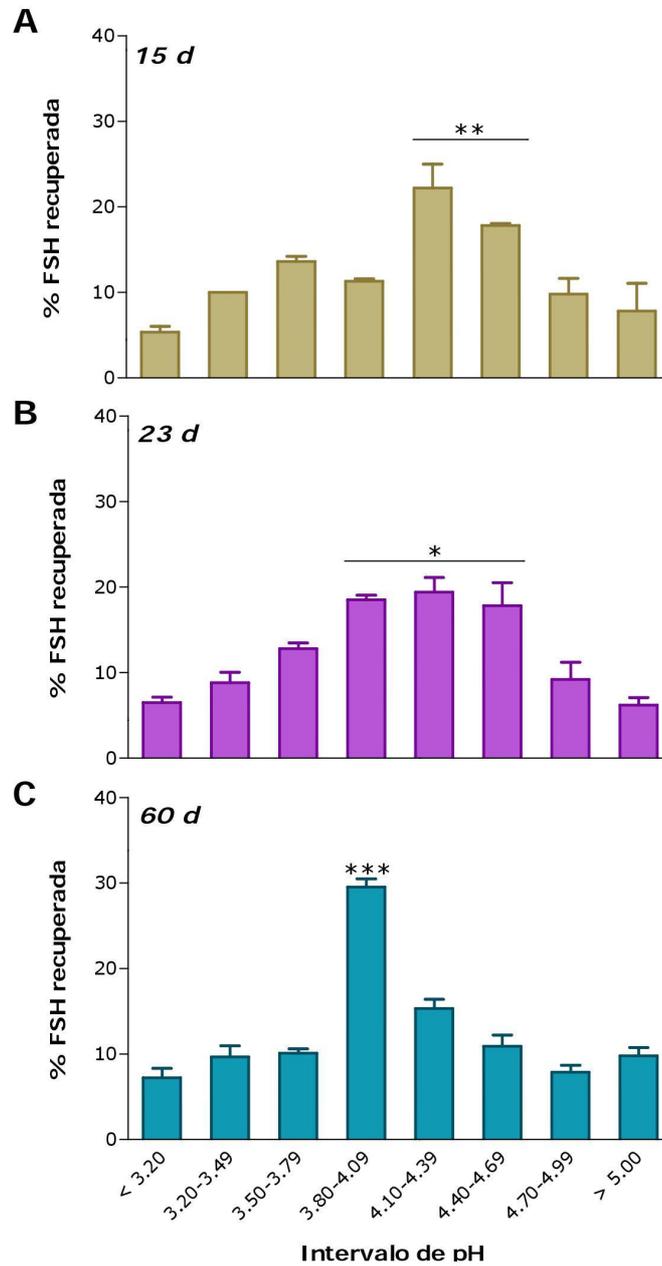
<b>Edad</b> (días)	<b>FSHh</b> (ng/mg tejido)	<b>FSHs</b> (ng/mL)	<b>T</b> (nmol/L)
15	75.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.24 <sup>a</sup>
23	296.0 ± 32.4 <sup>b</sup>	9.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	3.05 ± 0.21 <sup>a</sup>
60	179.0 ± 9.2 <sup>c</sup>	6.6 ± 1.2 <sup>c</sup>	21.06 ± 3.26 <sup>b</sup>

FSHh: FSH hipofisaria; FSHs: FSH sérica; T: testosterona. Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media ± EEM. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

La concentración de FSH hipofisaria y los niveles séricos alcanzaron sus valores máximos en los animales de 23 días ( $p < 0.001$ ). La testosterona sérica se mantuvo sin cambios en los animales de 15 y 23 días y aumentó marcadamente en los animales adultos ( $p < 0.001$ ).

### 2.1.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria

La Figura 28 muestra la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria determinada en animales de las tres edades incluidas en este estudio.



**Figura 28:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria en ratas macho en diferentes estadios del desarrollo sexual. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.29 unidades de pH, en ratas de 15 (panel A), 23 (panel B) y 60 (panel C) días de edad. Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. Proporción predominante de hormona aislada en intervalos de pH: 4.10-4.69, \*\*  $p < 0.01$  (panel A); 3.80-4.69, \*  $p < 0.05$  (panel B) y 3.80-4.09, \*\*\*  $p < 0.001$  (panel C).

En todos los estadios del desarrollo sexual estudiados, la FSH se aisló entre pH 2.17 y 6.39; sin embargo, se observaron variaciones en la proporción relativa de los análogos de carga de FSH hipofisaria asociadas con la edad (Figura 28). En ratas de 15 días de edad, la proporción predominante de FSH hipofisaria ( $40.0 \pm 2.2 \%$ ,  $p < 0.01$ ) se aisló en el intervalo de pH 4.10-4.69; en animales de 23 días la proporción predominante se aisló en un intervalo de pH más amplio: 3.80-4.69, y correspondió al  $55.7 \pm 0.4 \%$  ( $p < 0.05$ ) de la hormona total recuperada. En ratas adultas la proporción predominante se aisló en un intervalo de pH más acotado y en una proporción menor que los descritos en las condiciones mencionadas anteriormente: pH: 3.80-4.09 ( $29.5 \pm 1.0 \%$ ,  $p < 0.001$ ).

## **2.2 Microheterogeneidad molecular de FSH hipofisaria en animales castrados**

En este estudio se incluyeron ratas adultas (60 días de edad) intactas (C) y luego de 2, 5, 10 y 20 días de castración (Cx<sub>2</sub>, Cx<sub>5</sub>, Cx<sub>10</sub> y Cx<sub>20</sub>, respectivamente). Los periodos de castración fueron establecidos en base a un trabajo preliminar, donde se evaluaron periodos de hasta 40 días post-castración; estos resultados mostraron que durante periodos de castración superiores a los 20 días, permanecen sin cambios las características de la microheterogeneidad molecular de FSH inducidas por la ausencia de gonada que se manifiestan a partir de los 2 días de castración.

### **2.2.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos**

La Tabla 6 muestra la concentración de FSH hipofisaria y el perfil hormonal sérico luego de diferentes periodos de castración en ratas adultas.

**Tabla 6:** Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos en ratas adultas intactas y luego de distintos periodos de castración.

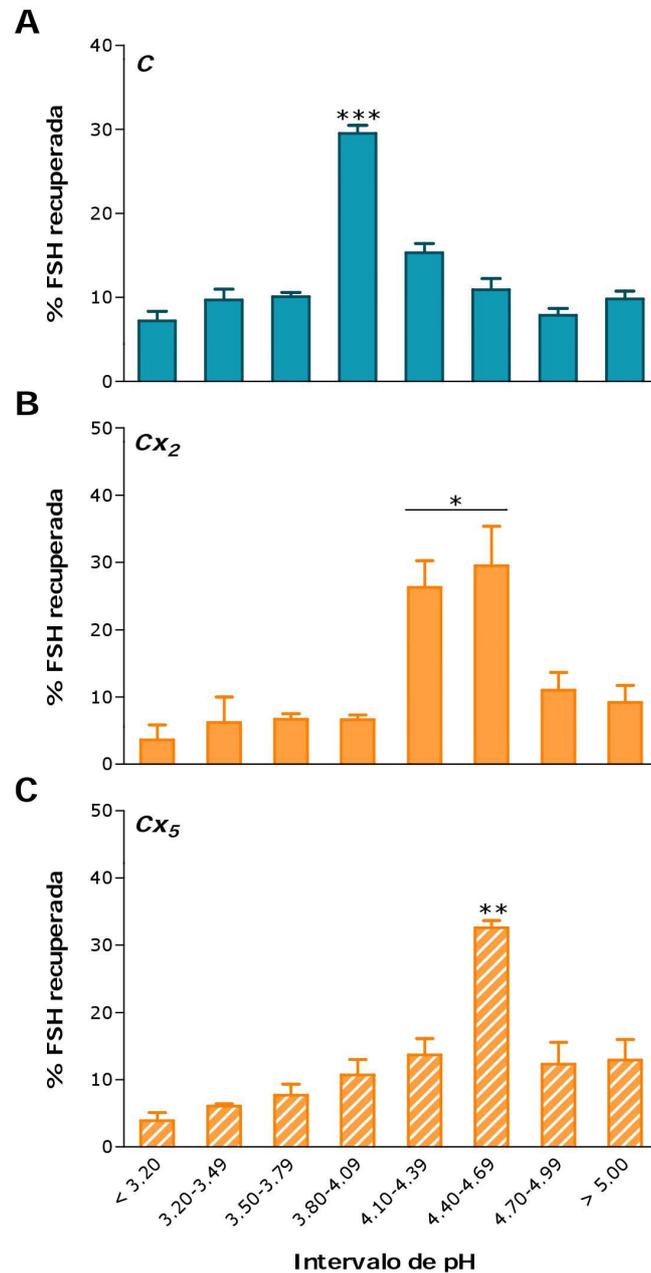
Grupos experimentales	FSHh	FSHs	T
	(ng/mg tejido)	(ng/mL)	(nmol/L)
C	179.0 ± 9.2 <sup>a</sup>	6.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	21.06 ± 3.26 <sup>a</sup>
Cx <sub>2</sub>	129.5 ± 8.1 <sup>b,c</sup>	14.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.10 <sup>b</sup>
Cx <sub>5</sub>	116.0 ± 9.6 <sup>b</sup>	16.4 ± 1.0 <sup>b</sup>	1.84 ± 0.45 <sup>b</sup>
Cx <sub>10</sub>	173.5 ± 17.9 <sup>a,c</sup>	19.6 ± 0.8 <sup>c</sup>	1.87 ± 0.24 <sup>b</sup>
Cx <sub>20</sub>	271.7 ± 17.0 <sup>d</sup>	21.5 ± 1.3 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.31 <sup>b</sup>

FSHh: FSH hipofisaria; FSHs: FSH sérica; T: testosterona. C: ratas adultas intactas; Cx: ratas adultas con distintos periodos de castración (ver subíndice). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media ± EEM. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

Luego de dos días de realizada la castración se observó una disminución significativa en la concentración de FSH hipofisaria que se mantuvo hasta los 5 días post-castración; sin embargo, estos niveles recuperaron los valores de los animales intactos a los 10 días de castración, resultando significativamente aumentados a los 20 días. Los niveles séricos de FSH se elevaron inmediatamente después de la gonadectomía y se mantuvieron elevados durante los períodos estudiados ( $p < 0.01$ ). La testosterona circulante disminuyó significativamente luego de dos días de la cirugía manteniéndose en los mismos niveles en todos los períodos post-castración estudiados ( $p < 0.001$ ).

### 2.2.2 Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria

La Figura 29 muestra el efecto de 2 y 5 días de ausencia de gonada sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria en ratas adultas. El perfil de distribución de análogos de carga luego de 10 y 20 días de castración no presentó diferencias respecto del observado luego de 5 días de castración; por este motivo los resultados no han sido incluidos en la figura.

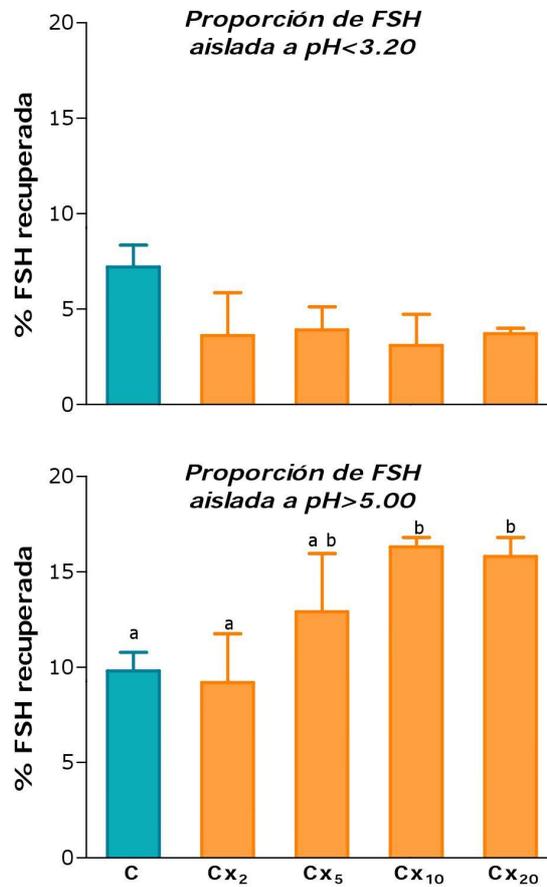


**Figura 29:** Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria en ratas macho adultas. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.29 unidades de pH, en ratas adultas intactas (C, panel A) y luego de 2 y 5 días de castración (Cx<sub>2</sub> y Cx<sub>5</sub>, paneles B y C, respectivamente). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. Proporción predominante de hormona aislada en intervalos de pH: 3.80-4.09, \*\*\*  $p < 0.001$  (panel A), 4.10-4.69, \* $p < 0.05$  (panel B) y 4.40-4.69, \*\* $p < 0.01$  (panel C).

La castración indujo cambios en el perfil de distribución de los análogos de carga de FSH hipofisaria, respecto de los animales adultos intactos.

En todos los periodos de castración estudiados, el intervalo de pH en el cual se aisló la proporción de hormona predominante fue más alto que el descrito en los animales intactos. Luego de 2 días de castración ( $Cx_2$ ), la proporción predominante de FSH ( $55.8 \pm 0.4$  % del total de la hormona recuperada,  $p < 0.05$ ) se aisló en un intervalo de pH más amplio respecto del observado en las otras condiciones experimentales estudiadas: 4.10-4.69. En los periodos de castración 5, 10 y 20 días la proporción predominante de hormona se aisló en un intervalo de pH más acotado: 4.40-4.69 ( $Cx_5$ :  $32.6 \pm 1.0$  %,  $p < 0.01$ ;  $Cx_{10}$ :  $34.9 \pm 2.5$  %,  $p < 0.001$  y  $Cx_{20}$ :  $31.1 \pm 0.6$  %,  $p < 0.001$ ).

Cuando se analizó la abundancia relativa de hormona aislada en los extremos del gradiente de pH luego de la castración, se observó una tendencia a la disminución de esta proporción a pH menor de 3.20: C:  $7.2 \pm 1.1$  % vs  $Cx_2$ :  $3.2 \pm 2.3$  %,  $Cx_5$ :  $3.9 \pm 1.2$  %,  $Cx_{10}$ :  $3.1 \pm 1.6$  % y  $Cx_{20}$ :  $3.7 \pm 0.2$  % (Figura 30, panel A). Concomitantemente, la proporción de hormona aislada a pH mayor de 5.00 aumentó significativamente luego de los 10 días post gonadectomía: C:  $9.8 \pm 1.0$  % vs  $Cx_{10}$ :  $16.3 \pm 0.5$  % y  $Cx_{20}$ :  $15.8 \pm 1.0$  %,  $p < 0.01$  (Figura 30, panel B).

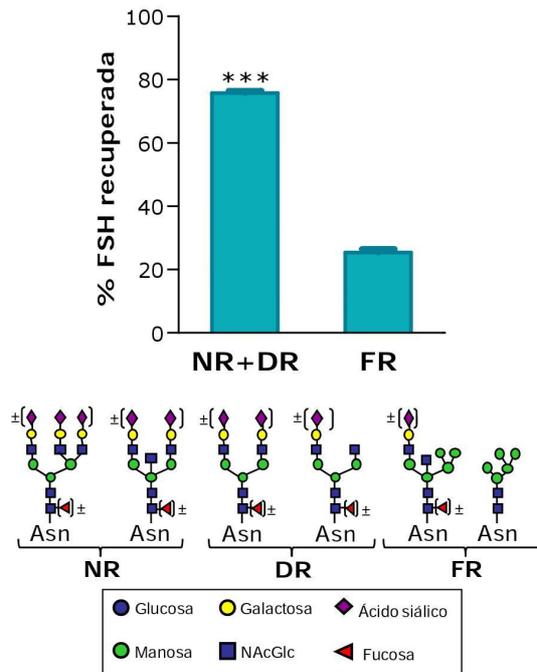


**Figura 30:** Proporción de FSH aislada en los extremos del gradiente de pH. Se muestra la proporción de hormona (% del total de FSH recuperada) aislada a pH menor de 3.20 (panel A) y pH mayor de 5.00 (panel B) en ratas adultas intactas (C) y luego de distintos periodos de castración (Cx). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ).

### 2.2.3 Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de glicoformas de FSH hipofisaria con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos

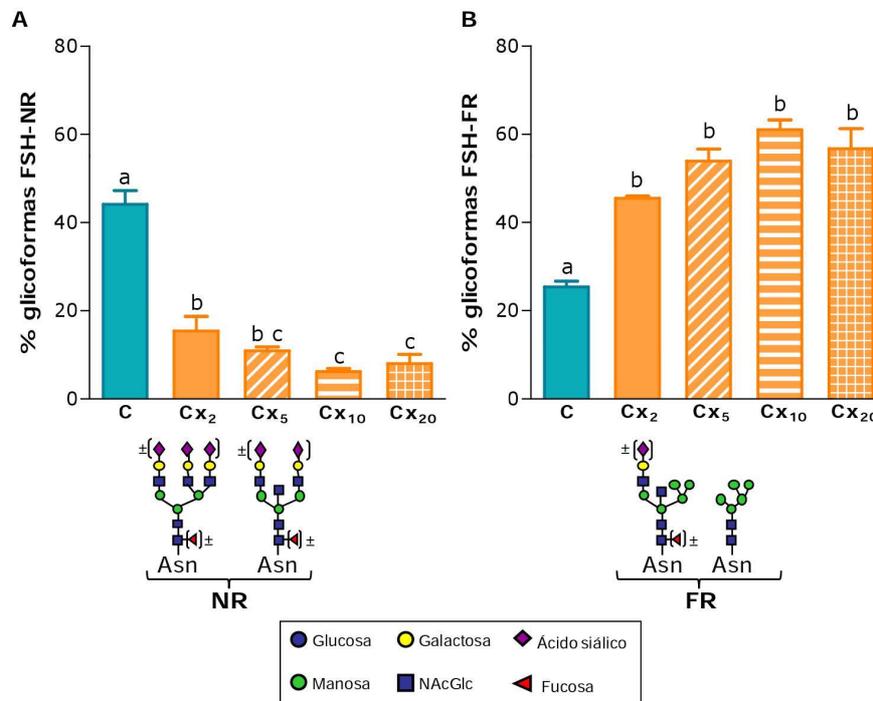
En ratas adultas intactas, se observó un predominio de glicoformas de FSH con oligosacáridos de tipo complejo (NR+DR), mientras que las glicoformas con oligosacáridos con menor grado de procesamiento, de tipo híbrido y de alto

contenido en manosa (FR), estuvieron presentes en menor proporción: NR:  $44.1 \pm 6.2$  + DR:  $30.5 \pm 5.8$  vs FR:  $25.4 \pm 2.2$  %,  $p < 0.001$  (Figura 31).



**Figura 31:** Abundancia relativa de glicofomas de FSH hipofisaria con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos en ratas adultas. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSH con oligosacáridos complejos (NR+DR) y fuertemente retenidas por la lectina (FR). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*\*\*:  $p < 0.001$  NR+DR vs FR.

La castración afectó las características del perfil de distribución de glicofomas de FSH hipofisaria (Figura 32).



**Figura 32:** Efecto de la castración sobre la abundancia relativa de glicofomas de FSH hipofisaria con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos en ratas adultas. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de glicofomas de FSH no retenidas por la lectina (NR, panel A) y fuertemente retenidas por la lectina (FR, panel B). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

En todos los períodos de castración analizados se observó una disminución significativa de la abundancia relativa de glicofomas con oligosacáridos altamente ramificados (NR): C:  $44.1 \pm 6.2$  vs Cx<sub>2</sub>:  $15.4 \pm 4.7$ , Cx<sub>5</sub>:  $10.9 \pm 2.1$ , Cx<sub>10</sub>:  $6.2 \pm 1.4$  y Cx<sub>20</sub>:  $8.0 \pm 3.7$  %,  $p < 0.001$  (Figura 32, panel A). Concomitantemente, se observó un aumento en la proporción de glicofomas con oligosacáridos con menor grado de procesamiento (FR): C:  $25.4 \pm 2.2$  vs Cx<sub>2</sub>:  $45.5 \pm 0.7$ , Cx<sub>5</sub>:  $53.9 \pm 6.8$ , Cx<sub>10</sub>:  $61.0 \pm 4.4$  y Cx<sub>20</sub>:  $56.7 \pm 7.8$  %,  $p < 0.01$  (Figura 32, panel B).

Cabe señalar que la proporción de glicofomas con cadenas carbohidratadas biantenarias y truncadas (DR) no resultó afectada por la castración: C:  $30.5 \pm 5.8$  vs Cx<sub>2</sub>:  $39.1 \pm 4.1$ , Cx<sub>5</sub>:  $35.2 \pm 6.2$ , Cx<sub>10</sub>:  $32.8 \pm 4.6$  y Cx<sub>20</sub>:  $35.3 \pm 8.9$  % (NS).

---

### **2.3 Grado de sialización de FSH hipofisaria en ratas macho adultas castradas. Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH**

En este estudio se utilizaron ratas adultas (60 días de edad), las cuales se castraron y fueron sacrificadas luego de 2 días de tratamiento con andrógenos y/o antagonista de GnRH, iniciado inmediatamente después de la cirugía. Se eligió este periodo de castración ya que resultó el menor tiempo al cual se observaron cambios significativos en los parámetros estudiados, los cuales no se modificaron a tiempos de castración más prolongados. Los animales se dividieron en tres grupos: Cx<sub>2</sub>+PT, a los cuales se les administró el andrógeno; Cx<sub>2</sub>+antGnRH, un antagonista de GnRH y Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH la combinación de ambas hormonas, según se detalla en Materiales y Métodos (ítem 3).

#### **2.3.1 Concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos**

La Tabla 7 muestra la concentración de FSH hipofisaria y el perfil hormonal sérico luego de los diferentes tratamientos administrados a las ratas adultas castradas.

**Tabla 7:** Efecto de los tratamientos sobre la concentración de FSH hipofisaria y niveles de FSH y testosterona séricos en ratas adultas castradas

Grupos experimentales	FSHh (ng/mg tejido)	FSHs (ng/mL)	T (nmol/L)
Cx <sub>2</sub>	129.5 ± 8.1 <sup>a</sup>	15.9 ± 0.70 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.10 <sup>a</sup>
Cx <sub>2</sub> +PT	181.3 ± 12.6 <sup>b</sup>	4.34 ± 0.45 <sup>b</sup>	18.36 ± 0.81 <sup>b</sup>
Cx <sub>2</sub> +antGnRH	133.2 ± 12.4 <sup>a</sup>	2.81 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.14 <sup>a</sup>
Cx <sub>2</sub> +PT+antGnRH	167.1 ± 7.9 <sup>b</sup>	4.61 ± 1.15 <sup>b</sup>	14.50 ± 1.07 <sup>b</sup>

FSHh: FSH hipofisaria; FSHs: FSH sérica; T: testosterona. Los resultados se expresan como media ± EEM de 3 experimentos independientes en cada condición experimental. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

La concentración hipofisaria de FSH aumentó en los grupos que recibían testosterona respecto del grupo castrado, ya sea cuando se administró como única hormona o en combinación con el antagonista de GnRH (Cx<sub>2</sub>+PT y Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH vs Cx<sub>2</sub>  $p < 0.01$ ).

Los niveles séricos de FSH disminuyeron luego de la administración del andrógeno y/o el antagonista de GnRH respecto de los valores observados en animales con 2 días de castración ( $p < 0.001$ ).

La administración de PT elevó los niveles de andrógeno circulantes a valores similares a los descriptos en los animales intactos (C: 21.06 ± 3.26 vs Cx<sub>2</sub>+PT: 18.36 ± 1.80 y Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH: 14.50 ± 1.07 nmol/L, NS). Los niveles de testosterona en el grupo de animales castrados que recibieron solamente el antagonista de GnRH, no se diferenciaron de los niveles observados luego de 2 días de castración.

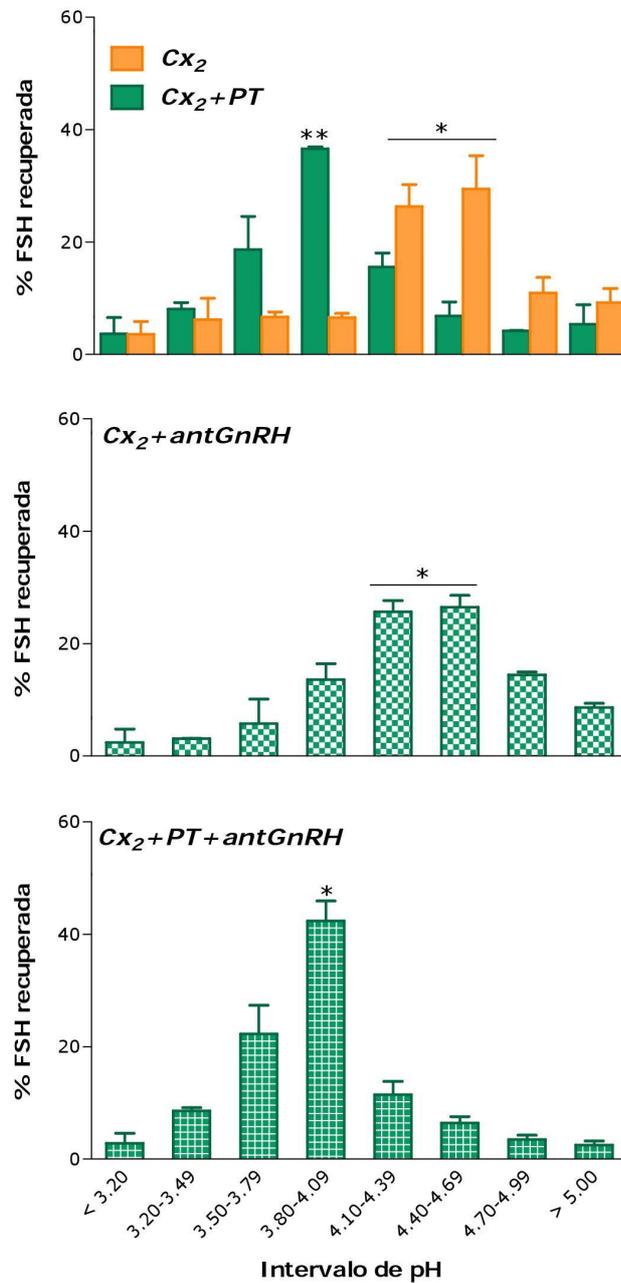
### **2.3.2 Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria**

La Figura 33 muestra la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria luego de los tratamientos en ratas adultas castradas.

La administración del andrógeno a ratas castradas produjo un cambio en el intervalo en el cual se aisló la proporción predominante de hormona; el  $36.6 \pm 0.5$  % de la hormona se aisló en el intervalo 3.80-4.09 ( $p < 0.01$ ; Figura 33, panel A). Este perfil resultó similar al descrito en animales adultos intactos (ítem 2.2.2).

Por otro lado, en las ratas castradas tratadas con un antagonista de GnRH la proporción predominante de FSH se aisló en el intervalo de pH 4.10-4.69, correspondiendo al  $52.2 \pm 6.1$  % de la hormona recuperada ( $p < 0.05$ ; Figura 33, panel B). Este perfil de distribución de análogos de carga resultó similar al obtenido en los animales con 2 días de castración (ítem 2.2.2).

Cuando se combinaron ambos tratamientos (PT + antagonista de GnRH) el perfil de distribución de análogos de carga de FSH fue similar al obtenido en el grupo tratado con andrógeno y también al descrito en animales intactos (ítem 2.2.2). La proporción predominante de hormona se aisló en el intervalo de pH 3.80-4.09, correspondiendo al  $42.4 \pm 3.5$  % de la hormona recuperada ( $p < 0.01$ ; Figura 33, panel C).



**Figura 33:** Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH sobre la abundancia relativa de análogos de carga de FSH hipofisaria en ratas adultas castradas. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.29 unidades de pH, en ratas adultas castradas (Cx<sub>2</sub>, panel A), luego de la administración de propionato de testosterona (Cx<sub>2</sub>+PT, panel A), un antagonista de GnRH (Cx<sub>2</sub>+antGnRH, panel B) y la combinación de ambos (Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH, panel C). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media ± EEM. Proporción predominante de hormona aislada en intervalos de pH: 3.80-4.09, \*\* p<0.01 (panel A), 4.10-4.69, \* p<0.05 (panel A y B) y 3.80-4.09, \* p<0.05 (panel C).

Si bien no se observaron diferencias significativas en la proporción de hormona aislada en los extremos del gradiente de pH (pH menor de 3.20 y mayor de 5.00) luego de 2 días de castración, es importante señalar que, como se mostró previamente en el ítem 2.2.2, las diferencias en el extremo superior del gradiente de pH alcanzaron significancia estadística a partir de los 10 días de castración.

## Capítulo III

### Regulación hormonal de la expresión de sialiltransferasas hipofisarias en ratas macho

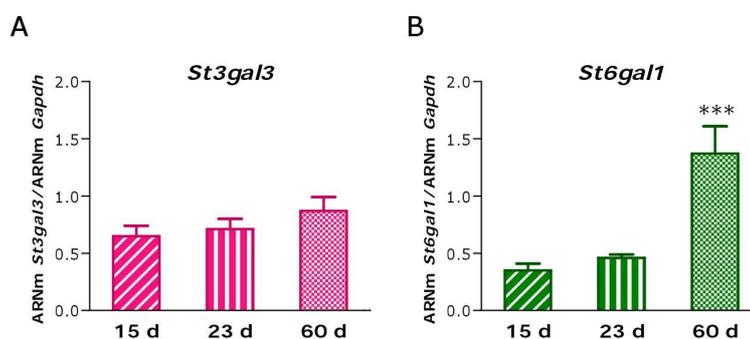
En el Capítulo anterior se describió que durante el desarrollo sexual de la rata macho aumenta el grado de sialización de la FSH hipofisaria. La castración de animales adultos induce la síntesis de FSH con menor grado de sialización; estos cambios pueden ser revertidos por la administración de testosterona.

En base a estos hallazgos, es posible postular que el entorno hormonal regularía la expresión de las enzimas hipofisarias responsables de la incorporación de ácido siálico, afectando así el grado de sialización de la gonadotropina.

El siguiente objetivo de la presente Tesis fue determinar el posible efecto de los cambios en el entorno hormonal -durante el desarrollo sexual, luego de la castración y en animales tratados con andrógenos y un antagonista de GnRH- sobre la expresión génica de *St3gal3* y *St6gal1* en hipófisis de ratas macho.

#### 3.1 Expresión génica de sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1* en distintos estadios del desarrollo sexual

La Figura 34 muestra la expresión génica de las sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1* determinada en hipófisis provenientes de ratas de 15, 23 y 60 días de edad.



**Figura 34:** Expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias *St3gal3* (panel A) y *St6gal1* (panel B) relativas al ARNm de *Gapdh* en ratas en distintos estadios del desarrollo sexual. Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*\*\*  $p < 0.001$ : 60 vs 15 y 23 días de edad.

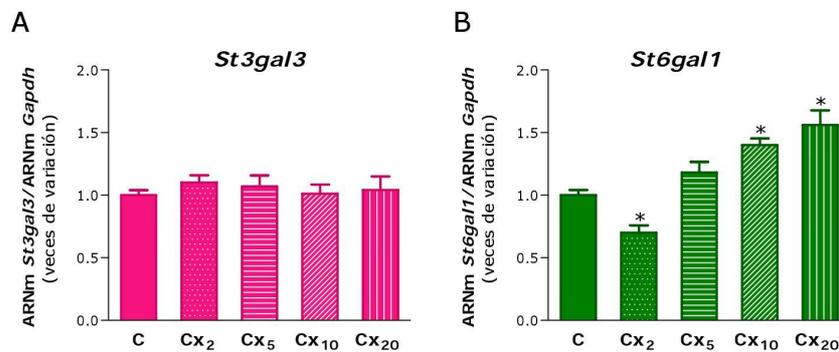
La expresión génica de la sialiltransferasa *St3gal3* no presentó variaciones significativas en los diferentes estadios del desarrollo sexual ( $0.69 \pm 0.09$ ,  $0.71 \pm 0.09$  y  $0.87 \pm 0.12$  para animales de 15, 23 y 60 días de edad, respectivamente; NS).

Contrariamente, la expresión génica de la sialiltransferasa *St6gal1* aumentó significativamente en ratas adultas respecto de las más jóvenes ( $0.35 \pm 0.06$ ,  $0.46 \pm 0.03$  y  $1.37 \pm 0.24$  para animales de 15, 23 y 60 días de edad, respectivamente;  $p < 0.001$ ).

## 3.2 Efecto de los distintos tiempos de castración sobre la expresión de las sialiltransferasas hipofisarias

### 3.2.1 Expresión génica de sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1*

En coincidencia con los resultados obtenidos durante el desarrollo sexual, los niveles del ARNm de la enzima *St3gal3* no presentaron cambios luego de la castración de animales adultos: Cx<sub>2</sub>:  $1.1 \pm 0.1$ , Cx<sub>5</sub>:  $1.07 \pm 0.15$ , Cx<sub>10</sub>:  $1.01 \pm 0.13$  y Cx<sub>20</sub>:  $1.04 \pm 0.19$  veces respecto del control (Figura 35).

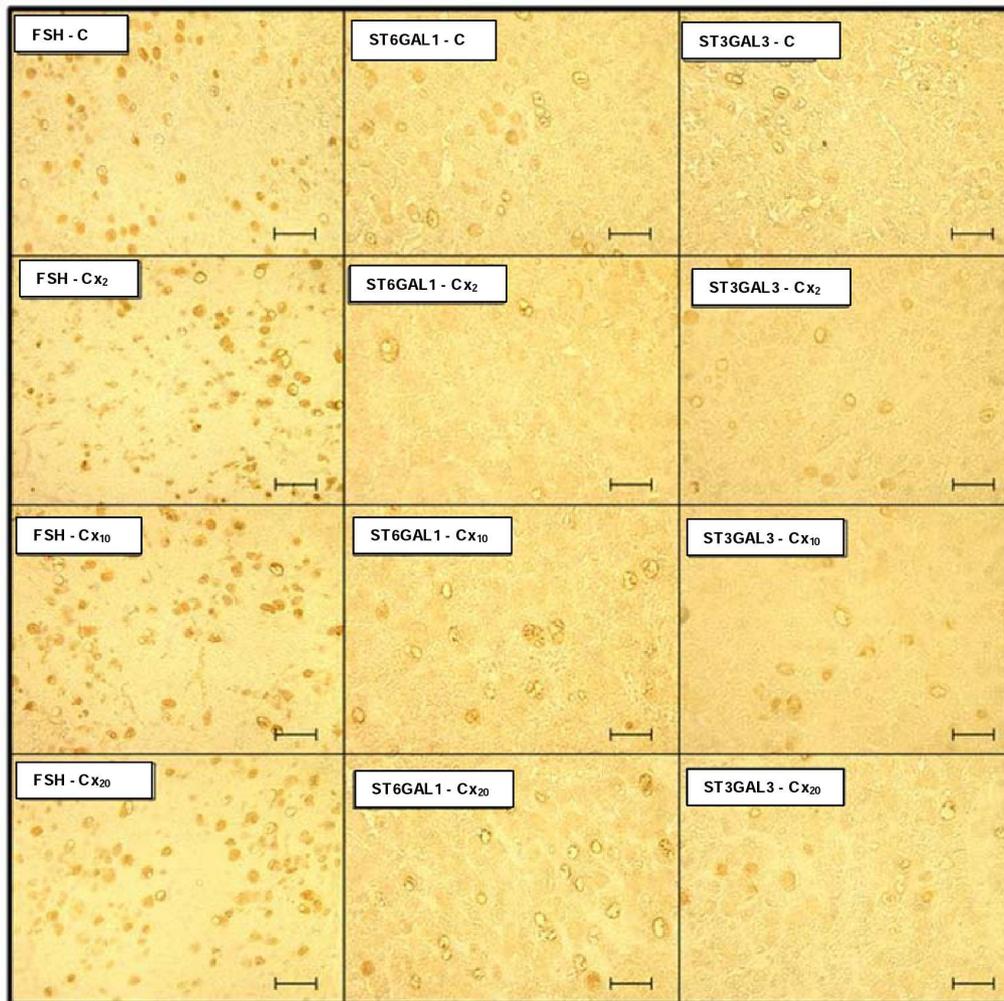


**Figura 35:** Efecto de la castración sobre la expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias *St3gal3* (panel A) y *St6gal1* (panel B) relativas al ARNm de *Gapdh* en ratas adultas intactas (C) y luego de distintos periodos de castración (Cx<sub>2</sub>, Cx<sub>5</sub>, Cx<sub>10</sub> y Cx<sub>20</sub>). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media ± EEM. \* p<0.05 respecto de ratas adultas intactas.

Por el contrario, la expresión génica de la sialiltransferasa *St6gal1* disminuyó en forma transitoria luego de 2 días de castración (Cx<sub>2</sub>: 0.7 ± 0.1 veces respecto de C, p<0.05); posteriormente, mostró un aumento progresivo hasta alcanzar los 20 días de castración (Cx<sub>5</sub>: 1.18 ± 0.15, Cx<sub>10</sub>: 1.40 ± 0.09, Cx<sub>20</sub>: 1.56 ± 0.2 veces respecto de C, p<0.05; Figura 35).

### 3.2.2 Detección de sialiltransferasas por inmunohistoquímica

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para evaluar la presencia de las sialiltransferasas en cortes de tejido hipofisario proveniente de animales adultos intactos y con 2, 5, 10 y 20 días de castración. En la Figura 36 se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos en este estudio.



**Figura 36:** Microfotografías de inmunohistoquímica de FSH y de sialiltransferasas ST3GAL3 y ST6GAL1 en cortes de hipófisis de ratas macho adultas intactas (C) y con distintos periodos de castración (Cx<sub>2</sub>, Cx<sub>10</sub> y Cx<sub>20</sub>). Se muestran campos representativos de la inmunomarcación para FSH, ST3GAL3 y ST6GAL1. Escala en A: 60  $\mu$ m; escala en B y C: 35  $\mu$ m.

Se evaluaron la densidad de volumen y la densidad de células descriptos en el ítem 7 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

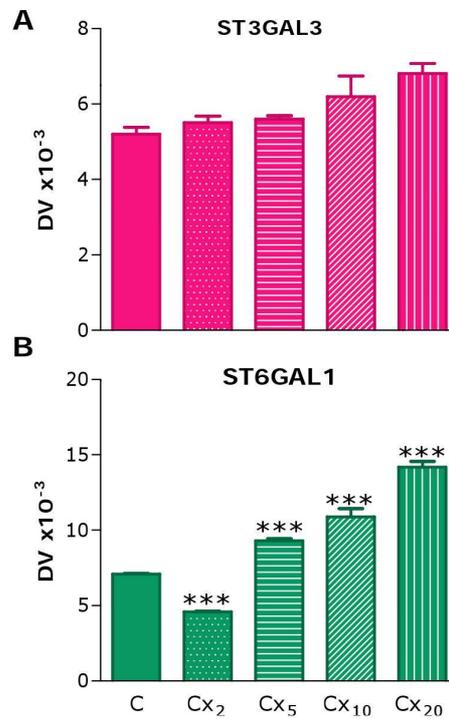
**Tabla 8:** Valores de densidad de volumen y densidad de células en cortes de tejido hipofisario de ratas adultas intactas y castradas luego de distintos periodos de castración.

Grupos experimentales	DV ( $\times 10^{-2}$ )	DC ( $\times 10^{-4}$ )
C	$7.2 \pm 0.2^a$	$5.7 \pm 0.1^a$
CX <sub>2</sub>	$8.0 \pm 0.1^a$	$6.5 \pm 0.1^b$
CX <sub>5</sub>	$11.2 \pm 0.6^b$	$7.3 \pm 0.1^b$
CX <sub>10</sub>	$11.8 \pm 1.1^b$	$7.0 \pm 0.3^b$
CX <sub>20</sub>	$18.8 \pm 0.6^c$	$9.8 \pm 0.3^c$

DV: densidad de volumen; DC: densidad de células ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ); C: ratas adultas intactas; CX<sub>2</sub>, CX<sub>5</sub>, CX<sub>10</sub> y CX<sub>20</sub>: ratas adultas con 2, 5, 10 y 20 días de castración, respectivamente. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes realizados con triplicados de cada condición experimental. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La detección de FSH por medio de su anticuerpo específico en los cortes de tejido analizado se localizó en células sólidas y vacuoladas con patrón citoplasmático granular difuso, característico de células gonadotropas. En el tejido proveniente de animales adultos intactos, se observaron áreas con regular cantidad de gonadotropos alternando con áreas sin gonadotropos. Luego de 5 días de castración, la cantidad de estas células aumentó progresivamente hasta alcanzar los valores más elevados de DV y DC a los 20 días posteriores a la castración (Figura 36, panel A y Tabla 8).

La Figura 37 muestra el efecto de castración sobre la densidad de volumen en las inmunomarcaciones de las sialiltransferasas ST3GAL3 y ST6GAL1.



**Figura 37:** Valores de densidad de volumen (DV) de ST3GAL3 (panel A) y ST6GAL1 (panel B) en cortes de hipófisis de ratas adultas intactas (C) y luego de distintos periodos de castración (Cx<sub>2</sub>, Cx<sub>5</sub>, Cx<sub>10</sub> y Cx<sub>20</sub>). Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*\*\*  $p < 0.001$  respecto de ratas adultas intactas.

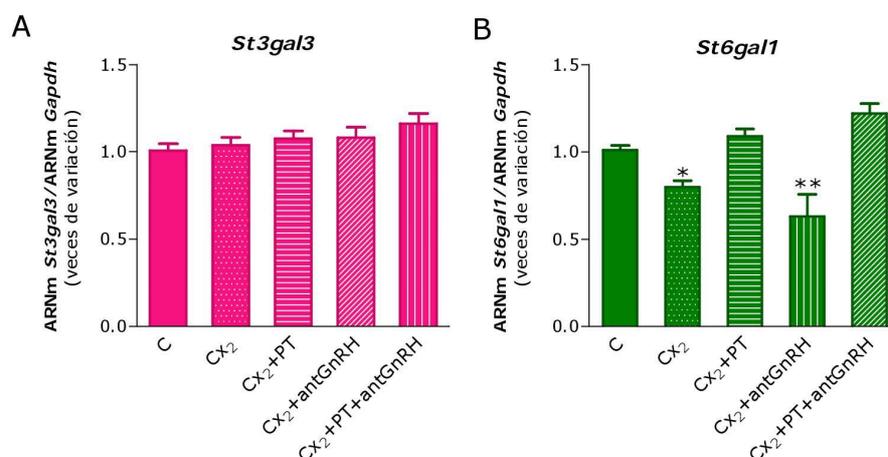
Se observó la presencia de la sialiltransferasa ST3GAL3, evidenciada como gránulos de color ocre localizados en el citoplasma de células vacuoladas, correspondientes a gonadotropos (Figura 36, panel B). No se observaron diferencias significativas en la densidad de volumen de los cortes de hipófisis provenientes de los animales intactos y castrados: C:  $5.2 \pm 0.4 \times 10^{-3}$  vs Cx<sub>2</sub>:  $5.5 \pm 0.4 \times 10^{-3}$ , Cx<sub>5</sub>:  $5.6 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ , Cx<sub>10</sub>:  $6.2 \pm 1.2 \times 10^{-3}$  y Cx<sub>20</sub>:  $6.8 \pm 0.6 \times 10^{-3}$  (NS; Figura 37, panel A), indicando que no hubo variaciones en la cantidad de células positivas para esta sialiltransferasa entre los distintos grupos experimentales.

En los cortes de tejido provenientes de animales adultos intactos se observó la presencia de sialiltransferasa ST6GAL1 en una cantidad considerable de gonadotropos, mayor en relación a la observada en el mismo grupo para la

sialiltransferasa ST3GAL3 (Figura 36, panel C). Luego de 2 días de castración, se observaron escasas células inmunopositivas para la sialiltransferasa ST6GAL1. A partir de los 5 días de castración se detectó un incremento progresivo en la cantidad de gonadotropos positivos, como se reflejó en los valores de DV: C:  $7.1 \pm 0.1 \times 10^{-3}$  vs Cx<sub>5</sub>:  $9.3 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ , Cx<sub>10</sub>:  $10.9 \pm 1.2 \times 10^{-3}$  y Cx<sub>20</sub>:  $15.3 \pm 0.7 \times 10^{-3}$  ( $p < 0.05$ ; Figura 37, panel B).

### 3.3 Efecto de la administración de andrógenos y/o un antagonista de GnRH a ratas adultas castradas

Se determinó el efecto de la administración de PT y/o antGnRH sobre la expresión génica de las sialiltransferasas en estudio (Figura 38).



**Figura 38:** Efecto de de la administración de andrógenos y/o antagonista de GnRH sobre la expresión génica de las sialiltransferasas hipofisarias *St3gal3* y *St6gal1*. Se analizaron ratas adultas intactas (C), luego de 2 días de castración (Cx<sub>2</sub>) y de la administración de propionato de testosterona (Cx<sub>2</sub>+PT), un antagonista de GnRH (Cx<sub>2</sub>+antGnRH) y la combinación de ambos (Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH). Se muestra la expresión génica del ARNm de las sialiltransferasas *St3gal3* (panel A) y *St6gal1* (panel B) relativa al ARNm de *Gapdh*. Se muestran los resultados obtenidos por triplicado en tres experimentos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  respecto de C.

El reemplazo hormonal no afectó la expresión génica de la enzima *St3gal3* (Cx<sub>2</sub>: 1.04 ± 0.10, Cx<sub>2</sub>+PT: 1.08 ± 0.11, Cx<sub>2</sub>+antGnRH: 1.08 ± 0.14 y Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH: 1.16 ± 0.15 veces respecto de C, NS).

Por el contrario, la administración del andrógeno, recuperó la expresión génica de la sialiltransferasa *St6gal1* observada en los animales adultos intactos (Cx<sub>2</sub>+PT: 1.09 ± 0.07 veces respecto de C, NS). El antagonista de GnRH en ausencia de testosterona no fue capaz de revertir el efecto de la castración sobre la expresión de esta enzima (Cx<sub>2</sub>+antGnRH: 0.63 ± 0.18 veces respecto de C, p<0.01). Cuando se combinaron ambos tratamientos (PT + antGnRH) la expresión de *St6gal1* fue similar a la obtenida en los animales intactos (Cx<sub>2</sub>+PT+antGnRH: 1.22 ± 0.08 veces respecto de C, NS).

## Capítulo IV

### **Efecto del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras**

Como se describió en los capítulos previos, la regulación hormonal del grado de sialización de la hormona y la distribución relativa de los análogos de carga sintetizados en estadios específicos de la maduración gonadal, sugieren que los procesos de proliferación y maduración de las células de Sertoli requerirían el estímulo de variantes de glicosilación de FSH con biopotencia variable. Sin embargo, el efecto de las diferencias en la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH sobre la actividad endócrina de las células de Sertoli aún no ha sido estudiado.

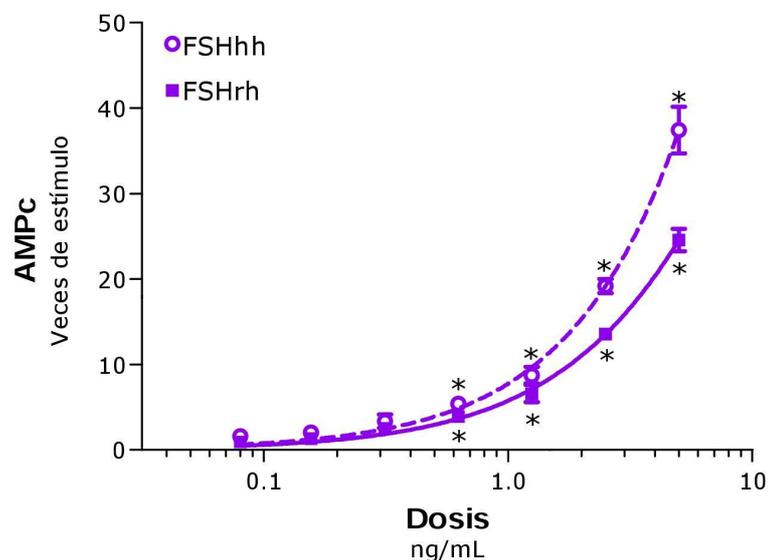
El objetivo del presente capítulo consistió en explorar el efecto del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endócrina de la célula de Sertoli en términos de producción de AMPc, estradiol, inhibina B y del precursor de la subunidad alfa de inhibina, Pro- $\alpha$ C.

Se utilizó un cultivo de células de Sertoli inmaduras, aisladas de ratas de 8 días de edad, las cuales se caracterizan por su alta capacidad de respuesta a la FSH tanto en su actividad proliferativa como en la producción de esteroides y péptidos. La respuesta de las células fue analizada luego del estímulo con dos preparaciones de FSH nativa: FSHrh e FSHhh y con mezclas de análogos de carga de FSHrh con diferente grado de sialización.

## 4.1 Efecto de FSHrh y FSHhh sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras

### 4.1.1 Producción de AMPc

Se determinaron los niveles de AMPc en los medios condicionados de las células de Sertoli inmaduras estimuladas con FSHrh y FSHhh. Los resultados se muestran en la Figura 39.



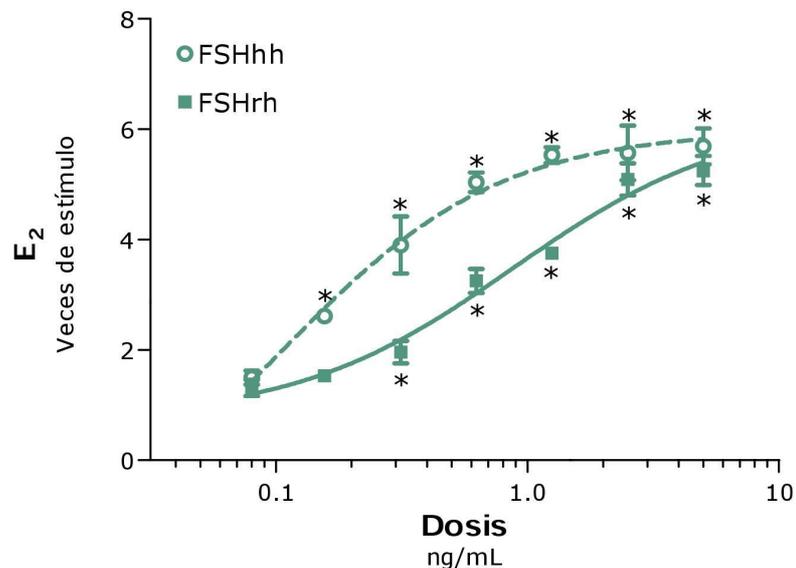
**Figura 39:** Efecto de FSHrh ó FSHhh sobre la producción de AMPc. Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con diferentes dosis de hormona (0.08 a 5 ng/mL en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

Dosis crecientes de FSHrh y FSHhh (0.08, 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5 y 5.0 ng/mL) agregadas al cultivo indujeron una estimulación en forma dosis-dependiente de la producción de AMPc a partir de la dosis 0.63 ng/mL. Los niveles del segundo mensajero fueron: FSHrh:  $13.1 \pm 0.5$  y FSHhh:  $18.2 \pm 2.1$  vs basal:  $3.4 \pm 0.1$  pmol/mL ( $p < 0.05$ ). Cuando se utilizaron dosis más altas de hormona se observaron diferencias en la magnitud de la respuesta al estímulo con ambas

preparaciones de FSHh nativa. El nivel de AMPc determinado en los medios condicionados de los cultivos estimulados con 2.5 ng/mL de FSHrh fue de  $45.7 \pm 1.0$  pmol/mL ( $p < 0.001$ ) y con hormona hipofisaria fue de  $64.5 \pm 2.8$  pmol/mL ( $p < 0.001$ ). Esta diferencia se acentuó a la dosis de 5 ng/mL ya que se detectaron  $86.9 \pm 4.4$  pmol/mL de AMPc con FSHrh y  $126.2 \pm 9.2$  pmol/mL con FSHhh ( $p < 0.001$ ).

#### 4.1.2 Producción de estradiol

La producción de estradiol inducida por ambas gonadotropinas mostró una respuesta dependiente de la dosis, en el rango de concentraciones utilizadas (Figura 40).



**Figura 40:** Efecto de FSHhh ó FSHrh sobre la producción de estradiol ( $E_2$ ). Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con diferentes dosis de hormona (0.08 a 5 ng/mL en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

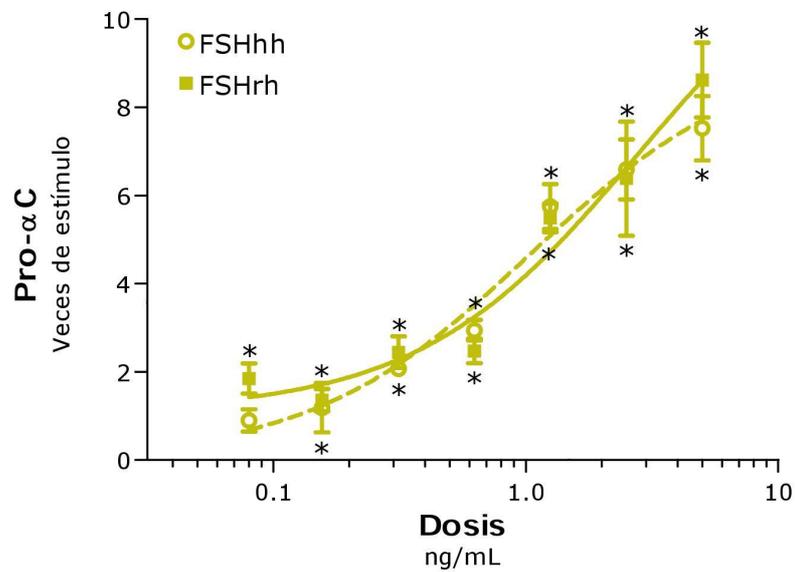
La producción de estradiol inducida por la hormona recombinante resultó aumentada respecto del nivel basal a partir de la dosis de 0.31 ng/mL:  $700 \pm 104$  vs basal  $358 \pm 60$  pg/mL ( $p < 0.05$ ); cuando se utilizó la hormona hipofisaria se observó un aumento significativo en los niveles del esteroide a partir de la dosis de 0.16 ng/mL:  $934 \pm 48$  vs basal  $358 \pm 60$  pg/mL ( $p < 0.05$ ).

Las diferencias en la respuesta de las células de Sertoli al estímulo con ambas gonadotropinas se mantuvieron al utilizar dosis mayores. El agregado de 0.62 ng/mL de FSHrh indujo la producción de  $1164 \pm 112$  pg/mL del esteroide; la misma dosis de FSHhh indujo una mayor producción:  $1806 \pm 88$  pg/mL ( $p < 0.01$ ). Resultados similares se obtuvieron al utilizar la dosis 1.25 ng/mL; FSHrh:  $1344 \pm 7$  pg/mL vs FSHhh:  $1980 \pm 70$  vs ( $p < 0.01$ ). A partir de la dosis 2.5 ng/mL, no se observaron diferencias significativas en el efecto de las dos gonadotropinas ya que con ambas preparaciones se alcanzaría la respuesta máxima; 2.5 ng/mL FSHrh:  $1824 \pm 148$  pg/mL vs FSHhh:  $1994 \pm 250$  vs (NS); 5.0 ng/mL FSHrh:  $1880 \pm 132$  pg/mL vs FSHhh:  $2036 \pm 166$  pg/mL (NS).

Las  $DE_{50}$  obtenidas para cada gonadotropina fueron:  $1.09 \pm 0.09$  para la gonadotropina recombinante y  $0.29 \pm 0.1$  para la FSHhh.

#### **4.1.3 Producción del precursor de subunidad alfa de inhibinas, Pro- $\alpha$ C**

La producción del precursor de la subunidad  $\alpha$  de inhibinas, Pro- $\alpha$ C, estimulada por la FSHrh ó FSHhh fue similar, mostrando en ambos casos una respuesta dosis dependiente (Figura 41).

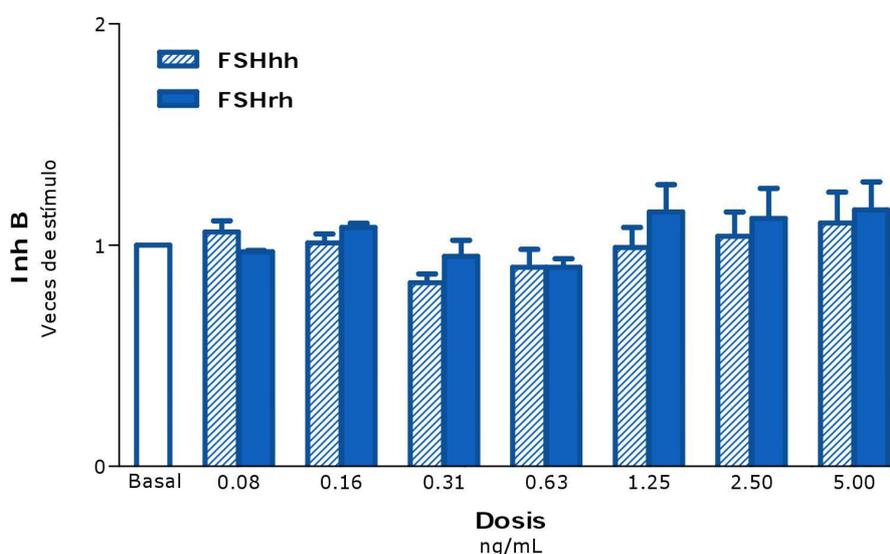


**Figura 41:** Efecto de FSHrh ó FSHhh sobre la producción de Pro- $\alpha$ C. Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con diferentes dosis de hormona (0.08 a 5 ng/mL en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

Los niveles de Pro- $\alpha$ C estimulados por la hormona de origen recombinante resultaron aumentados respecto del nivel basal a partir de la menor dosis utilizada, es decir 0.08 ng/mL:  $196.9 \pm 21.1$  vs  $83.5 \pm 14.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Con la hormona hipofisaria se obtuvo un aumento significativo en los niveles del péptido a partir de la dosis 0.16 ng/mL:  $182.0 \pm 47.1$  vs  $83.5 \pm 14.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.4 Producción de inhibina B

La producción de inhibina B bajo estímulo con la FSHrh o FSHhh en los medios condicionados del cultivo de células de Sertoli inmaduras se muestra en la Figura 42.



**Figura 42:** Efecto de FSHrh ó FSHhh sobre la producción de inhibina B (Inh B). Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con diferentes dosis de hormona (0.08 a 5 ng/mL en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental.

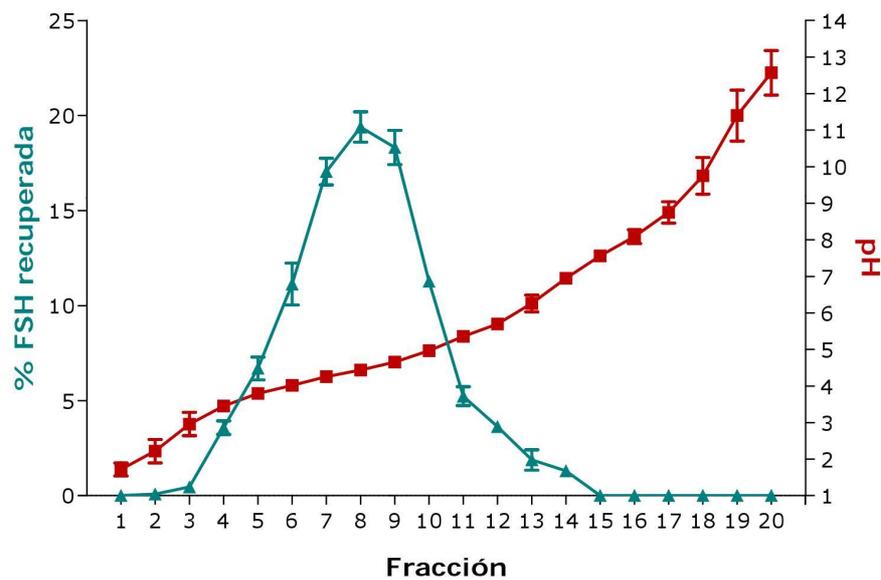
La producción de inhibina B en los medios de cultivo analizados en condiciones basales fue muy elevada:  $1261.4 \pm 131.9$  pg/mL. Esta producción no fue afectada por el agregado de la FSH recombinante ó hipofisaria en el rango de concentraciones utilizadas. Como ejemplo, en presencia de 0.08 ng/mL de FSHrh y FSHhh los niveles de inhibina B fueron  $1141.0 \pm 5.7$  y  $1245.4 \pm 62.4$  pg/mL, respectivamente (NS); cuando se estimuló con la mayor dosis utilizada, los niveles de inhibina B fueron  $1362.0 \pm 150.2$  y  $1302.0 \pm 163.0$  pg/mL para la FSHrh y FSHhh, respectivamente (NS).

#### 4.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh y FSHhh

Se determinó el grado de sialización de las preparaciones de FSH utilizando IEF preparativo, como se ha descrito en Materiales y Métodos.

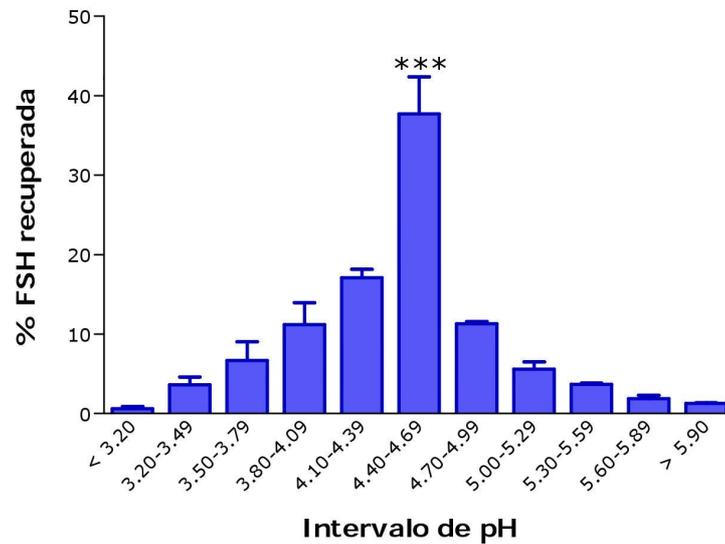
#### 4.2.1 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh

La hormona fue detectada en un rango de pH 2.73-8.22, correspondiente a las fracciones 3 a 16 de un total de 20 obtenidas en cada corrida electroforética (Figura 43). La recuperación fue del  $68 \pm 7 \%$ .



**Figura 43:** Isoelectroenfoque preparativo de FSHrh. ■ Gradiente de pH obtenido combinando anfólitos de pH 3.0-10.0 y 2.5-5.0. ▲ Proporción de FSH recuperada en cada una de las fracciones de la celda de IEF preparativo. Se muestran los resultados de 3 fraccionamientos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM.

La Figura 44 muestra la abundancia relativa de los análogos de carga de FSHrh aislados en intervalos de 0.29 unidades de pH en los fraccionamientos realizados.

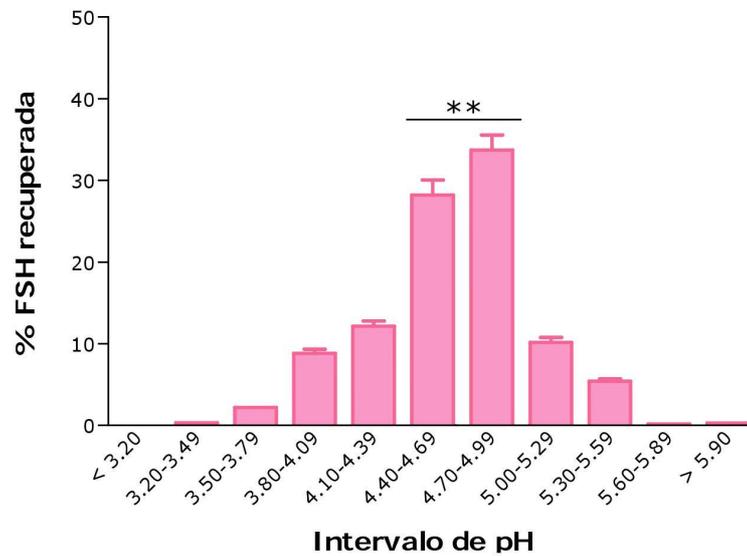


**Figura 44:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSHrh. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.29 unidades de pH obtenidos en 3 fraccionamientos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ : proporción predominante de hormona aislada en el intervalo de pH 4.40-4.69.

La proporción predominante de hormona ( $37.3 \pm 4.7$  %,  $p < 0.001$ ) se recuperó en un intervalo de pH muy acotado: 4.40-4.69.

#### 4.2.2 Abundancia relativa de análogos de carga de FSHhh

La Figura 45 muestra la abundancia relativa de los análogos de carga de FSHhh en los fraccionamientos realizados. La recuperación de la hormona fue del  $52 \pm 8$  %.



**Figura 45:** Abundancia relativa de análogos de carga de FSHhh. Se muestra la proporción (% del total de FSH recuperada) de análogos de carga de FSH en intervalos de 0.29 unidades de pH obtenidos en 2 fraccionamientos independientes, expresados como media  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0.01$ : proporción predominante de hormona aislada en el intervalo de pH 4.40-4.99.

La hormona fue detectada en un rango de pH 3.23-7.62; la proporción predominante ( $61.9 \pm 0.2$  %,  $p < 0.001$ ) se recuperó en el intervalo de pH 4.40-4.99. Los análogos de carga con menor grado de sialización (aislados a pH mayor de 5.00) correspondieron al  $16.0 \pm 0.8$  % del total de hormona recuperada. Cabe señalar que la proporción de gonadotropina recombinante recuperada en este mismo intervalo de pH fue menor respecto de la hipofisaria (Tabla 9,  $p < 0.05$ ). A su vez, los análogos de carga con mayor grado de sialización (aislados a pH menor de 4.09) se hallaron en menor proporción en la preparación de gonadotropina hipofisaria (Tabla 9,  $p < 0.05$ ).

**Tabla 9:** Proporción de hormona recuperada en la fracción predominante y en los extremos del gradiente de pH

	Proporción predominante	% FSH a pH <4.09	% FSH a pH >5.00
<b>FSHrh</b>	37.3 ± 4.7 % (pH 4.40-4.69)	22.1 ± 5.9 % <sup>b</sup>	12.4 ± 1.3 % <sup>b</sup>
<b>FSHhh</b>	61.9 ± 0.2 % (pH 4.40-4.99)	11.5 ± 0.5 % <sup>a</sup>	16.0 ± 0.8 % <sup>a</sup>

Los datos se expresan como media ± EEM. Las letras indican diferencias significativas entre las dos gonadotrofinas ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras

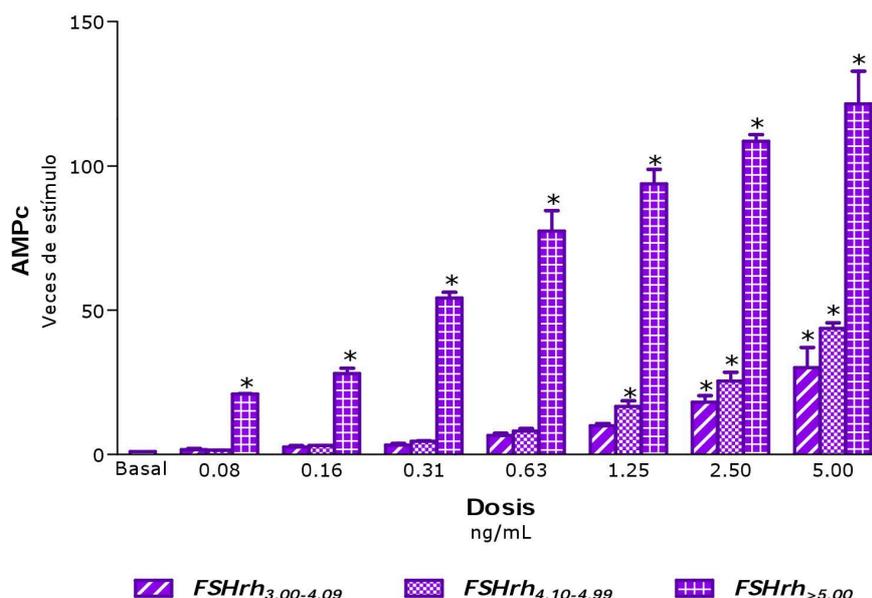
Como se describió en el capítulo II, los cambios observados en el grado de sialización de la FSH hipofisaria durante el desarrollo sexual en la rata macho, involucraron variaciones tanto en la proporción de FSH aislada en los extremos del gradiente de pH como en el intervalo en el cual se aisló la proporción predominante de hormona. Por lo tanto, para evaluar el posible efecto de variantes glicosiladas de FSH con diferencias en su grado de sialización se obtuvieron 3 preparaciones:

- análogos de carga con mayor grado de sialización, combinando las fracciones correspondientes al intervalo de pH 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>).
- análogos de carga con grado de sialización intermedio, combinando las fracciones correspondientes al intervalo de pH 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>).
- análogos de carga con menor grado de sialización, combinando las fracciones con pH mayor de 5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>).

Estas preparaciones se obtuvieron solamente a partir de FSHrh ya que no se disponía de FSHhh que permitiera realizar el fraccionamiento en escala preparativa y obtener cantidades adecuadas de las mezclas de análogos de carga para estimular las células en cultivo.

### 4.3.1 Producción del precursor de AMPc

La producción de AMPc obtenida bajo estímulo de las tres preparaciones de análogos de carga de FSHrh utilizadas se muestra en la Figura 46.



**Figura 46:** Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la producción de AMPc. Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con las 3 preparaciones de análogos de carga aisladas de FSHrh en los intervalos de pH: i) 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>), ii) 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>), y iii) >5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>), en un rango de concentraciones de 0.08 a 5 ng/mL (en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

En respuesta al estímulo con análogos de carga aislados a pH mayor de 5.00 los niveles de AMPc aumentaron significativamente respecto del basal a partir de la menor dosis utilizada, 0.08 ng/mL:  $70.7 \pm 0.3$  vs  $3.4 \pm 0.2$  pmol/mL ( $p < 0.001$ ). Esta producción se incrementó progresivamente, hasta alcanzar un valor de  $409.7 \pm 38.1$  pmol/mL a la dosis de 5.0 ng/mL.

Cuando se estimularon las células con la preparación de análogos de carga aislados en el intervalo de pH 4.10-4.99, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir el aumento significativo en la producción del segundo mensajero fue

de 1.25 ng/mL:  $56.3 \pm 6.5$  vs basal  $3.4 \pm 0.2$  pmol/mL ( $p < 0.001$ ). Los niveles de AMPc aumentaron a  $147.4 \pm 6.5$  pmol/mL en respuesta a la dosis de 5.0 ng/mL.

La preparación de gonadotropina con mayor grado de sialización indujo una respuesta de menor magnitud: la producción de AMPc aumentó a partir de la dosis de 2.5 ng/mL:  $61.2 \pm 7.3$  vs basal  $3.4 \pm 0.2$  pmol/mL ( $p < 0.001$ ). A la mayor dosis utilizada en estos cultivos la producción del segundo mensajero fue de  $101.3 \pm 23.8$  pmol/mL.

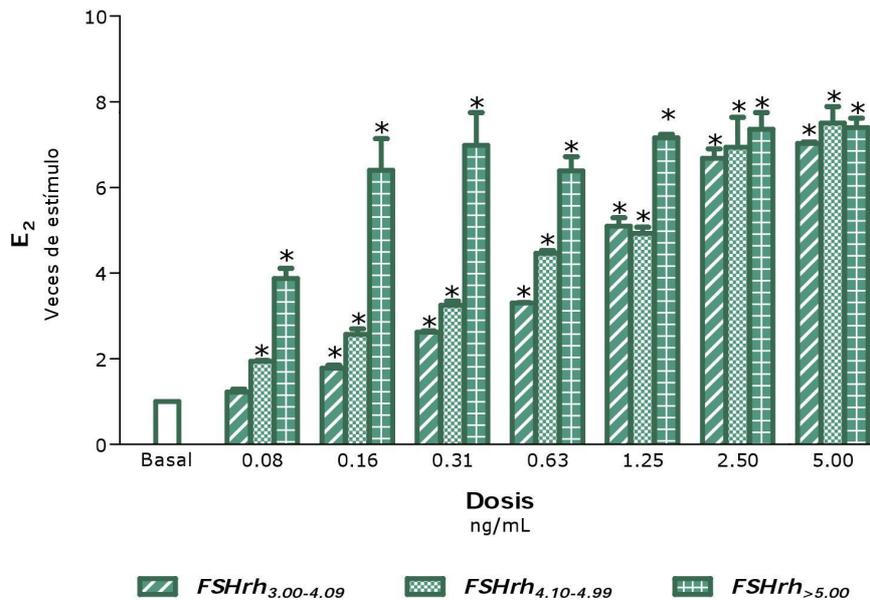
#### **4.3.2 Producción de estradiol**

La Figura 47 muestra el efecto de las tres preparaciones de análogos de carga de FSHrh con diferente grado de sialización sobre la producción de estradiol. El estímulo con análogos de carga aislados a pH mayor de 5.00 indujo un aumento en los niveles de este esteroide a partir de la menor dosis utilizada: 0.08 ng/mL:  $1120.0 \pm 69.8$  vs basal  $289.2 \pm 18.6$  pg/mL, ( $p < 0.05$ ) y se alcanzó la respuesta máxima con 0.16 ng/mL:  $1851.4 \pm 212.8$  pg/mL. La producción de estradiol para las dosis de 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 y 5.0 ng/mL fue de  $2018.6 \pm 224.0$ ,  $1848.8 \pm 96.8$ ,  $2096.6 \pm 23.4$ ,  $2127.4 \pm 112.0$  y  $2140.0 \pm 64.0$  pg/mL, respectivamente (NS).

Los análogos de carga aislados en el intervalo de pH 4.10-4.99, indujeron un aumento en la producción de estradiol a partir de la menor dosis utilizada, 0.08 ng/mL:  $561.8 \pm 7.2$  vs basal  $289.2 \pm 18.6$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Esta producción se incrementó progresivamente con las dosis más altas, alcanzándose la respuesta máxima con 2.5 ng/mL:  $2006.8 \pm 480.2$  pg/mL.

Cuando se estimularon las células con análogos de carga con mayor grado de sialización, aislados en el intervalo de pH 3.00-4.09, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir el aumento significativo en la producción de estradiol fue de 0.16 ng/mL:  $514.0 \pm 18.8$  vs basal  $289.2 \pm 18.6$  pg/mL ( $p < 0.001$ ). Esta

producción se incrementó progresivamente, alcanzándose la respuesta máxima a la dosis 2.5 ng/mL:  $1932.8 \pm 62.6$  pg/mL.

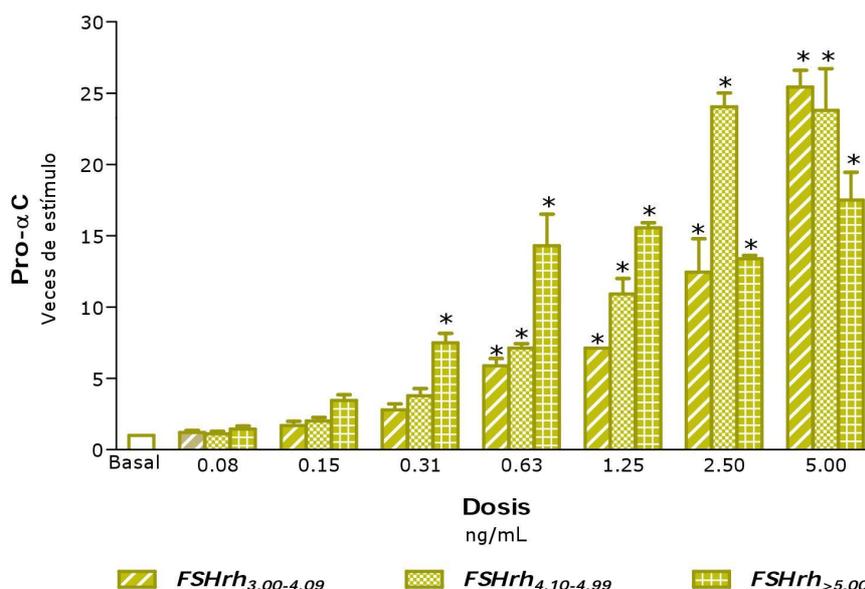


**Figura 47:** Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la producción de estradiol ( $E_2$ ). Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con las 3 preparaciones de análogos de carga aisladas de FSHrh en los intervalos de pH: i) 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>), ii) 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>), y iii) >5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>), en un rango de concentraciones de 0.08 a 5 ng/mL (en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

A partir de la dosis 2.5 ng/mL no se observaron diferencias significativas en la producción de estradiol entre las tres preparaciones de análogos de carga de FSHrh utilizadas: 2.5 ng/mL: FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>:  $1932.8 \pm 62.6$ , FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>:  $2006.8 \pm 180.2$  y FSHrh<sub>>5.00</sub>:  $2127.4 \pm 112.0$  pg/mL (NS). En forma similar, con la dosis de 5.0 ng/mL la producción del esteroide fue: FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>:  $2033.8 \pm 9.2$ , FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>:  $2169.8 \pm 112.0$  y FSHrh<sub>>5.00</sub>:  $2140.0 \pm 64.0$  pg/mL (NS).

### 4.3.3 Producción de Pro- $\alpha$ C

La Figura 48 muestra los niveles de Pro- $\alpha$ C alcanzados luego del estímulo con las preparaciones de FSHrh con diferente grado de sialización.



**Figura 48:** Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la producción de subunidad  $\alpha$  de inhibinas (Pro- $\alpha$ C). Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con las 3 preparaciones de análogos de carga aisladas de FSHrh en los intervalos de pH: i) 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>), ii) 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>), y iii) >5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>), en un rango de concentraciones de 0.08 a 5 ng/mL (en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

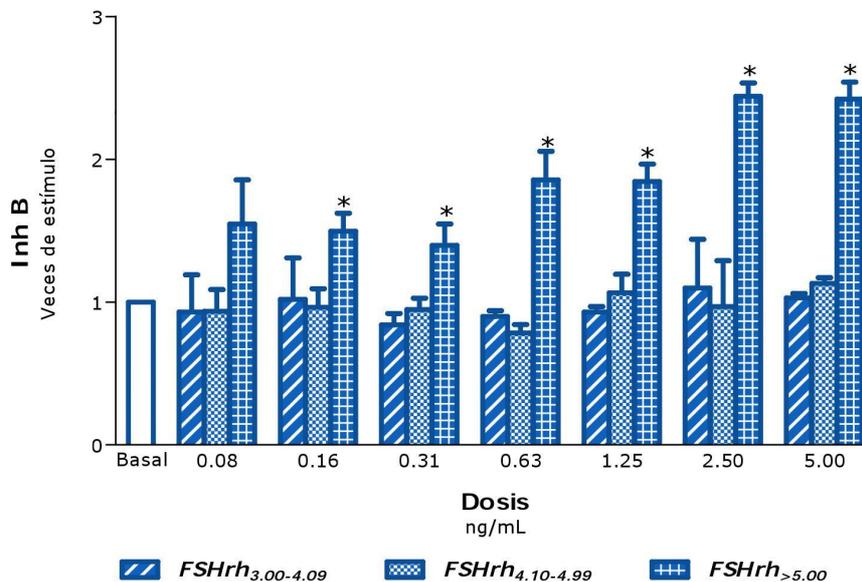
Cuando se utilizó la preparación de análogos de carga con menor grado de sialización, aislados a pH mayor de 5.00, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir un aumento significativo en la producción del péptido fue de 0.31 ng/mL:  $625.0 \pm 56.1$  vs basal  $83.5 \pm 14.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Esta producción alcanzó la respuesta máxima a la dosis 0.63 ng/mL:  $1194.0 \pm 184.9$  pg/mL; manteniéndose en estos niveles cuando se utilizaron dosis más altas de análogos de carga de FSHrh: 1.25 ng/mL:  $1299.4 \pm 29.1$ , 2.5 ng/mL:  $1118.3 \pm 19.4$  y 5.0 ng/mL:  $1461.2 \pm 163.1$  pg/mL (NS).

Con la preparación de análogos de carga aislados en el intervalo de pH 4.10-4.99, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir un aumento significativo en la producción del péptido fue de 0.63 ng/mL:  $595.3 \pm 25.9$  vs basal  $83.5 \pm 14.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Esta producción se incrementó al utilizar las dosis más altas, alcanzándose la respuesta máxima a la dosis 2.5 ng/mL:  $2007.1 \pm 81.0$  pg/mL, permaneciendo sin cambios con la dosis 5.0 ng/mL:  $1985.3 \pm 246.5$  pg/mL (NS).

Con la preparación de análogos de carga aislados en el intervalo de pH 3.00-4.09, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir un aumento significativo en la producción del péptido fue de 0.63 ng/mL:  $233.0 \pm 36.0$  vs basal  $83.5 \pm 14.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Esta producción se incrementó progresivamente, hasta alcanzar un nivel de  $2122.9 \pm 99.1$  pg/mL a la dosis de 5.0 ng/mL.

#### **4.3.4 Producción de inhibina B**

La Figura 49 muestra los niveles de inhibina B inducidos por las preparaciones de FSHrh con diferente grado de sialización.



**Figura 49:** Efecto del grado de sialización de FSHrh sobre la producción de inhibina B (Inh B). Las células de Sertoli inmaduras fueron estimuladas con las 3 preparaciones de análogos de carga aisladas de FSHrh en los intervalos de pH: i) 3.00-4.09 (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>), ii) 4.10-4.99 (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>), y iii) >5.00 (FSHrh<sub>>5.00</sub>), en un rango de concentraciones de 0.08 a 5 ng/mL (en términos del estándar NIAMDD-hFSH-2). Se muestran los resultados obtenidos en un cultivo representativo de 3 experimentos independientes, expresados en veces de estímulo respecto de la condición basal, como media  $\pm$  EEM de triplicados de cada condición experimental. \*:  $p < 0.05$  respecto del basal.

Cuando se estimuló el cultivo de células de Sertoli con las preparaciones de análogos de carga de FSHrh aisladas en los intervalos de pH 3.00-4.09 y 4.10-4.99, no se observaron cambios en la producción de inhibina B. Solamente los análogos de carga con menor grado de sialización, aislados a pH mayor de 5.00, resultaron capaces de estimular la producción de inhibina B. Con esta preparación, la mínima dosis de hormona necesaria para inducir un aumento significativo en la producción de este péptido fue de 0.16 ng/mL:  $1888.3 \pm 158.1$  vs basal  $1261.4 \pm 131.9$  pg/mL ( $p < 0.05$ ). Esta producción se incrementó progresivamente hasta alcanzar un nivel de  $3079.4 \pm 118.6$  pg/mL para la dosis de 2.5 ng/mL y de  $3054.0 \pm 151.1$  pg/mL para la dosis de 5.0 ng/mL.

## Resumen de resultados

Los resultados obtenidos en la presente Tesis muestran que:

- ❖ Los pacientes anórkidos presentaron una marcada heterogeneidad de carga en la FSH sérica; los factores hormonales regulatorias del grado de sialización no ejercieron ningún efecto en estos pacientes
- ❖ El grado de sialización de la FSH hipofisaria aumentó progresivamente durante el desarrollo sexual en la rata macho
- ❖ La castración de ratas adultas indujo una disminución en el grado de sialización de la FSH hipofisaria. La administración de testosterona revirtió el efecto de la castración
- ❖ La expresión génica de la sialiltransferasa *St3gal3* no se modificó en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas
- ❖ La expresión génica de la *St6gal1* aumentó marcadamente en los animales adultos; la castración afectó su expresión
- ❖ Los análogos de carga con menor grado de sialización resultaron el estímulo más potente para la producción de AMPc, estradiol e inhibina B; la producción de Pro- $\alpha$ C resultó favorecida por análogos de carga de FSHrh con mayor grado de sialización

# ***Discusión***

La presencia de dos cadenas de oligosacáridos en cada una de las subunidades de la molécula de FSH es esencial para conferirle potencia biológica a la gonadotropina (Sairam & Manjunath, 1982). La regulación hormonal del grado de procesamiento de los oligosacáridos y la asociación de diferentes tipos de variantes glicosiladas circulantes con estadios específicos de la maduración gonadal sugieren que los procesos regulatorios involucrados en estas etapas requieren de estímulos de glicoformas de FSH con estructuras variables de sus oligosacáridos. El significado fisiológico de la existencia de múltiples variantes de glicosilación de la FSH no ha sido aclarado aún.

### **I. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de FSH sérica en pacientes anórquidos**

Se ha demostrado que el perfil de las variantes de glicosilación de FSH posee características específicas asociadas al sexo y a la edad; estas diferencias impactan en la biopotencia de la hormona (Wide, 1989). El desarrollo puberal del varón es una de las condiciones en la cual se producen variaciones en la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH asociadas con los cambios hormonales característicos de este periodo de la vida (Phillips y col., 1997; Olivares y col., 2004; Campo y col., 2007).

En base a estas evidencias, se planteó el interrogante acerca del posible impacto que los cambios en el entorno hormonal producidos por la ausencia de tejido testicular funcional desde etapas tempranas de la vida, podría tener sobre la microheterogeneidad molecular de la FSH y sobre el efecto de los factores regulatorios clásicamente definidos: el GnRH y la testosterona (Ulloa-Aguirre y col., 1995, 2001 y 2009).

En la primera parte de este estudio, se incluyeron pacientes anórquidos en edad cronológica prepuberal que concurren a la consulta a la División de Endocrinología del Hospital R. Gutiérrez. Los resultados obtenidos en estos pacientes al evaluar la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, según protocolos ya establecidos para este tipo de patología, mostraron diferencias respecto de los perfiles determinados en varones normales.

En condiciones fisiológicas, estudios pioneros realizados por Kaplan y Grumbach (1976) demostraron que durante los periodos fetal y postnatal, cuando el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal se encuentra activo, predominan los niveles de FSH en las niñas y los de LH en los varones. Posteriormente, con el desarrollo de métodos más sensibles y específicos para la cuantificación de gonadotrofinas, se pudo confirmar el predominio de los niveles de LH respecto de FSH en los varones, exclusivamente durante el periodo postnatal y en la pubertad avanzada (Byrd y col., 1998; Ropelato y col., 1998; Bergadá y col., 1999).

En los pacientes anórquidos en edad cronológica prepuberal, los valores de FSH circulantes fueron marcadamente más altos que los de LH. Si bien existe escasa información en la literatura sobre los niveles de gonadotrofinas en niños anórquidos determinados con métodos ultrasensibles, Brauner y col. (2011) y Grinspon y col. (2012) observaron una mayor elevación de los niveles séricos de FSH respecto de los de LH en pacientes con esta patología. Asimismo, cabe señalar que los niveles de gonadotrofinas determinados en pacientes anórquidos mostraron una variabilidad individual muy marcada, característica que ya se había reportado previamente (Ropelato y col., 1997; Brauner y col., 2011; Grinspon y col., 2012).

Al analizar el efecto del estímulo agudo con GnRH en los pacientes anórquidos en edad cronológica prepuberal incluidos en este estudio, se pudo comprobar que si bien se mantuvo la acción facilitadora del GnRH sobre la secreción de LH, la

hipófisis respondió elevando los niveles de ambas gonadotrofinas. La magnitud de estos aumentos fue condicionada inversamente por el nivel basal; es decir, el mayor incremento se alcanzó en aquellos pacientes que mostraban niveles de LH más bajos en la condición basal. De esta manera, en algunos pacientes la magnitud de la respuesta se pudo considerar similar a la observada en condiciones fisiológicas.

Varios estudios han descrito el efecto de un estímulo agudo con GnRH sobre la secreción de gonadotrofinas en varones normales durante los distintos estadios del desarrollo puberal (Brito y col., 1999; Resende y col., 2007). Estos autores mostraron que el incremento en los niveles de LH es más marcado que el correspondiente a FSH ya que el aumento de LH puede alcanzar más de 10 veces y la FSH por lo general responde con aumentos de 2 o 3 veces sobre sus niveles basales.

La respuesta de FSH al estímulo del GnRH en los pacientes anórquidos resultó variable y si bien la magnitud del incremento se mantuvo en valores similares a los descritos en varones normales, no se modificó el predominio de esta gonadotrofina sobre los niveles de LH luego del estímulo. Por otro lado, como era de esperar, los niveles de testosterona sérica en estos pacientes reflejaron la ausencia de tejido testicular funcional.

Cuando se analizó la abundancia relativa de los análogos de carga de FSH en los pacientes anórquidos en edad cronológica prepuberal, se observó que mostraba diferencias respecto de la descrita previamente en nuestro laboratorio en niños normales (Campo y col., 2007). En la pubertad temprana, la FSH circulante posee un alto grado de sialización y presenta una proporción predominante en un intervalo muy acotado de pH, por debajo de 4. Sin embargo, en los pacientes estudiados la FSH no mostró un alto grado de sialización y se evidenció la pérdida del predominio de hormona aislada en un intervalo acotado

de pH; estos resultados demuestran que la FSH en estos pacientes posee una mayor heterogeneidad de carga.

El efecto del GnRH sobre la regulación de la microheterogeneidad molecular de FSH ha sido estudiado tanto en modelos experimentales como en el humano. Las evidencias indican que durante las distintas etapas del desarrollo puberal, el GnRH induce la aparición en circulación de análogos de carga de FSH con menor grado de sialización. Estos resultados fueron obtenidos tanto en condiciones fisiológicas en niñas y varones (Phillips y Wide, 1994; Olivares y col., 2004) como en niñas con Síndrome de Turner (Wide y Albertsson-Wikland, 1990). En otro estudio, realizado en niñas y varones en distintos estadios del desarrollo puberal, se obtuvo el mismo efecto utilizando un tratamiento crónico con dos agonistas diferentes de GnRH (Wide y col., 1996).

Por el contrario, en los pacientes anórcidos, el GnRH no logró modificar las características de carga de la hormona. Es decir, se mantuvo el rango en el cual se aisló la gonadotropina y las proporciones de hormona halladas a pH mayor y menor a 4.0.

En base a las diferencias encontradas en el perfil de análogos de carga de FSH determinado en los pacientes anórcidos en edad prepuberal respecto del observado en condiciones fisiológicas, resultó de interés explorar posibles alteraciones del grado de complejidad de los oligosacáridos asociadas con esta patología.

En condiciones fisiológicas, la administración de GnRH duplicó la proporción de glicofomas con cadenas de carbohidratos altamente ramificados a expensas de una disminución concomitante de la proporción de glicofomas con cadenas biantenarias y truncadas (Creus y col., 1998).

La incapacidad del GnRH de regular el grado de sialización de la FSH en los pacientes en estudio, también se manifestó sobre la modulación del grado de complejidad de la hormona ya que la abundancia relativa de las glicofomas de FSH con distinto grado de complejidad en sus oligosacáridos no fue modificada por acción de este factor.

En base a los hallazgos mencionados, se puede concluir que en este grupo de pacientes anórcidos el GnRH es incapaz de ejercer un efecto regulatorio sobre la microheterogeneidad molecular de FSH. En consecuencia, se podría postular que para conservar una adecuada respuesta al GnRH es necesario mantener la normal funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la etapa fetal y postnatal.

En la segunda parte del estudio, se incluyeron pacientes anórcidos que se encontraban en edad cronológica puberal y recibían terapia de reemplazo hormonal con andrógenos para mantener los caracteres sexuales secundarios.

Las evidencias reportadas en la literatura y obtenidas utilizando ratas macho como modelo experimental, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que la testosterona favorece la síntesis de análogos de carga de FSH con mayor grado de sialización. Los primeros autores en describir este efecto fueron Kennedy y Chappel (1985), utilizando un modelo de células hipofisarias de rata en cultivo. En el hombre, se han obtenido evidencias que avalan estos hallazgos. Los cambios en la microheterogeneidad molecular de FSH que ocurren durante el desarrollo puberal, indican que el aumento en el grado de sialización de la FSH se asocia al incremento en los niveles séricos de testosterona que se observa en la pubertad (Phillips y col., 1997; Olivares y col., 2004).

En el grupo de pacientes en edad cronológica puberal, la dosis de andrógeno se administró de acuerdo a la edad; es importante aclarar que ninguno de los pacientes recibió la dosis establecida para la edad adulta. Este hecho se evidencia por los niveles de testosterona alcanzados, ya que los valores prepuberales

observados en condiciones basales se encontraron dentro del rango de valores correspondientes a la pubertad media (Crofton y col., 2002; Trigo y col., 2004).

En condiciones fisiológicas, la FSH presente durante las últimas etapas del desarrollo puberal masculino se caracteriza por su baja heterogeneidad molecular con alto grado de sialización. La hormona se aísla en un rango de pH correspondiente al extremo inferior del gradiente y en un intervalo más acotado, respecto de los estadios más tempranos del desarrollo. Se podría proponer que las variaciones ocurren como consecuencia de los cambios hormonales característicos en este periodo: el aumento en los niveles de testosterona circulante y/o los cambios en la pulsatilidad del GnRH.

El perfil obtenido en los pacientes anórcidos en edad cronológica puberal en condiciones basales resultó muy similar al determinado en el grupo prepuberal, tanto en el intervalo de pH en el cual se recuperó el total de la hormona como en la ausencia de una proporción predominante en un intervalo acotado de pH. La administración de enantato de testosterona a estos pacientes no logró modificar estas características.

Estos resultados sugieren que en ausencia de función gonadal desde etapas tempranas de la vida, la testosterona es incapaz de regular la producción de una FSH con mayor grado de sialización como se observa durante el desarrollo puberal en condiciones fisiológicas.

Esta anomalía en la adición de ácido siálico sugeriría una alteración en la regulación/actividad de las sialiltransferasas hipofisarias, enzimas responsables del agregado de este residuo a los oligosacáridos de la FSH. Podría postularse que en ausencia de función testicular las sialiltransferasas del gonadotropo no mantendrían su capacidad de respuesta a los cambios en el entorno hormonal.

Cuando se consideró el otro aspecto de la microheterogeneidad molecular de la FSH, que involucra el grado de complejidad de sus oligosacáridos,

se observó que en condiciones basales presentaba características similares a las encontradas en los pacientes en edad cronológica prepuberal. Las características de las proporciones relativas de variantes glicosiladas con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos mostraron un predominio de glicoformas de FSH con cadenas carbohidratadas biantenarias y truncadas e iguales proporciones de los otros dos grupos de glicoformas. Este perfil resultó modificado por la administración de enantato de testosterona, el cual indujo un aumento significativo de la proporción de glicoformas de FSH con oligosacáridos altamente ramificados y una tendencia a la disminución de la proporción de glicoformas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento.

Es decir, la administración del andrógeno indujo una distribución de variantes glicosiladas de FSH similar a la observada en condiciones fisiológicas durante las últimas etapas del desarrollo puberal masculino; principalmente, en el predominio de FSH con oligosacáridos altamente ramificados (NR: 43% y DR: 34% del total de hormona recuperada).

Los resultados obtenidos en este Capítulo de la presente Tesis mostraron que en ausencia de función gonadal desde etapas tempranas de la vida, no es posible regular hormonalmente el grado de sialización de la FSH. El GnRH y los andrógenos, los dos factores regulatorios clásicamente aceptados, no ejercieron ningún efecto sobre esta característica. Por el contrario, las glicosiltransferasas responsables de determinar el grado de complejidad de los oligosacáridos mantendrían su capacidad de responder a la acción de los andrógenos.

## **II. Regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de FSH hipofisaria en ratas macho**

Las evidencias reportadas en la literatura sobre el desarrollo sexual de la rata macho muestran que los cambios hormonales que caracterizan este período, se asocian con variaciones en el grado de procesamiento de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH (Ulloa-Aguirre y col., 1986; Rulli y col., 1999). En base a estos hallazgos se ha propuesto que el procesamiento de la porción carbohidratada de la molécula de FSH en el varón podría estar regulado por factores provenientes del testículo y, posiblemente, por los cambios en la pulsatilidad del GnRH característicos del desarrollo sexual. Debido a que la estructura de la porción carbohidratada de la molécula de FSH incide directamente en su biopotencia, las variaciones descritas durante el desarrollo sexual permitirían postular que la acción de mezclas específicas de glicofomas sería necesaria para completar la maduración de la gonada masculina.

En estudios previos, se han descrito variaciones en la microheterogeneidad molecular de la FSH hipofisaria en relación al grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la molécula de esta gonadotropina durante el desarrollo sexual (Rulli y col., 1999). En base a estas evidencias y teniendo en cuenta que el residuo terminal de las cadenas carbohidratadas, el ácido siálico, se adiciona únicamente sobre la galactosa presente en las glicofomas de FSH que poseen un mayor grado de complejidad, resultó de interés analizar posibles cambios concomitantes en el grado de sialización de la hormona durante el desarrollo sexual de la rata macho. Asimismo, se utilizó un modelo de ratas adultas castradas en las cuales, mediante la administración de andrógenos y el bloqueo de la acción del GnRH, se evaluó la regulación hormonal de la microheterogeneidad molecular de la gonadotropina.

La abundancia relativa de los análogos de carga de la FSH hipofisaria fue analizada en tres momentos del desarrollo sexual de la rata (15, 23 y 60 días), en los cuales se han descrito cambios tanto a nivel endocrino como también en los estadios de maduración de la célula de Sertoli (Skinner y Griswold, 1982; Fritz y col., 1976; Russell, 1993; Gondos y Berndtson, 1993; Rey y col., 2003).

Los resultados obtenidos muestran la asociación que existe entre el aumento progresivo del grado de sialización de la hormona y los cambios en el entorno hormonal; es decir, los incrementos de los niveles inmunológicos de la gonadotropina y la testosterona circulantes. En los animales inmaduros, la FSH hipofisaria se caracterizó por poseer un bajo grado de sialización, con un predominio de análogos de carga (58 %) aislados a valores de pH mayores a 4. Este bajo grado de sialización de la hormona podría deberse al predominio de glicofomas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento, como se ha descrito previamente en ratas de 10 días de edad (Rulli y col., 1999). En estos animales, las cadenas carbohidratadas presentes en la molécula de FSH no han finalizado su procesamiento y, en consecuencia, no han adicionado el residuo galactosa necesario para incorporar ácido siálico. También podría contribuir a la síntesis de FSH con bajo grado de sialización una actividad disminuida de las sialiltransferasas del gonadotropo, enzimas encargadas de adicionar el ácido siálico a las cadenas carbohidratadas.

Es interesante relacionar esta característica de la FSH presente en animales inmaduros con la capacidad proliferativa de las células de Sertoli. La FSH, actuando en forma conjunta con la activina A, ha sido propuesta como un factor esencial en estimular la proliferación de estas células (Orth, 1984; Boitani y col., 1995; Meachem y col., 2005). Esta acción sinérgica ejercida por la FSH y la activina A es máxima entre los 7 y 11 días de edad, coincidiendo con la expresión del receptor tipo II de activina en estas células (Boitani y col., 1995; Fragale y

col., 2001). En base a las evidencias reportadas en la literatura y a los resultados obtenidos en esta parte de nuestro estudio, se podría postular que las variantes glicosiladas de FSH que no han completado su procesamiento y que presentan un bajo grado de sialización, en consecuencia una alta biopotencia, contribuirían a sostener la actividad proliferativa de las células de Sertoli característica de este periodo.

Cuando se analizó el perfil de distribución de los análogos de carga en los animales de 23 días de edad, se observó un incremento en el grado de sialización de la FSH hipofisaria, reflejado en el aumento de la proporción de hormona aislada a valores de pH más bajos (3.80-4.09). Concomitantemente, en este grupo de animales se detectó un incremento en los niveles séricos y en la concentración hipofisaria de FSH inmunológica. En consecuencia, se podría postular que la maduración de la célula de Sertoli se produce a expensas de un aumento en los niveles y en los cambios de las características moleculares de la FSH que modulan la biopotencia de la hormona. La variación en la composición de los oligosacáridos de la gonadotropina podría contribuir al cese de la actividad proliferativa de la célula de Sertoli y al avance en su proceso de maduración. En este estadio se producen cambios en las células de Sertoli a nivel de su morfología y de la producción de proteínas de secreción que actúan sobre las células germinales; también la formación de uniones estrechas especializadas que contribuyen a establecer la barrera hemato-testicular (Russell, 1993; Gondos y Berndston, 1993; Sharpe y col., 2003).

En los animales adultos, el incremento en el grado de sialización de la hormona fue aún más marcado, alcanzando una proporción predominante la gonadotropina aislada en un intervalo de pH menor y más acotado que el obtenido en los animales de 15 y 23 días de edad. Concomitantemente, la testosterona sérica

aumentó significativamente alcanzando los niveles característicos del animal adulto.

En base a estos hallazgos se puede postular que los análogos de carga de FSH con mayor grado de sialización y con tiempos de permanencia en circulación más prolongados (Morell y col., 1971; Wide, 1986; Ulloa-Aguirre y col., 1992), podrían proveer un estímulo sostenido y de menor biopotencia (Creus y col., 2001) a nivel de la célula de Sertoli, el cual sería necesario para alcanzar el grado de maduración característico del animal adulto.

Dado que las variaciones en la microheterogeneidad molecular de la FSH hipofisaria durante el desarrollo sexual de la rata coinciden con cambios en el entorno hormonal del animal, se plantea el interrogante acerca de cuál sería el impacto de estos cambios sobre el grado de sialización de la gonadotropina.

Resultó entonces de interés incluir la castración como modelo experimental, con el fin de analizar el efecto de la ausencia de factores gonadales y los consiguientes cambios en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario sobre el grado de sialización de la hormona. Asimismo, se evaluó la acción de los andrógenos y de un antagonista del GnRH en determinar la posible influencia de estos factores sobre la microheterogeneidad de FSH.

Como ya se ha descrito en la literatura, la castración provocó un aumento marcado y sostenido en los niveles séricos de FSH en todos los periodos de castración estudiados (Negro-Vilar y col., 1973; Kitahara y col., 1990; Winters, 1996). Sin embargo, la concentración hipofisaria disminuyó transitoriamente, coincidiendo con hallazgos reportados previamente en la literatura (Vogel y Sherins, 1984; Olson y Blake, 1991).

La castración afectó las características de la microheterogeneidad de la FSH hipofisaria, mostrando semejanzas en ciertos parámetros con la descrita en los animales inmaduros. Cuando se analizó la abundancia relativa de los análogos de

carga de FSH hipofisaria luego de la castración, se observó un desplazamiento de la proporción predominante de la hormona hacia intervalos de pH más elevados; mientras que en los animales sometidos a castración, la proporción predominante de hormona se ubicó en un intervalo de pH 4.10-4.69, en los intactos se encontró a pH 3.80-4.09. Este cambio revela la disminución en el grado de sialización de la FSH, característica que se mantuvo en todos los períodos de castración estudiados. Otra evidencia del menor grado de sialización de la FSH hipofisaria luego de la gonadectomía fue el aumento concomitante y progresivo de la proporción de hormona aislada en el extremo superior del rango de pH, mayor de 5.0.

En un trabajo previo realizado en ratas adultas luego de 8 días de castración, se observó una disminución en el grado de complejidad de los oligosacáridos de la FSH hipofisaria (Rulli y col., 2003). En el presente estudio, resultó entonces de interés incluir la caracterización del grado de complejidad de los oligosacáridos de la molécula de FSH en períodos más cortos de castración para determinar si el cambio en el entorno hormonal podría inducir variaciones en este parámetro.

El análisis realizado en cromatografía de afinidad en lectinas permitió determinar que ya a partir de los 2 días post-castración se modificó marcadamente el perfil de glicofomas determinado en base al grado de complejidad de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH. Este perfil, caracterizado en el animal intacto por la presencia de hormona con oligosacáridos completamente procesados, de tipo complejo, invierte su relación y claramente pasan a ser más abundantes las glicofomas que no han completado su procesamiento. Estos cambios podrían ser responsables de la disminución en el grado de sialización observada luego de la castración ya que, como se mencionó anteriormente, no estaría presente el residuo de galactosa en las cadenas de carbohidratos.

En base a estas evidencias, resultó de interés analizar el efecto de la testosterona y del GnRH sobre la regulación del grado de sialización de la hormona en animales luego de 2 días de castración.

La administración de testosterona a animales castrados en presencia o ausencia de un antagonista de GnRH causó una clara disminución en los niveles séricos de FSH, a pesar de resultar acompañada de un aumento en la concentración intrahipofisaria. Estos hallazgos se explicarían a través del mecanismo de regulación de los andrógenos sobre FSH, que involucra un efecto inhibitorio a nivel hipotalámico sobre el perfil de secreción de GnRH, y un efecto estimulador a nivel hipofisario sobre la síntesis de FSH (Matsumoto y Bremner, 1984; Winters y col., 1992; Burger y col., 2004; Thackray y col., 2006). La resultante de estos efectos *in vivo* sería una acción inhibitoria de los andrógenos sobre los niveles séricos de FSH.

Al analizar la abundancia relativa de los análogos de carga de FSH hipofisaria, en ratas castradas a las cuales se les administró testosterona, se observó que este andrógeno logró restablecer el perfil observado en animales intactos. Así, la proporción predominante de FSH se mantuvo en el mismo intervalo de pH y resultó de similar magnitud que los hallados en los animales intactos. Similares resultados fueron obtenidos al administrar el andrógeno cuando el efecto de GnRH fue bloqueado por el antagonista. Estos resultados confirman evidencias previas que documentaron el efecto de los andrógenos sobre el grado de sialización de la hormona, independientemente de la acción del GnRH. Kennedy y Chappel (1985) demostraron en células hipofisarias en cultivo que la testosterona aumenta la secreción de análogos de carga de FSH con mayor grado de sialización. Por otro lado, Sharma y col. (1990) observaron que la administración de testosterona a ratas macho intactas en presencia y en ausencia de un antagonista de GnRH

estimula en igual medida la síntesis de variantes glicosiladas de FSH con mayor grado de sialización.

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-testicular es un factor determinante en la regulación de la microheterogeneidad molecular de FSH. Los cambios que se producen en el entorno hormonal durante el desarrollo sexual de la rata macho impactan en las características de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH. Inducen cambios en el grado de sialización, y en consecuencia, en la biopotencia *in vivo* de la hormona. Los factores hormonales involucrados en esta regulación serían, entre otros aún no caracterizados, la testosterona y el GnRH. Sin embargo, el andrógeno tendría un papel preponderante en este mecanismo de regulación, ya que afectaría no sólo la incorporación de ácido siálico a la cadena carbohidratada sino también contribuiría a alcanzar el procesamiento completo de los oligosacáridos necesario para la adición de este residuo.

### III. Regulación hormonal de la expresión de sialiltransferasas hipofisaria en ratas macho

En el Capítulo anterior de la presente Tesis se describieron las variaciones en el grado de sialización de la FSH inducidas por los cambios del entorno hormonal en condiciones fisiológicas y experimentales. En base a los resultados obtenidos, se podría postular que el grado de sialización de la hormona estaría regulado por la expresión génica y/o actividad de las diferentes sialiltransferasas responsables de adicionar ácido siálico a la cadena carbohidratada.

Las evidencias descritas en la literatura demuestran que la actividad enzimática de distintas glicosiltransferasas, incluidas las responsables de adicionar ácido siálico a las cadenas carbohidratadas, se relacionan en forma directa con la regulación de su respectiva expresión génica (Vertino-Bell y col., 1994; Barthel y col., 2008; Marathe y col., 2008). Asimismo, se ha reportado que es posible predecir la estructura de un oligosacárido determinando la expresión génica de cada una de las glicosiltransferasas involucradas en su biosíntesis (Abbott y col., 2008; Nairn y col., 2008 y 2012).

En este Capítulo se analizó la expresión de las sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1*, responsables de la adición de los residuos de ácido siálico al disacárido Gal $\beta$ 1-3/4NAcGlc, presente en la molécula de FSH, que actúa como sustrato para ambas enzimas (Wen y col., 1992; Paulson y col., 1989).

Al analizar los niveles de ARNm de ambas sialiltransferasas, se observó que la expresión génica de la *St3gal3* no presentó cambios en los diferentes momentos del desarrollo sexual estudiados. Por el contrario, la expresión de la *St6gal1* se incrementó marcadamente en hipófisis provenientes de animales adultos. Cabe señalar que en los animales adultos, los niveles séricos de testosterona alcanzaron valores máximos y la FSH disminuyó en relación a los niveles observados en

animales de menor edad (23 días). En consecuencia, los andrógenos, y posiblemente de la pulsatilidad del GnRH podrían estar estimulando la expresión de esta enzima.

Al relacionar las variaciones en la expresión génica de la *St6gal1* con el grado de sialización de la FSH durante el desarrollo sexual, surge una discordancia: el aumento en la expresión génica de esta enzima fue detectado solamente en animales adultos. Sin embargo, el grado de sialización de la FSH aumentó progresivamente en los distintos estadios del desarrollo sexual estudiados. Estas diferencias podrían explicarse al considerar la estructura de toda la cadena carbohidratada presente en la molécula de FSH en los diferentes momentos del desarrollo sexual. Surge claramente que en el animal inmaduro, el predominio de glicofomas con oligosacáridos que no han completado su procesamiento (Rulli y col., 1999), concomitantemente con una baja expresión génica de la sialiltransferasa, resultaría en la síntesis de una hormona con un menor grado de sialización. En los animales adultos, se detectó la FSH con el grado más alto de sialización; esta característica sería el resultado de dos condiciones: un predominio de glicofomas de FSH con oligosacáridos complejos, que le ofrecen el sustrato adecuado a la enzima, y el incremento en la expresión génica de *St6gal1*.

En base a estos hallazgos, la pregunta que surge entonces es la posible existencia de un efecto regulatorio ejercido por el entorno hormonal sobre la expresión génica de las enzimas responsables de la adición de ácido siálico a las cadenas carbohidratadas de la FSH.

Al estudiar el efecto de la castración sobre la expresión génica de las sialiltransferasas, los resultados obtenidos fueron inesperados. Si bien en periodos cortos de castración se observó una leve disminución en la expresión génica de la *St6gal1*, periodos de castración más prolongados resultaron en un aumento en la expresión génica de esta sialiltransferasa. Cabe señalar que la hormona

sintetizada en estas condiciones experimentales exhibió un bajo grado de sialización. Por otro lado, al utilizar técnicas de inmunohistoquímica para confirmar la presencia de estas sialiltransferasas en cortes de tejido hipofisario conteniendo células productoras de FSH, se observó que la inmunomarcación de ST6GAL1 disminuyó luego de 2 días de castración, coincidiendo con las variaciones observadas en la expresión génica de esta sialiltransferasa. En periodos más prolongados de castración, la marcación intensa detectada con el anticuerpo de ST6GAL1 coincidió con el incremento en los niveles de su ARNm.

Estos hallazgos podrían ser consecuencia de los cambios en la pulsatilidad del GnRH y/o de una regulación alterada de la expresión de sialiltransferasa hipofisaria. Sin embargo, no se puede descartar una secreción aumentada y/o selectiva de los análogos de carga de FSH con menor grado de sialización, resultante de la pérdida del mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por los factores gonadales.

Posteriormente se analizó el efecto de la administración de andrógenos y del bloqueo de la acción del GnRH sobre la expresión génica de las sialiltransferasas *St3gal3* y *St6gal1*, en ratas castradas. La administración de los factores hormonales se realizó en base al momento en el cual se observó la disminución transitoria de la expresión de la sialiltransferasa *St6gal1* luego de la castración.

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran claramente la capacidad de la testosterona en restablecer el nivel de expresión génica de *ST6gal1*. Esta evidencia coincide con el aumento del grado de sialización de la FSH descrito en ratas adultas castradas y tratadas con testosterona.

Se han reportado previamente en la literatura hallazgos relacionados con la regulación hormonal de glicosiltransferasas; la expresión génica de la *St6gal1* es regulada por diferentes glucocorticoides en fibroblastos, en células aisladas de hígado e intestino (Vandamme y col., 1993; Wang y col., 1990; Hamr y col.,

1997). Por otro lado, Helton y Magner (1994) han propuesto que el ARNm de la *St6gal1* en tirotropos estaría regulado negativamente por las hormonas tiroideas, y que esta regulación es específica del tipo celular en la hipófisis.

En relación con las gonadotrofinas, y en particular con la FSH, trabajos previos realizados en ratas hembras demostraron que los estrógenos regulan el grado de sialización de la FSH hipofisaria a través de un mecanismo que involucra exclusivamente la expresión de la sialiltransferasa *St3gal3* (Damián-Matsumura y col., 1999).

Los resultados obtenidos en este Capítulo de la presente Tesis demuestran que en la rata macho, estaría involucrada exclusivamente la ST6GAL1 en la regulación hormonal del grado de sialización de la FSH, ya que en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas se detectaron cambios en la expresión de ST3GAL3. En consecuencia, se puede postular que los esteroides gonadales afectarían las últimas etapas del procesamiento de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH.

#### **IV. Efecto del grado de sialización de la FSH sobre la actividad endócrina de células de Sertoli inmaduras**

En los Capítulos previos de la presente Tesis, se describió cómo afectan los cambios hormonales originados por disfunciones del eje reproductivo sobre el grado de sialización de la FSH hipofisaria. Asimismo, se determinaron los efectos de la administración de factores hormonales, considerados los principales agentes regulatorios de la microheterogeneidad molecular de la FSH. Finalmente, se realizó un estudio con el objetivo de determinar la relevancia biológica de la existencia de múltiples moléculas de FSH con diferencias en la composición de sus cadenas carbohidratadas. Con este fin, se utilizó un cultivo de células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad, las cuales poseen una alta capacidad proliferativa y de respuesta a la gonadotropina. Se evaluó la producción de estradiol e inhibinas como reflejo de la actividad endocrina de estas células (Padmanabhan y col., 1987; Roberts y col., 1989).

Como se mencionó anteriormente, las células de Sertoli aisladas de ratas de 8 días de edad poseen una alta capacidad de respuesta a la FSH; en particular, se ha reportado que la producción de estradiol estimulada por esta gonadotropina es una característica de la actividad endocrina de las células inmaduras. Esta capacidad de respuesta disminuye gradualmente con la edad y desaparece cuando las células completan su proceso de maduración (Dorrington y col., 1978; Rommerts y col., 1982; Tsai-Morris y col., 1985; Le Magueresse y Jegou, 1988).

Los trabajos pioneros de Steinberger y Steinberger (1976) demostraron que la célula de Sertoli es la fuente más importante de producción de inhibinas en el testículo. La producción máxima de inhibina fue descrita en células de Sertoli inmaduras aisladas de ratas menores de 15 días de edad (Massicotte y col., 1984; Ultee-van Gessel y de Jong, 1987). La FSH fue considerada el factor más

relevante para estimular esta producción de inhibina en la célula de Sertoli (Bicsack y col., 1987).

Muchos años más tarde, cuando se desarrollaron los métodos de cuantificación específicos para las diferentes formas moleculares de inhibina, se demostró que esta célula es capaz de sintetizar el precursor de subunidad  $\alpha$  (Pro- $\alpha$ C) y la forma dimérica, inhibina B (Groome y col., 1995 y 1996).

En primer lugar se evaluó la capacidad de respuesta de la célula de Sertoli inmadura al estímulo con dos preparaciones de FSH humana de alto grado de pureza, hipofisaria (FSHhh) y recombinante (FSHrh). La FSHhh (hFSH-I-SIAFP2, provista por el NIDDK-NIH) consistió en una preparación proveniente de hipófisis humana, purificada mediante un método de inmutafinidad selectiva, el cual asegura la ausencia de contaminantes hormonales. La producción de FSHrh se inició hacia el fin de la década del 80 y se sintetizó en las células CHO, una línea celular proveniente de ovario de hámster (Chinese Hamster Ovary) (Keene y col., 1989). Esta preparación ha sido ampliamente utilizada para inducir la ovulación en los tratamientos de infertilidad (Hugues, 2001).

Cuando se comparó el efecto de las dos preparaciones de FSH humana nativas, se pudo observar que una dosis menor de la gonadotrofina hipofisaria respecto de la recombinante, inducía una respuesta de igual magnitud, en términos de producción de estradiol.

Al evaluar el efecto de las dos preparaciones de FSHh sobre la producción de AMPc, fue necesario utilizar dosis más elevadas de ambas gonadotrofinas para inducir un aumento en la producción del segundo mensajero. Esta diferencia fue descrita previamente, tanto en células de Sertoli como en células de Leydig; la respuesta máxima en términos de la producción de esteroides se alcanza a dosis de gonadotrofinas menores que las requeridas para producir un aumento

significativo en los niveles de AMPc (Moyle y Ramachandran, 1973; Dufau y col., 1973; Mendelson y col., 1975; Padmanabhan y col., 1991).

Se ha reportado que la célula de Sertoli es muy sensible a la acción de la FSH en estimular la expresión génica y en sintetizar la subunidad  $\alpha$  de inhibina inmunoreactiva (Toebosch y col., 1989; Grootenhuis y col., 1990). En el presente estudio, las células de Sertoli inmaduras en cultivo respondieron en forma similar al estímulo con ambas gonadotrofinas para producir la subunidad  $\alpha$  de inhibina. Al relacionar estos resultados con la microheterogeneidad molecular de las gonadotrofinas utilizadas, se podría postular que la producción de este péptido no estaría afectada por el grado de sialización y de complejidad de los oligosacáridos presentes en estas preparaciones.

En el presente estudio, las células de Sertoli en cultivo, si bien confirmaron la capacidad de producir niveles elevados de inhibina B en condiciones basales, fueron incapaces de responder al estímulo de las preparaciones de FSHh utilizadas. Estudios previos demostraron la falta de respuesta al estímulo gonadotrófico a nivel del ARNm de la subunidad  $\beta$ B de inhibina/activina en células de Sertoli inmaduras (Klajj y col., 1990). Por otra parte, el perfil sérico de inhibina B determinado en ratas macho confirmó el aumento que se producía en estos animales entre los 3 y 10 días, edad en la cual la concentración sérica de FSH es muy baja (Sharpe y col., 1999; Buzzard y col., 2004; Winters y Moore, 2004).

Al evaluar la acción biológica de las dos preparaciones nativas de FSHh, resultó de interés establecer las posibles diferencias y/o semejanzas en el perfil de distribución de los análogos de carga contenidos en ambas preparaciones de FSHh y determinar su efecto biológico *in vitro*.

El perfil de distribución de los análogos de carga de las dos gonadotrofinas confirmó resultados obtenidos previamente por otros autores, utilizando diferentes metodologías para el aislamiento de las variantes glicosiladas, el cromatoenfoco

y el isoelectroenfoco en gel. El rango de pH en el cual se detectó la hormona y el intervalo correspondiente a la proporción predominante de ambas preparaciones de FSHh coincidieron con los descriptos previamente por Ulloa-Aguirre y col. (1992), Cerpa-Poljak y col. (1993), Horsman y col. (2000) y Loreti y col. (2013a).

La caracterización de las preparaciones de FSH humana indicó que ambas presentan diferencias en su grado de sialización; la hormona hipofisaria resultó menos ácida que su análoga recombinante. Sin embargo, no sólo el grado de sialización de la hormona está implicado en la regulación de la biopotencia de la FSH, sino también la complejidad de sus oligosacáridos (Creus y col., 2001). Es posible entonces, que una diferencia en este último aspecto de la microheterogeneidad molecular de la gonadotropina haya contribuido también a incrementar su biopotencia. Se ha reportado en la literatura que las gonadotropinas de origen hipofisario y recombinante humanas presentan importantes variaciones en las proporciones de oligosacáridos con diferencias en su procesamiento (Hard y col., 1990; Loreti y col., 2013a).

A continuación, para evaluar el efecto del grado de sialización de la FSHrh sobre la producción de AMPc, estradiol, inhibina B y Pro- $\alpha$ C en cultivos de células de Sertoli inmaduras fue necesario aislar análogos de carga de FSH con diferente grado de sialización. El aislamiento de análogos de carga con diferente grado de sialización se realizó a partir de FSHrh ya que la disponibilidad de FSHh no permitió obtener cantidades suficientes de variantes de glicosilación para realizar estos experimentos. Se utilizó el IEF preparativo, que permite mantener la muestra en solución y refrigerada durante todo el procedimiento, preservando así su actividad biológica. De esta manera se obtuvieron 3 preparaciones de análogos de carga de FSHrh: 1) con alto grado de sialización, aislada en intervalos de pH ubicados en el extremo inferior del gradiente (FSHrh<sub>3.00-4.09</sub>); 2) con un grado de sialización correspondiente al intervalo de pH en el cual se encuentra la proporción

predominante de la hormona (FSHrh<sub>4.10-4.99</sub>), y 3) con bajo grado de sialización, aislada en los intervalos de pH ubicados en el extremo superior del gradiente (FSHrh<sub>>5.00</sub>).

Los análogos de carga con menor grado de sialización constituyeron el estímulo más potente para la producción de AMPc, estradiol e inhibina B. La producción de Pro- $\alpha$ C resultó favorecida por análogos de carga contenidos en la FSHrh con menor grado de sialización cuando se estimuló con bajas dosis; sin embargo, los análogos de carga con mayor grado de sialización resultaron más biopotentes para estimular la producción de este péptido a las dosis más altas analizadas en este estudio.

Estos resultados sugieren que la misma mezcla de variantes de glicosilación puede ejercer una acción diferencial en la regulación de la actividad endocrina de la célula de Sertoli inmadura. Trabajos previos realizados en células de la granulosa en cultivo, han descrito respuestas diferenciales asociadas con el grado de sialización de FSHhh. Los análogos de carga menos sializados mostraron una mayor capacidad para estimular la producción de AMPc, la aromatización de andrógenos y/o la actividad enzimática del activador de plasminógeno (tPA) respecto de las variantes más sializadas (Ulloa-Aguirre y col., 1992; Zambrano y col., 1999; Timossi y col., 2000). Por el contrario, las preparaciones de análogos de carga más acídicas/sializadas ejercieron un estímulo más marcado sobre la expresión génica del precursor de la subunidad  $\alpha$  de inhibina (Timossi y col., 2000; Barrios De Tomasi y col., 2002).

Un resultado particularmente interesante se obtuvo al analizar la producción de inhibina B en estas células. Como se mencionó anteriormente, tanto las dos preparaciones nativas de FSHh utilizadas en esta parte del estudio, como las mezclas de análogos de carga aislados a pH menor de 5, con mayor grado de sialización, no lograron provocar cambios en la producción del dímero. Por el

contrario, los análogos de carga con menor grado de sialización lograron incrementar la producción de inhibina B. Estos resultados indicarían que la importante producción de inhibina B, característica de las células de Sertoli inmaduras, sólo puede ser incrementada por una hormona prácticamente desprovista de ácido siálico. Desde el punto de vista fisiológico, esta situación es difícil de reproducir *in vivo*, ya que si estuviera presente en circulación esta hormona, sería captada rápidamente por el receptor hepático de asialoglicoproteínas (Ashwell y Harford, 1982) y en consecuencia, no llegaría a actuar sobre la célula blanco.

Surge el interrogante entonces, acerca de cuál sería el posible mecanismo involucrado en esta respuesta diferencial inducida por ligandos, actuando sobre el mismo receptor de membrana. Arey y col. (1997) demostraron que las moléculas de FSH recombinante o la hormona totalmente deglicosilada, o con oligosacáridos incompletos (con alto contenido en manosa y bajo grado de sialización), activarían selectivamente proteínas  $G\alpha_i$ , mientras que moléculas de hormona nativa actuarían a través de proteínas  $G\alpha_s$ .

Recientemente, se ha propuesto que la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula de FSH, afectando la conformación del complejo hormona-receptor, permitiría activar distintas cascadas de transducción de señales y de este modo promover respuestas biológicas diferenciales (Ulloa-Aguirre y col., 2011; Arey y Lopez, 2011; Landomiel y col., 2014).

Los resultados obtenidos en esta parte de la presente Tesis demuestran que el grado de sialización de la FSH es una característica de la hormona capaz de afectar diferencialmente la actividad endocrina de la célula de Sertoli inmadura en términos de la producción de AMPc, estradiol e inhibinas.

# ***Conclusiones***

La FSH, secretada por la hipófisis anterior, regula procesos reproductivos esenciales tales como el desarrollo y mantenimiento de la espermatogénesis y el desarrollo folicular. La porción carbohidratada de la molécula determina su actividad biológica; en particular, el grado de sialización afecta su biopotencia *in vivo*, como también la respuesta *in vitro* de la célula blanco. El estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de este aspecto de la microheterogeneidad molecular de FSH contribuirá al diagnóstico y al diseño de nuevas terapéuticas para el tratamiento de disfunciones del eje reproductivo relacionadas con el mecanismo de acción de la gonadotropina.

En el presente trabajo de Tesis se ha demostrado que:

- La ausencia de función testicular desde etapas tempranas de la vida altera el mecanismo de regulación del grado de sialización de la FSH
- Los cambios hormonales característicos del desarrollo sexual indujeron un incremento del grado de sialización de la FSH hipofisaria posiblemente a través de su acción sobre la expresión génica de la sialiltransferasa *ST6gal1*
- El grado de sialización de la FSH constituiría un factor regulatorio adicional sobre la actividad endocrina de la célula de Sertoli inmadura

*La hipófisis posee la capacidad de modular la función del testículo modificando, no solo la cantidad de FSH secretada, sino también la estructura y composición de los oligosacáridos adicionados a la cadena polipeptídica los cuales determinan la biopotencia de la hormona.*

*Este trabajo de Tesis profundiza el conocimiento sobre la regulación hormonal de la glicosilación de la FSH y el impacto de los diferentes análogos de carga sobre la actividad endocrina de la célula de Sertoli inmadura. La integridad de la función del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal sería indispensable para mantener los mecanismos normales de regulación del grado de sialización de la FSH el cual se ejerce a través de la expresión génica de las sialiltransferasas presentes en el gonadotropo.*

Bioq. Verónica Ambao  
Doctorando

Dra. Stella Campo  
Directora

Dra. Susana Rulli  
Directora Adjunta

Dr. Belisario Fernández  
Consejero de Estudios

# ***Bibliografía***

## Referencias bibliográficas

- Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci* 35(2):74-82.
- Abbott KL, Nairn AV, Hall EM, Horton MB, McDonald JF, Moremen KW, Dinulescu DM, Pierce M. (2008) Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics* 8(16):3210-20.
- Al-Attar L, Noël K, Dutertre M, Belville C, Forest MG, Burgoyne PS, Josso N, Rey R. (1997) Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 100(6): 1335-43.
- Albanese C, Colin IM, Crowley WF, Ito M, Pestell RG, Weiss J, Jameson JL. (1996) The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res* 51:23-61.
- Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Lannering B, Dunkel L, Selstam G, Norjavaara E. (1997) Twenty-four-hour profiles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone, and estradiol levels: a semilongitudinal study throughout puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 82(2):541-9.
- Ambao V, Zaldivar V, Fernandez Vera G, Gottlieb S, Creus S, Campo S. (1999) Polimorfismo de FSH en ausencia de gonada masculina. Acción del GnRH. *Medicina* 59: 5/2; R 164.
- Anderson RA, Wallace EM, Groome NP, Bellis AJ, Wu FC. (1997) Physiological relationships between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Hum Reprod* 12(4):746-51.
- Andersson AM, Juul A, Petersen JH, Müller J, Groome NP, Skakkebaek NE. (1997) Serum inhibin B in healthy pubertal and adolescent boys: relation to age, stage of puberty, and follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12):3976-81.
- Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. (1998) Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2):675-81.
- Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, Lopez 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(5):517-26.
- Arey BJ, López FJ. (2011) Are circulating gonadotropin isoforms naturally occurring biased agonists? Basic and therapeutic implications. *Rev Endocr Metab Disord* 12(4):275-88.
- Arslan M, Weinbauer GF, Khan SA, Nieschlag E. (1989) Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, selectively maintain pituitary and serum follicle-stimulating hormone in gonadotropin-releasing hormone antagonist treated male rats. *Neuroendocrinology* 49(4):395-401.
- Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Domokos I, Ezrin C. (1986) Human fetal adenohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* 43(3):308-16
- Ashwell G, Harford J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*. 51:531-54.
- 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.

- Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ. (1994) The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl* 15(1):15-21.
- Barrios De Tomasi J, Timossi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Andersen CY, Ulloa-Aguirre A. (2002) Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol* 186(2):189-98.
- Barthel SR, Gavino JD, Wiese GK, Jaynes JM, Siddiqui J, Dimitroff CJ. (2008) Analysis of glycosyltransferase expression in metastatic prostate cancer cells capable of rolling activity on microvascular endothelial (E)-selectin. *Glycobiology* 18(10):806-17.
- Beck-Peccoz P, Padmanabhan V, Baggiani AM, Cortelazzi D, Buscaglia M, Medri G, Marconi AM, Pardi G, Beitins IZ. (1991) Maturation of hypothalamic-pituitary-gonadal function in normal human fetuses: circulating levels of gonadotropins, their common alpha-subunit and free testosterone, and discrepancy between immunological and biological activities of circulating follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 73(3):525-32.
- Bedecarrás P, Gryngarten M, Ayuso S, Escobar ME, Bergadá C, Campo S. (1998) Characterization of serum SHBG isoforms in prepubertal and pubertal girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49(5):603-8.
- Bergadá I, Rojas G, Ropelato G, Ayuso S, Bergadá C, Campo S. (1999) Sexual dimorphism in circulating monomeric and dimeric inhibins in normal boys and girls from birth to puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 51(4):455-60.
- Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato MG, Gottlieb S, Bergadá C, Campo S, Rey RA. (2006) Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J Clin Endocrinol Metab* 91(10):4092-8.
- Bernard DJ, Fortin J, Wang Y, Lamba P. (2010) Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we don't, and why you should care. *Fertil Steril* 93(8):2465-85.
- Berninsone PM, Hirschberg CB. (2000) Nucleotide sugar transporters of the Golgi apparatus. *Curr Opin Struct Biol* 10(5):542-7.
- Bhasin S, Fielder TJ, Swerdloff RS. (1987) Testosterone selectively increases serum follicle-stimulating hormonal (FSH) but not luteinizing hormone (LH) in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated male rats: evidence for differential regulation of LH and FSH secretion. *Biol Reprod* 37(1):55-9
- Bicsak TA, Tucker EM, Cappel S, Vaughan J, Rivier J, Vale W, Hsueh AJ. (1986) Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology* 119(6):2711-9.
- Bicsak TA, Vale W, Vaughan J, Tucker EM, Cappel S, Hsueh AJ. (1987) Hormonal regulation of inhibin production by cultured Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 49(2-3):211-7.
- Bilezikjian LM, Vaughan JM, Vale WW. (1993) Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 133(6):2545-53.
- Bilezikjian, L.M., Corrigan, A.Z. and Vale, W.W. (1994) Activin-B, inhibin-B and follistatin as autocrine/paracrine factors of the rat anterior pituitary. *En: Burger, H.G., Findlay, J., Robertson, D. et al. (eds), Inhibin and Inhibin-related Peptides. Ares-Serono Symposia Publications, Rome, pp. 81-99.*
- Bilezikjian LM, Leal AM, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW. (2003) Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1beta and a major source of intrapituitary follistatin. *Endocrinology* 144(2):732-40.

- Blithe DL (1990) Carbohydrate composition of the  $\alpha$ -subunit of human choriogonadotropin (hCG $\alpha$ ) and the free  $\alpha$  molecules produced in pregnancy: most free  $\alpha$  and some combined hCG molecules are fucosylated. *Endocrinol* 126: 2788-2799.
- Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR. (1995) Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 136(12):5438-44.
- Braden TD, Conn PM. (1992) Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 130(4):2101-5.
- Brauner R, Neve M, Allali S, Trivin C, Lottmann H, Bashamboo A, McElreavey K. (2011) Clinical, biological and genetic analysis of anorchia in 26 boys. *PLoS One* 6(8):e23292.
- Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnhold IJ, Mendonca BB. (1999) Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 84(10):3539-44.
- Burger LL, Haisenleder DJ, Aylor KW, Dalkin AC, Prendergast KA, Marshall JC. (2004) Regulation of luteinizing hormone-beta and follicle-stimulating hormone (FSH)-beta gene transcription by androgens: testosterone directly stimulates FSH-beta transcription independent from its role on follistatin gene expression. *Endocrinology* (1):71-8
- Buzzard JJ, Loveland KL, O'Bryan MK, O'Connor AE, Bakker M, Hayashi T, Wreford NG, Morrison JR, de Kretser DM. (2004) Changes in circulating and testicular levels of inhibin A and B and activin A during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 145(7):3532-41.
- Byrd W, Bennett MJ, Carr BR, Dong Y, Wians F, Rainey W. (1998) Regulation of biologically active dimeric inhibin A and B from infancy to adulthood in the male. *J Clin Endocrinol Metab* 83(8):2849-54.
- Cai K, Hua G, Ahmad S, Liang A, Han L, Wu C, Yang F, Yang L. (2011) Action mechanism of inhibin  $\alpha$ -subunit on the development of Sertoli cells and first wave of spermatogenesis in mice. *PLoS One* 6(10) Erratum in: *PLoS One*. 2012;7(8).
- Campo S, Ambao V, Creus S, Gottlieb S, Fernandez Vera G, Benencia H, Bergadá C. (2007) Carbohydrate complexity and proportions of serum FSH isoforms in the male: lectin-based studies. *Mol Cell Endocrinol* 260-262:197-204.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. (1993) Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology* 132(1):351-6.
- Chada M, Průša R, Bronský J, Pechová M, Kotaska K, Lisá L. (2003) Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol and their relationship to the regulation of follicle development in girls during childhood and puberty. *Physiol Res* 52(3):341-6.
- Chang JP, Graeter JS, Catt KJ. (1988) Desensitization of pituitary gonadotropes by mediators of LH release. *Biochem Biophys Res Commun* 153(3):919-24.
- Chappel SC (1981) The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by concanavalin A chromatography. *Endocrinol* 109: 935-942.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. (1983) Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 4(2):179-211.
- Chappel SC, Ramaley JA. (1985) Changes in the isoelectric focusing profile of pituitary follicle-stimulating hormone in the developing male rat. *Biol Reprod* 32(3):567-73.
- Cheng C, Frick J, Gunsalus G, Musto N, Bardin C (1984) Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with serum testosterone-estradiol-binding globulin. *Endocrinol* 114 (4):1395-1401.

- Cheng CK, Leung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev* 26(2):283-306.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
- Chui D, Oh-Eda M, Liao YF, Panneerselvam K, Lal A, Marek KW, Freeze HH, Moremen KW, Fukuda MN, Marth JD. (1997) Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* 90(1):157-67.
- Clayton RN. (1982) Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* 111(1):152-61.
- Clayton RN, Catt KJ. (1981) Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 2(2):186-209.
- Corbier P, Dehennin L, Castanier M, Mebazaa A, Edwards DA, Roffi J. (1990) Sex differences in serum luteinizing hormone and testosterone in the human neonate during the first few hours after birth. *J Clin Endocrinol Metab* 71(5):1344-8.
- Cortes D, Müller J, Skakkebaek NE. (1987) Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl* 10(4):589-96
- Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E. (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* 20(34):4696-709.
- Creus S, Pellizzari E, Cigorruga S, Campo S (1996) Human FSH isoforms: bio and immunoactivity in post-menopausal and normal menstruating women. *Clinical Endocrinol* 44:2, 181-189.
- Creus S, Gottlieb S, Bergadá C, Pellizzari E, Cigorruga S, Campo S. (1998) Polimorfismo de FSH en la pubertad masculina: efecto del GnRH. *Medicina* Vol 58, Suplemento 5, R 25.
- Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. (2001) Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 174(1-2):41-9.
- Crofton PM, Illingworth PJ, Groome NP, Stirling HF, Swanston I, Gow S, Wu FC, McNeilly A, Kelnar CJ. (1997) Changes in dimeric inhibin A and B during normal early puberty in boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46(1):109-14.
- Crofton PM, Evans AE, Groome NP, Taylor MR, Holland CV, Kelnar CJ. (2002) Inhibin B in boys from birth to adulthood: relationship with age, pubertal stage, FSH and testosterone. *Clin Endocrinol (Oxf)*.56(2):215-21.
- 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(2):917-24.
- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. (1999) Oestrogens regulate pituitary alpha2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 23(2):153-65.
- Dan-Cohen H, Ben-Menahem D, Naor Z. (1990) The gonadotropin-releasing hormone receptor: signals involved in gonadotropin secretion and biosynthesis. *Horm Res* 33(2-4):76-86.
- Danzo BJ, Black JH (1990) Structure of asparagine-linked oligosaccharides on human and rabbit testosterone-binding globulin. *Biol Reprod* 42: 472-482.
- Datta AK, Chammas R, Paulson JC. (2001) Conserved cysteines in the sialyltransferase sialylmotifs form an essential disulfide bond. *J Biol Chem* 276(18):15200-7.

- Datta AK. (2009) Comparative sequence analysis in the sialyltransferase protein family: analysis of motifs. *Curr Drug Targets* 10(6):483-98.
- Dorrington JH, Fritz IB, Armstrong DT. (1978) Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod* 8(1):55-64.
- Dufau ML, Tsuruhara T, Catt KJ (1972) Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* 278: 281-292.
- Dufau ML, Watanabe K, Catt KJ. (1973) Stimulation of cyclic AMP production by the rat testis during incubation with hCG in vitro. *Endocrinology* 92(1):6-11.
- Erickson GF, Hsueh AJ. (1978) Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 103(5):1960-3.
- Esch FS, Shimasaki S, Mercado M, Cooksey K, Ling N, Ying S, Ueno N, Guillemin R. (1987) Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol* (11):849-55.
- Escobar ME, Rivarola MA, Bergadá C. (1976) Plasma concentration of oestradiol-17beta in premature thelarche and in different types of sexual precocity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 81(2):351-61.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 9(5):500-32.
- Fernández-Vázquez G, Kaiser UB, Albarracín CT, Chin WW. (1996) Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol Endocrinol* 10(4):356-66.
- Findlay JK, Tsonis CG, Doughton B, Brown RW, Bertram KC, Braid GH, Hudson GC, Tierney ML, Goss NH, Forage RG. (1989) Immunisation against the amino-terminal peptide (alpha N) of the alpha 43 subunit of inhibin impairs fertility in sheep. *Endocrinology* 124(6):3122-4.
- Findlay JK, Russell DL, Doughton B, Tsonis CG, Borchers C, Forage RG. (1994) Effect of active immunization against the amino-terminal peptide (alpha N) of the alpha 43 kDa subunit of inhibin (alpha 43) on fertility of ewes. *Reprod Fertil Dev* 6(2):265-7.
- Finkelstein JS, Whitcomb RW, O'Dea LS, Longcope C, Schoenfeld DA, Crowley WF Jr. (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(3):609-20.
- Fischer WH, Park M, Donaldson C, Wiater E, Vaughan J, Bilezikjian LM, Vale W (2003) Residues in the C-terminal region of activin A determine specificity for follistatin and type II receptor binding. *J Endocrinol* 176(1):61-8.
- Flores JA, Veldhuis JD, Leong DA. (1990) Follicle-stimulating hormone evokes an increase in intracellular free calcium ion concentrations in single ovarian (granulosa) cells. *Endocrinology* 127(6):3172-9.
- Forage RG, Ring JM, Brown RW, McInerney BV, Cobon GS, Gregson RP, Robertson DM, Morgan FJ, Hearn MT, Findlay JK, et al. (1986) Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(10):3091-5.
- Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. (1974) Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest* 53(3):819-28.

- Forest MG, De Peretti E, Bertrand J. (1976) Hypothalamic-pituitary-gonadal relationships in man from birth to puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5(5):551-69.
- Foulds LM, Robertson DM. (1983) Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. *Mol Cell Endocrinol* 31(1):117-30.
- Fox KM, Dias JA, Van Roey P. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol* 15(3):378-89.
- Fragale A, Puglisi R, Morena AR, Stefanini M, Boitani C. (2001) Age-dependent activin receptor expression pinpoints activin A as a physiological regulator of rat Sertoli cell proliferation. *Mol Hum Reprod* 7(12):1107-14.
- Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG, Dorrington JH. (1976) Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J Reprod Fertil* 46(1):17-24.
- Gause WC, Adamovicz J. (1994) The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl* 3(6):S123-35.
- Gloaguen P, Crépieux P, Heitzler D, Poupon A, Reiter E. (2011) Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011;2:45.
- Gondos B, Berndtson WE (1993) Postnatal and pubertal development. En: The Sertoli cell. Ed: LD Russell, MD Griswold, Cache River Press, Clearwater, FL. Pág. 116-53.
- Gorczyńska E, Handelsman DJ. (1991) The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *J Biol Chem* 266(35):23739-44.
- Gospodarowicz D, Lau K. (1989) Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* 165(1):292-8.
- Greenwood FC, Hunter WM & Glover JS (1963) The preparation of I-131-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochemical Journal* 89, 114-123
- Grinspon RP, Ropelato MG, Bedecarrás P, Loreti N, Ballerini MG, Gottlieb S, Campo SM, Rey RA. (2012) Gonadotrophin secretion pattern in anorchid boys from birth to pubertal age: pathophysiological aspects and diagnostic usefulness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76(5):698-705.
- Griswold MD (1993) Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. En: The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, FL. Pág. 494-508. Editores: LD Russel, MD Griswold.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, McNeilly AS. (1994) Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40(6):717-23.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Priddle J, Weaver K, McNeilly AS. (1995) Quantification of inhibin pro-alpha C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 80(10):2926-32.
- 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(4):1401-5.
- Grootenhuys AJ, van Beurden WM, Timmerman MA, de Jong FH. (1990) Follicle-stimulating hormone-stimulated secretion of an immunoreactive 29 kDa inhibin alpha-subunit complex, but not of 32 kDa bioactive inhibin, from cultured immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 74(2):125-32.
- 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.

- Grumbach MM. (2002) The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 57 Suppl 2:2-14.
- Hamr A, Delannoy P, Verbert A, Kolínská J. (1997) The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase in the small intestine of suckling rats is suppressed by mifepristone (RU-38.486). *J Steroid Biochem Mol Biol* 60(1-2):59-66.
- Hård K, Mekking A, Damm JB, Kamerling JP, de Boer W, Wijnands RA, Vliegenthart JF. (1990) Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 193(1):263-71
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83(8):727-37.
- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. (2005) The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 15(8):805-17.
- Harrison CA, Chan KL, Robertson DM. (2006) Activin-A binds follistatin and type II receptors through overlapping binding sites: generation of mutants with isolated binding activities. *Endocrinology* 147(6):2744-53.
- Heckert LL, Griswold MD. (1991) Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 5(5):670-7
- Helton TE, Magner JA. (1994) Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 134(6):2347-53.
- Herscovics A. (2001) Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie* 83(8):757-62.
- Horsman G, Talbot JA, McLoughlin JD, Lambert A, Robertson WR. (2000) A biological, immunological and physico-chemical comparison of the current clinical batches of the recombinant FSH preparations Gonal-F and Puregon. *Hum Reprod* 15(9):1898-902.
- Hoshina H, Boime I. (1982) Combination of rat lutropin subunits occurs early in the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(24):7649-53.
- Hugues JN. (2001) Recombinant human follicle-stimulating hormone: a scientific step to clinical improvement. *Reprod Biomed Online* 2(1):54-64.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. (2006) FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 18(9):1351-9.
- Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ. (1996) Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4):1321-5.
- Inouye S, Guo Y, DePaolo L, Shimonaka M, Ling N, Shimasaki S. (1991) Recombinant expression of human follistatin with 315 and 288 amino acids: chemical and biological comparison with native porcine follistatin. *Endocrinology* 129(2):815-22.
- Jensen TK, Andersson AM, Hjollund NH, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, Henriksen TB, Ernst E, Bonde JP, Olsen J, McNeilly A, Groome NP, Skakkebaek NE. (1997) Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12):4059-63.

- Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB. (1984) Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol Reprod* 31(4):785-95.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. (1993) Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 133(2):931-4.
- Kamel F, Balz JA, Kubajak CL, Schneider VA. (1987) Gonadal steroids modulate pulsatile luteinizing hormone secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 120(4):1651-7.
- Kanasaki H, Bedecarrats GY, Kam KY, Xu S, Kaiser UB. (2005) Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology* 146(12):5503-13.
- Kaplan SL, Grumbach MM. (1976) The ontogenesis of human foetal hormones. II luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH). *Acta Endocrinol (Copenh)* 81(4):808-29.
- 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.
- Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJ, Boime I. (1989) Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 264(9):4769-75.
- Kelleher DJ, Gilmore R. (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16(4):47R-62R
- 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(2):741-8.
- Keutmann HT, Schneyer AL, Sidis Y. (2004) The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol Endocrinol* 18(1):228-40.
- Kitahara S, Winters SJ, Attardi B, Oshima H, Troen P. (1990) Effects of castration on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by pituitary cells from male rats. *Endocrinology* 126(5):2642-9.
- Klajj IA, Toebosch AM, Themmen AP, Shimasaki S, de Jong FH, Grootegoed JA. (1990) Regulation of inhibin alpha- and beta B-subunit mRNA levels in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 68(1):45-52.
- Knauer R, Lehle L. (1999a) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* 274(24):17249-56.
- Knauer R, Lehle L. (1999b). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1426(2):259-73.
- Kogawa K, Nakamura T, Sugino K, Takio K, Titani K, Sugino H. (1991) Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology* 128(3):1434-40.
- Kornfeld R, Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-64.
- Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102(2):344-52.

- Lacroix M, Smith FE, Fritz IB. (1977) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9(2):227-36.
- Landomiel F, Gallay N, Jégot G, Tranchant T, Durand G, Bourquard T, Crépieux P, Poupon A, Reiter E. (2014) Biased signalling in follicle stimulating hormone action. *Mol Cell Endocrinol* 382(1):452-9.
- Leadem CA, Kalra SP. (1984) Stimulation with estrogen and progesterone of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone release from perfused adult female rat hypothalami: correlation with the LH surge. *Endocrinology* 114(1):51-6.
- Leal AM, Blount AL, Donaldson CJ, Bilezikjian LM, Vale WW. (2003) Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by the interactions of activin-A, dexamethasone and testosterone in anterior pituitary cell cultures of male rats. *Neuroendocrinology* 77(5):298-304.
- Lebrun JJ, Takabe K, Chen Y, Vale W. (1999) Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. *Mol Endocrinol* 13(1):15-23.
- Le Gac F, de Kretser DM. (1982) Inhibin production by Sertoli cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 28(3):487-98.
- Le Magueresse B, Jégou B (1988) In vitro effects of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages. *Endocrinology* 122(4):1672-80.
- Levine JE, Bethea CL, Spies HG. (1985) *In vitro* gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic tissues of ovariectomized estrogen-treated cynomolgus macaques. *Endocrinology* 116(1):431-8.
- Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404(6776):411-4
- Lindzey J, Wetsel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS. (1998) Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 139(10):4092-101.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Esch F, Denoroy L, Guillemin R. (1985) Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(21):7217-21.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321(6072):779-82.
- Longmore GD, Schachter H. (1982) Product-identification and substrate-specificity studies of the GDP-L-fucose:2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucoside (FUC goes to Asn-linked GlcNAc) 6-alpha-L-fucosyltransferase in a Golgi-rich fraction from porcine liver. *Carbohydr Res* 100:365-92.
- Loreti N, Ambao V, Andreone L, Trigo R, Bussmann U, Campo S. (2013a) Effect of sialylation and complexity of FSH oligosaccharides on inhibin production by granulosa cells. *Reproduction* 145(2):127-35.
- Loreti N, Fresno C, Barrera D, Andreone L, Albarran SL, Fernandez EA, Larrea F, Campo S. (2013b) The glycan structure in recombinant human FSH affects endocrine activity and global gene expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 5;366(1):68-80.
- 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(2):125-38.

- Marathe DD, Chandrasekaran EV, Lau JT, Matta KL, Neelamegham S. (2008) Systems-level studies of glycosyltransferase gene expression and enzyme activity that are associated with the selectin binding function of human leukocytes. *FASEB J* 22(12):4154-67.
- 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 WA, Tanner JM. (1970) Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45(239):13-23.
- Martens JW, de Winter JP, Timmerman MA, McLuskey A, van Schaik RH, Themmen AP, de Jong FH. (1997) Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 138(7):2928-36.
- 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(6047):659-63.
- Massa G, de Zegher F, Vanderschueren-Lodeweyckx M. (1992) Serum levels of immunoreactive inhibin, FSH, and LH in human infants at preterm and term birth. *Biol Neonate* 61(3):150-5.
- Massagué J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3):169-78.
- Massicotte J, Lagacé L, Labrie F, Dorrington JH. (1984) Modulation of gonadotropin secretion by Sertoli cell inhibin, LHRH, and sex steroids. *Am J Physiol* 247(4 Pt 1):E495-504.
- Matsumoto AM, Bremner WJ. (1984) Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 58(4):609-14.
- McLean DJ, Friel PJ, Pouchnik D, Griswold MD. (2002) Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in follicle-stimulating hormone-treated rat Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 16(12):2780-92.
- Meachem SJ, Ruwanpura SM, Ziolkowski J, Ague JM, Skinner MK, Loveland KL (2005) Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation. *J Endocrinol* 186(3):429-46.
- Mendelson C, Dufau M, Catt K. (1975) Gonadotropin binding and stimulation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and testosterone production in isolated Leydig cells. *J Biol Chem* 250(22):8818-23.
- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. (2002) Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol* 174(2):195-204.
- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Galardo MN, Cigorraga SB. (2004) FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. *J Endocrinol* 180(2):257-65.
- Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Ibuki Y, Igarashi M, Minegishi T. (1991) Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 175(3):1125-30.
- Mistry DS, Tsutsumi R, Fernandez M, Sharma S, Cardenas SA, Lawson MA, Webster NJ. (2011) Gonadotropin-releasing hormone pulse sensitivity of follicle-stimulating hormone-beta gene is mediated by differential expression of positive regulatory activator protein 1 factors and corepressors SKIL and TGIF1. *Mol Endocrinol* 25(8):1387-403.
- Miyake T, Irahara M, Shitukawa K, Yasui T, Aono T. (1993) Interaction of activin A and gonadal steroids on FSH secretion from primary cultured rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 194(1):413-9.

- 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(5):1461-7.
- Moyle WR, Ramachandran J. (1973) Effect of LH on steroidogenesis and cyclic AMP accumulation in rat Leydig cell preparations and mouse tumor Leydig cells. *Endocrinology* 93(1):127-34.
- Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. (2008) Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem* 283(25):17298-313.
- Nairn AV, Aoki K, dela Rosa M, Porterfield M, Lim JM, Kulik M, Pierce JM, Wells L, Dalton S, Tiemeyer M, Moremen KW. (2012) Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis. *J Biol Chem* 287(45):37835-56.
- Najmabadi H, Rosenberg LA, Yuan QX, Reyaz G, Bhasin S. (1993) Transcriptional regulation of inhibin beta B messenger ribonucleic acid levels in TM.4 or primary rat Sertoli cells by 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate. *Mol Endocrinol* 7(4):561-9.
- 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(4):1008-14.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247(4944):836-8.
- Nakamura T, Asashima M, Eto Y, Takio K, Uchiyama H, Moriya N, Ariizumi T, Yashiro T, Sugino K, Titani K, et al. (1992) Isolation and characterization of native activin B. *J Biol Chem* 267(23):16385-9.
- 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.
- Nayudu PL, Vitt UA, Barrios De Tomasi J, Pancharatna K, Ulloa-Aguirre A. (2002) Intact follicle culture: what it can tell us about the roles of FSH glycoforms during follicle development. *Reprod Biomed Online* 5(3):240-53.
- Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM. (1973) Evidence for changes in sensitivity to testosterone negative feedback on gonadotropin release during sexual development in the male rat. *Endocrinology* 93(3):729-35.
- Nilsson B, Rosen SW, Weintraub BD, Zopf DA. (1986) Differences in the carbohydrate moieties of the common  $\alpha$  subunits of human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and thyrotropin: preliminary structural inferences from direct methylation analysis. *Endocrinology* 119: 2737-2743.
- Ogata S, Muramatsu T, Kobata A (1975) Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography of Concanavalin-A Sepharose. *J Biochem* 78: 687-696.
- Okuma Y, O'Connor AE, Hayashi T, Loveland KL, de Kretser DM, Hedger MP. (2006) Regulated production of activin A and inhibin B throughout the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *J Endocrinol* 190(2):331-40.
- Olivares A, Söderlund D, Castro-Fernández C, Zariñán T, Zambrano E, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. (2004) Basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution and in vitro biological-to-immunological ratio in male puberty. *Endocrine* 23(2-3):189-98.

- Olson DR, Blake CA. (1991) Basal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release rates as a function of time after castration in female and male rats. *Neuroendocrinology* 53(2):124-33.
- Orth JM. (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203(4):485-92.
- Orth JM. (1984) The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology* 115(4):1248-55.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. (1988) Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122(3):787-94.
- 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(3):1089-98.
- Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, Brown MB, Ridings JW, Beitins IZ. (1991) Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 79(1-3):119-28.
- 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 WW, Marshall JC. (1986) Gonadotropin-releasing hormone differentially regulates expression of the genes for luteinizing hormone alpha and beta subunits in male rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(11):4026-9.
- Parsons TF, Pierce JG. (1980) Oligosaccharide moieties of glycoprotein hormones: bovine lutropin resists enzymatic deglycosylation because of terminal O-sulfated N-acetylhexosamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12):7089-93.
- Paul SJ, Ortolano GA, Haisenleder DJ, Stewart JM, Shupnik MA, Marshall JC. (1990) Gonadotropin subunit messenger RNA concentrations after blockade of gonadotropin-releasing hormone action: testosterone selectively increases follicle-stimulating hormone beta-subunit messenger RNA by posttranscriptional mechanisms. *Mol Endocrinol* 4(12):1943-55.
- Paulson JC, Colley KJ. (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 264(30):17615-8.
- 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 alpha and beta subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 259(24):15123-30.
- 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(3):814-9.
- 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(9):3103-6.
- Pierce JG, Parsons TF. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50:465-95.

- Pierik FH, Vreeburg JT, Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. (1998) Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83(9):3110-4.
- Pineau C, Sharpe RM, Saunders PT, Gérard N, Jégou B. (1990) Regulation of Sertoli cell inhibin production and of inhibin alpha-subunit mRNA levels by specific germ cell types. *Mol Cell Endocrinol* 30;72(1):13-22.
- Pitteloud N, Dwyer AA, DeCruz S, Lee H, Boepple PA, Crowley WF Jr, Hayes FJ (2008a) Inhibition of luteinizing hormone secretion by testosterone in men requires aromatization for its pituitary but not its hypothalamic effects: evidence from the tandem study of normal and gonadotropin-releasing hormone-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 93(3):784-91.
- Pitteloud N, Dwyer AA, DeCruz S, Lee H, Boepple PA, Crowley WF Jr, Hayes FJ. (2008b) The relative role of gonadal sex steroids and gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 93(7):2686-92.
- Plant TM J (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol* 226(2):T41-54.
- Porter KL, Shetty G, Meistrich ML. (2006) Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology* 147(3):1297-305.
- Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB (1991) Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 73(5):1141-9.
- Radicioni AF, Anzuini A, De Marco E, Nofroni I, Castracane VD, Lenzi A. (2005) Changes in serum inhibin B during normal male puberty. *Eur J Endocrinol* 152(3):403-9
- Rea MA, Weinbauer GF, Marshall GR, Nieschlag E. (1986) Testosterone stimulates pituitary and serum FSH in GnRH antagonist-suppressed rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 113(4):487-92.
- Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ. (1992) Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 267(30):21281-4.
- Renwick AG, Mizuochi T, Kochibe N, Kobata A. (1987) The asparagine-linked sugar chains of human follicle-stimulating hormone. *J Biochem* 101(5):1209-21
- Resende EA, Lara BH, Reis JD, Ferreira BP, Pereira GA, Borges MF. (2007) Assessment of basal and gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropins by immunochemiluminometric and immunofluorometric assays in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 92(4):1424-9.
- Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. (2003) AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 211(1-2):21-31.
- Rey RA, Grinspon RP. (2011) Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(2):221-38.
- Riera MF, Meroni SB, Gómez GE, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorruga SB. (2001) Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol* 122(1):88-97.
- Rini J, Esko J, Varki A. (2009) Glycosyltransferases and Glycan-processing Enzymes. *En: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 5.*
- Roberts V, Meunier H, Vaughan J, Rivier J, Rivier C, Vale W, Sawchenko P. (1989) Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 124(1):552-4.

- Robertson DM, Foulds LM, Ellis S. (1982) Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology* 111(2):385-9
- Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MT, Burger HG, Wettenhall RE, de Kretser DM. (1985) Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 16;126(1):220-6.
- Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ. (1982). Development and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 65(2):281-8.
- Ropelato MG, Escobar ME, Gottlieb S, Bergadá C. (1997) Gonadotropin secretion in prepubertal normal and agonadal children evaluated by ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assays. *Horm Res.* 1997;48(4):164-72.
- Ropelato MG, Bergadá I, Rojas G, Heinrich JJ. (1998) Niveles séricos de LH y FSH desde la infancia hasta la pubertad evaluados con un ensayo fluorométrico ultrasensible (IFMA) *Rev HNRG* 40, 84-90.
- Rulli SB, Gonzalez-Calvar SI, Campo S, Calandra RS (1995) Effects of two non-steroidal antiandrogens on testicular function in prepubertal rats. *J Androl* 16(3):225-32.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. (1996) Immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology* 63(6):514-21.
- Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorruga SB, Calandra RS, Campo S. (1999) Androgen regulation of immunological and biological activities of pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in male rats. *Neuroendocrinology* 70(4):255-60.
- Rulli SB, Zitta K, Calandra RS, Campo S. (2003) Effect of dihydrotestosterone on pituitary follicle-stimulating hormone isoforms in adult male rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Neuroendocrinology* 78(5):280-6.
- Russell LD (1993) Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells. En: *The Sertoli cell*. Ed: LD Russell, MD Griswold, Cache River Press, Clearwater, FL. Pág. 1-38.
- Russell DL, Doughton BW, Tsonis CG, Findlay JK. (1994) Pituitary and ovarian function in ewes immunized against the amino-terminal peptide (alpha N) of the inhibin alpha 43-subunit. *J Reprod Fertil* 100(1):115-22.
- Russell DL, Salamonsen LA, Findlay JK. (1995) Immunization against the N-terminal peptide of the inhibin alpha 43-subunit (alpha N) disrupts tissue remodeling and the increase in matrix metalloproteinase-2 during ovulation. *Endocrinology* 136(8):3657-64.
- 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, Manjunath P. (1982) Studies on pituitary follitropin. XI. Induction of hormonal antagonistic activity by chemical deglycosylation. *Mol Cell Endocrinol* 28(2):139-50.
- Schally AV. (1978) Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202(4363):18-28.
- Sharma OP, Khan SA, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E. (1990) Effects of androgens on bioactivity and immunoreactivity of pituitary FSH in GnRH antagonist-treated male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122(2):168-74.
- Sharpe RM, Turner KJ, McKinnell C, Groome NP, Atanassova N, Millar MR, Buchanan DL, Cooke PS. (1999) Inhibin B levels in plasma of the male rat from birth to adulthood: effect of experimental manipulation of Sertoli cell number. *J Androl* 20(1):94-101.

- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6):769-84.
- Sherins RJ, Loriaux DL. (1973) Studies of the role of sex steroids in the feedback control of FSH concentrations in men. *J Clin Endocrinol Metab* 36(5):886-93.
- Shimasaki S, Koga M, Esch F, Cooksey K, Mercado M, Koba A, Ueno N, Ying SY, Ling N, Guillemin R. (1988) Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(12):4218-22.
- Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N. (1991) Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology* 28(6):3313-5.
- Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK, Nieschlag E. (1992) Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic androgen deprivation induced by castration or androgen blockade. *J Mol Endocrinol* 9(2):175-82.
- Sklar CA, Mueller PL, 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(3):874-80.
- Skinner MK, Griswold MD. (1982) Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol Reprod* 27(1):211-21.
- Smith PL, Baenziger JU. (1990) Recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosaminetransferase is independent of hormone native conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(18):7275-9.
- Smith PL, Baenziger JU. (1992) Molecular basis of recognition by the glycoprotein hormone-specific N-acetylgalactosamine-transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(1):329-33.
- Spady TJ, Shayya R, Thackray VG, Ehrensberger L, Bailey JS, Mellon PL. (2004) Androgen regulates follicle-stimulating hormone beta gene expression in an activin-dependent manner in immortalized gonadotropes. *Mol Endocrinol* 18(4):925-40.
- Spratt DI, O'Dea LS, Schoenfeld D, Butler J, Rao PN, Crowley WF Jr. (1988) Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol* 254(5 Pt 1):E658-66.
- 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(4):525-30.
- Steinberger A, Steinberger E. (1971) Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod* 4(1):84-7.
- Steinberger A, Steinberger E. (1976) Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 99(3):918-21.
- Schteingart HF, Meroni SB, Pellizzari EH, Pérez AL, Cigorruga SB. (1995) Regulation of Sertoli cell aromatase activity by cell density and prolonged stimulation with FSH, EGF, insulin and IGF-I at different moments of pubertal development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52(4):375-81.
- Stockell Hartree A, Renwick AG. (1992) Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J* 287 (Pt 3):665-79.
- Suescun MO, Scorticati C, Chiauzzi VA, Chemes HE, Rivarola MA, Calandra RS. (1985) Induced hypoprolactinemia and testicular steroidogenesis in man. *J Androl* 6(1):10-4.

- Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H. (1993) Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem* 268(21):15579-87.
- Terasawa E, Fernandez DL. (2001) Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 22(1):111-51.
- Thackray VG, McGillivray SM, Mellon PL. (2006) Androgens, progestins, and glucocorticoids induce follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression at the level of the gonadotrope. *Mol Endocrinol* 20(9):2062-79.
- Thackray VG, Mellon PL, Coss D. (2010) Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 314(2):192-203.
- Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS. (2005) The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* 9(4):535-43
- Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A. (2000) Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol* 165(2):193-205
- Toebosch AM, Robertson DM, Trapman J, Klaassen P, de Paus RA, de Jong FH, Grootegoed JA. (1988) Effects of FSH and IGF-I on immature rat Sertoli cells: inhibin alpha- and beta-subunit mRNA levels and inhibin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 55(1):101-5.
- Toebosch AM, Robertson DM, Klaij IA, de Jong FH, Grootegoed JA. (1989) Effects of FSH and testosterone on highly purified rat Sertoli cells: inhibin alpha-subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH but not by testosterone. *J Endocrinol* 122(3):757-62.
- Trigo RV, Bergadá I, Rey R, Ballerini MG, Bedecarrás P, Bergadá C, Gottlieb S, Campo S. (2004) Altered serum profile of inhibin B, Pro-alphaC and anti-Müllerian hormone in prepubertal and pubertal boys with varicocele. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(6):758-64.
- Tsai-Morris CH, Aquilano DR, Dufau ML. (1985) Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. *Endocrinology* 116(1):38-46.
- Tsuji S, Datta AK, Paulson JC. (1996) Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* 6(7):v-vii.
- Tulsiani DR, Hubbard SC, Robbins PW, Touster O. (1982) alpha-D-Mannosidases of rat liver Golgi membranes. Mannosidase II is the GlcNAcMAN5-cleaving enzyme in glycoprotein biosynthesis and mannosidases Ia and IB are the enzymes converting Man9 precursors to Man5 intermediates. *J Biol Chem* 257(7):3660-8.
- 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(23):8282-6.
- 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(2):257-66.
- Ulloa-Aguirre A, Mejia JJ, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz-Sánchez V, Larrea F. (1986) Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J Endocrinol* 110(3):539-49
- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Diaz-Sanchez V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human FSH. *Hum Reprod* 7: 23-30.

- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitins IZ, Padmanabhan V. (1995) Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 16(6):765-87.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. (1999) Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 11(3):205-15.
- Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damián-Matsumura P, Timossi C. (2001) Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res* 32(6):520-32.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P. (2003) Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from *in vitro* and *in vivo* models. *Biol Reprod* 69(2):379-89.
- Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera AM, Casas-González P, Dias JA. (2007) Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine* 32(3):251-63.
- Ulloa-Aguirre A, Dias JA, Bousfield G. (2009) Gonadotropins and the importance of glycosylation. *En: Post translational modifications of proteins biopharmaceuticals*, pág. 109-147. Editores: G. Walsh G; Wille VCH.
- Ulloa-Aguirre A, Crépieux P, Poupon A, Maurel MC, Reiter E. (2011) Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev Endocr Metab Disord* 12(4):259-74
- Ultee-van Gessel AM, de Jong FH. (1987) Inhibin-like activity in Sertoli cell culture media and testicular homogenates from rats of various ages. *J Endocrinol* 113(1):103-10.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J. (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 19-25;321(6072):776-9.
- Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko P, et al (1988) Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 44:1-34.
- Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J. (1990) The inhibin/activin family of growth factors. *En: Peptide Growth Factors and Their Receptors, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer - Verlag, Heidelberg, pp. 211-248. Editores: Spron MA, Roberts AB.
- Vandamme V, Pierce A, Verbert A, Delannoy P. (1993) Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur J Biochem* 211(1-2):135-40.
- Vertino-Bell A, Ren J, Black JD, Lau JT. (1994) Developmental regulation of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase in small intestine epithelium. *Dev Biol* 165(1):126-36.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL. (1998) Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59(4):854-61.
- Vogel DL, Sherins RJ. (1984) Orchiectomy in young rats results in differential regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone content. *J Androl* 5(2):80-6.
- Walker WH, Cheng J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130(1):15-28.
- Wang XC, Smith TJ, Lau JT. (1990) Transcriptional regulation of the liver beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase by glucocorticoids. *J Biol Chem* 265(29):17849-53.
- Wayne CM1, Fan HY, Cheng X, Richards JS. (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 21(8):1940-57.

- Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai PH, Paulson JC. (1987) Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor. *J Biol Chem* 25;262(36):17735-43.
- Weiss J, Guendner MJ, Halvorson LM, Jameson JL. (1995) Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology* 136(5):1885-91.
- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. (2002) Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(9):724-52.
- Wen DX, Livingston BD, Medzihradzky KF, Kelm S, Burlingame AL, Paulson JC. (1992) Primary structure of Gal beta 1,3(4)GlcNAc alpha 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* 15;267(29):21011-9.
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, van Kessel H, Mulder GH, Foster JP, Schoemaker J. (1988) Luteinizing hormone secretion patterns in boys at the onset of puberty measured using a highly sensitive immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 67(5):924-8.
- Wiater E, Harrison CA, Lewis KA, Gray PC, Vale WW. (2006) Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J Biol Chem* 281(25):17011-22.
- Wiater E, Lewis KA, Donaldson C, Vaughan J, Bilezikjian L, Vale W. (2009) Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Mol Endocrinol* 23(7):1033-42.
- Wide L. (1986) The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112(3):336-44.
- Wide L. (1989) Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol* 123(3):519-29.
- 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(1):271-6.
- Wide L, Albertsson-Wikland K, Phillips DJ. (1996) More basic isoforms of serum gonadotropins during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 81(1):216-21.
- Wierman ME, Wang C. (1990) Androgen selectively stimulates follicle-stimulating hormone-beta mRNA levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Biol Reprod* 42(3):563-71.
- Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P, Attardi B. (1992) Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130(2):726-3.
- Winters SJ. (1996) Relationship between gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels and plasma gonadotropin concentrations in intact and orchidectomized adult rats. *Biol Reprod* 55(4):828-32.
- Winters SJ, Moore JP. (2004) Intra-pituitary regulation of gonadotrophs in male rodents and primates. *Reproduction* 128(1):13-23.
- Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. (1999) Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine* 10(2):113-21.

---

*Referencias bibliográficas*

- Zeleznik AJ, Saxena D, Little-Ihrig L. (2003) Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144(9):3985-94.
- Zimmermann C, Stévant I, Borel C, Conne B, Pitetti JL, Calvel P, Kaessmann H, Jégou B, Chalmel F, Nef S. (2015) Research resource: the dynamic transcriptional profile of sertoli cells during the progression of spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 29(4):627-42.

*“Conserva celosamente tu derecho a reflexionar,  
porque incluso el hecho de pensar erróneamente  
es mejor que no pensar en absoluto”*

*Hipatia de Alejandría*