

USO DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE HUMANA RECOMBINANTE EN LA INFERTILIDAD ANOVULATORIA

Washington Rodríguez

RESUMEN

OBJETIVO: Estudiar los efectos usando dosis múltiples de la FSH humana recombinante en nueve mujeres con hipogonadismo hipogonadotrófico, analizando su capacidad de inducir el crecimiento folicular y síntesis de esteroides ováricos. **DISEÑO:** Trabajo clínico abierto. **MATERIAL Y MÉTODOS:** De nueve casos de hipogonadismo gonadotrófico, una tenía diagnóstico de síndrome de Kallman, una deficiencia aislada de gonadotropinas y siete panhipopituitarismo secundario a hipofisectomía. Se administró inyecciones IM de hFSHr (Folitropina-alfa Instituto Ares-Serono, Ginebra) en dosis crecientes (semana 1: 75 UI/día, semana 2: 150 UI/día, semana 3: 225 UI/día) durante un promedio de 17 días (rango: 15-19). Se efectuó toma de muestras de sangre regularmente y estudios ultrasonográficos frecuentes para monitorizar el desarrollo folicular. Para las mediciones hormonales se recurrió al radioinmunoanálisis. **RESULTADOS:** Las concentraciones séricas iniciales de FSH y de hormona luteinizante (LH) fueron 0,48 (0,09-1,22) UI/L y 0,26 (< 0,15-0,41) UI/L, respectivamente. Los valores máximos de FSH durante la prueba llegaron a 10,3 (7,9-13,6) UI/L, en tanto que las concentraciones séricas de LH significativamente permanecieron estables 0,33 (0,19-0,52) UI/L. Los niveles séricos de androstenediona y testosterona no mostraron cambios significativos durante la administración de hFSHr y el estradiol sérico reveló sólo un aumento leve: 131,7 (51-239) pmol/L. Se desarrollaron folículos múltiples que llegaron a dimensiones preovulatorias (> 14 mm), con un índice de desarrollo folicular de $1,92 \pm 0,7$ mm/día. **CONCLUSIONES:** Del presente trabajo se deduce que la hFSHr resultó efectiva en mujeres con deficiencia de gonadotropinas para estimular

el crecimiento folicular normal hasta la etapa preovulatoria e inducción de ovulación, sin impedirlo el aumento leve observado del estradiol. Asimismo, los niveles séricos de LH endógeno extremadamente bajos cursaron con secreción androgénica deficitaria, indicando la necesidad de contar con dicha gonadotropina para inducir una apropiada síntesis de esteroides.

Palabras clave: FSH humana recombinante, infertilidad anovulatoria, hipogonadismo hipogonadotrófico, síntesis de esteroides, crecimiento folicular.

Ginecol Obstet (Perú) 2000; 46 (2): 157-163

SUMMARY

OBJECTIVE: To study the effects of multiple doses of recombinant human FSH in 9 women with hypogonadotropic hypogonadism, analyzing its capacity to induce the follicular growth and ovarian steroids synthesis. **DESIGN:** Open clinical work. **MATERIAL AND METHODS:** In nine cases of hypogonadotropic hypogonadism -one with Kallman's syndrome, one isolated gonadotropin deficiency, and seven hypophysectomy panhypopituitarism- we administered parenteral hFSHr (Folliotropin alpha, Institute Ares-Serono, Geneva) in increasing doses (week 1: 75 IU/day, week 2: 150 IU/day, week 3: 225 IU/day) during 17 days average (range: 15-19). Blood samples were taken regularly for hormonal radioimmune analysis, and frequent ultrasound studies were conducted to scan follicular development. **RESULTS:** Initial serum FSH and LH levels were 0,48 (0,09-1,22) IU/L and 0,26 (< 0,15-0,41) IU/L respectively. Maximum FSH values reached 10,3 (7,9-13,6) IU/L and serum LH remained stable 0,33 (0,19-0,52) IU/L. Androstenedione and testosterone did not show significant changes during hFSHr administration and estradiol increased slightly to 131,7 (51-239) pmol/L. Multiple follicles developed to preovulatory size

Dr. Washington Rodríguez Gutiérrez
Profesor Principal del Departamento de Medicina Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú



(> 14 mm), with a follicular development index of 1,92 + 0,7 mm/day. CONCLUSIONS: From the current report it can be inferred that hFSHr was effective in women with gonadotropin deficiency to stimulate normal follicular growth up to preovulatory stage and ovulation induction, without impediment of estradiol slight increase. Likewise, endogenous LH extremely low serum levels carrying to androgenic secretion deficit, indicate the need of this gonadotropin to induce an appropriate steroid synthesis.

Key words: Recombinant human FSH, anovulatory infertility, hypogonadotropic hypogonadism, steroid synthesis, follicular growth.

Ginecol Obstet (Perú) 2000; 46 (2): 157-163

INTRODUCCIÓN

Por más de 30 años se viene utilizando en el tratamiento de la infertilidad humana las gonadotropinas menopáusicas humana (hMG) y coriónica (hCG) y la hormona folículoestimulante urinaria purificada (uFSH)¹. En nuestro país, comunicamos su empleo hace más de 25 años². Clínicamente se las aplica para inducir ovulación en mujeres con infertilidad anovulatoria³ y para la estimulación ovárica en técnicas de reproducción asistida⁴.

La hormona folículoestimulante humana (hFSH) tiene calidad de glicoproteína, con estructura molecular compleja, mostrando dos subunidades alfa y beta y cadenas laterales de carbohidratos. Últimamente ha sido elaborada por ingeniería genética con "tecnología del ADN recombinante". Esto fue posible cuando los investigadores llegaron a detectar y aislar los genes codificadores de dichas subunidades, que incorporados a los llamados vectores de clonación o plásmidos (moléculas circulares de ADN), por ensamblaje efectuado en la *E. coli*, facilitaron su ingreso o transferencia al interior de una célula huésped selectiva (eucariótica) de la línea celular de ovario de hámster chino (OHCh)⁵. La integración del material genético con el ADN cromosómico nuclear de la célula huésped hizo posible que llegara a excretar y obtener la hormona FSH humana recombinante (hFSHr) con una pureza del 99%, sin actividad de hormona luteinizante (LH) y muy similar a la hFSH natural⁶. Esto ofrece la oportunidad de estudiar, en modelo clínico, el rol que jugaría

esta gonadotropina sintética en la inducción de la ovulación y esteroidogénesis ovárica.

El estudio prospectivo de nuestra presentación tiene como objetivo valorar los efectos que se obtiene a nivel gonadal con el uso de dosis múltiples de la hFSHr, en mujeres con infertilidad anovulatoria e hipogonadismo hipogonadotrófico, justificando o no su empleo clínico, a la vez que se analiza su eficacia, seguridad, capacidad de inducir el crecimiento folicular y la síntesis de esteroides ováricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y diseño del estudio

Participaron voluntariamente nueve mujeres, en un trabajo clínico abierto, incluidas en el Grupo I de la clasificación de la OMS, con el diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrófico. En un caso se diagnosticó deficiencia congénita aislada de gonadotropinas (DAGn), otra con síndrome de Kallman (SK) y las siete restantes presentaron panhipopituitarismo secundario a hipofisectomía realizada en el Hospital Nacional E. Rebagliati Martins (HNERM), en cinco por macroprolactinomas (Pr), una por tumor hipofisiario no funcionante (TNF) y otra por quiste aracnoideo (QA).

La edad (promedio ± DS) fue 29,6 ± 3,4 años y el índice de masa corporal (IMC) 23,8 ± 2,3 kg/m². El estudio se hizo entre 1996-1999, con pacientes procedentes del HNERM y la consulta privada. Las participantes gozaban de buena salud, con hallazgos de laboratorio rutinario normales y con antecedentes comprobados de función gonadal normal, bien porque tuvieron uno o más partos normales, o respondieron a una estimulación previa con gonadotropinas (Tabla 1).

Los casos 3 al 9 estaban compensadas con tratamiento sustitutivo de hormonas tiroideas y cortisol, con excepción de las gonadotropinas. Las que recibían, se abstuvieron del tratamiento con estrógenos por lo menos 30 días antes de participar en este estudio. En cinco mujeres hipofisectomizadas con secreción remanente de prolactina fue necesario reducir sus niveles con bromocriptina, previamente y durante el estudio, para obtener buenas respuestas, comprobadas



Tabla 1. Características clínicas y endocrinas individuales de las nueve pacientes

Caso	Diagnóstico	Edad (años)	IMC (kg/m ²)	Respuesta anterior a hMG (+/-)	
1	ACCh	DAGn	30	21,6	+
2	DSR	SK	24	20,5	+
3	VE	TNF	36	22,8	NT
4	ASF	Pr	27	26,0	+
5	PGL	Pr	35	23,9	+
6	RPC	Pr	31	28,7	+
7	LEG	Pr	26	21,3	+
8	GGY	Pr	29	24,2	+
9	JLLA	QA	28	25,1	NT

NT = No tiene.

con el uso de hMG y hCG según el esquema convencional, cuyos resultados se puede observar en la Tabla 2. Después de un período de depuración para las gonadotropinas, de por lo menos cuatro semanas, las pacientes de este grupo fueron consideradas aptas para continuar con el protocolo.

Se programó para que todas las pacientes recibieran diariamente inyecciones IM de hFSHr (Folotropina-alfa, Gonol F[®], del Instituto Ares-Serono, Ginebra), hasta un período máximo de tres semanas consecutivas, con régimen de dosis crecientes (semana 1: 75 UI/día; semana 2: 150 UI/día; semana 3: 225 UI/día).

Tabla 2. Aumentos de estradiol (E₂) y progesterona (P) después de administrar gonadotropinas (hMG y hCG) en cinco mujeres hipofisectomizadas por macroprolactinomas, con secreción remanente de prolactina (PRL), antes y después de reducir los niveles de PRL con bromocriptina

Caso	Antes de la terapia			Después de la terapia		
	PRL	E ₂	P	PRL	E ₂	P
• ASF	63	25	1,5	9,8	1030	35,0
• PGL	92	39	1,8	10,3	592	54,1
• RPC	70	41	2,1	2,0	853	44,5
• LEG	50	32	1,1	2,5	702	38,2
• GGY	100	29	1,3	14,0	490	28,6

PRL = ng/ml; E₂ = pmol/L; P = nmol/L

Antes de cada inyección, se tomó muestra de sangre los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 18 y 19 durante el período de tratamiento y los días 21, 23, 25, 27, 29, 31 y 33 durante el período de seguimiento. Asimismo, se realizó monitorización ultrasonográfica transvaginal seriada antes de la administración de la droga y luego cada dos días, a partir del octavo día, hasta obtener un folículo con diámetro promedio mayor de 14 mm y concentraciones séricas referenciales de estradiol menor de 1100 pmol/L, consideradas como controles de seguridad para discontinuar el tratamiento y reducir el riesgo de la hiperestimulación ovárica. Como no se tenía planificado corregir la anovulación, sino más bien apreciar el comportamiento ovárico por el uso de la hFSHr en este tipo tan selectivo de pacientes, no se administró hCG para la inducción de la etapa final de la ovulación.

Pruebas hormonales

Las mediciones hormonales fueron hechas por radioinmunoensayo, usando, para FSH y LH, el método IRMA inmunoradiométrico de fase sólida con anticuerpos mono y policlonales (kits de reactivos Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA), estandarizado en términos del Segundo Preparado de Referencia Internacional para FSH (WHO 2nd IRP 80/552), con sensibilidad de 0,06 UI/L y LH (WHO 2nd IRP 78/549) de 0,15 UI/L. Los niveles séricos de hormonas esteroideas fueron determinados por el método del doble anticuerpo (kits de reactivos Diagnostics Biochem Canadá, Ontario) para estradiol (CAN-E-406), con sensibilidad de 18,36 pmol/L, testosterona (CAN-T-200) 0,35 nmol/L y androstenediona (CAN-AD-206) 0,17 nmol/L.

Análisis de datos

La comparación de las concentraciones hormonales iniciales y máximas y el intervalo hasta el aumento máximo de estradiol (E₂) fueron realizados por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

Se presenta los datos como promedio ± DS (1 desviación estándar) o promedio y rango. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas si P < 0,05.



RESULTADOS

Las concentraciones séricas de FSH, con valores basales $M \pm DS$ (rango) de $0,48 \pm 0,35$ (0,09-1,22) UI/L, aumentaron con la dosis de hFSHr administrada, hasta alcanzar valores máximos de $10,28 \pm 1,77$ (7,9-13,6) UI/L, significativamente diferentes ($P < 0,001$) (Tabla 3). Se interrumpió la administración de hFSHr luego de observarse por ultrasonografía por lo menos un folículo mayor de 14 mm. Las concentraciones séricas iniciales de estradiol de $29,8 \pm 6,2$ (19,0-40,2) pmol/L mostraron un aumento gradual, hasta llegar a un valor máximo de $131,7 \pm 57,6$ (51-239) pmol/L.

Por cada dosis de hFSHr aplicada, en 3 a 5 días se alcanzó concentraciones séricas estables de FSH. En la primera semana (Tabla 4), luego de recibir cuatro inyecciones de 75 UI, las concentraciones séricas de FSH aumentaron a $4,19 \pm 1,37$ UI/L. En el día 11, con 150 UI, subieron a $6,67 \pm 1,45$ UI/L, variando en el día 17, con 225 UI, a $9,70 \pm 1,88$ UI/L. Al aplicar el protocolo establecido, se alcanzó el día 19, en el caso 7, la dosis máxima de 2700 UI de hFSHr. En cambio, se apreció que los valores de LH no se modificaron significativamente por las mayores dosis de hFSHr recibidas.

El estudio ovárico por ultrasonido reveló el crecimiento y desarrollo de buen número de folículos (> 8 mm) por estímulo de la hFSHr. En seis

Tabla 4. FSH y LH séricos inmunorreactivos en nueve mujeres gonadotropinodeficientes, después de la administración de hFSHr.

Dosis	Día	n	FSH (UI/L)	LH (UI/L)
	1	9	0,48 (0,09-1,22)	0,26 (n.d.-0,41)
• 75 UI	5	9	4,19 (2,4-6,4)	0,27 (0,16-0,49)
• 150 UI	11	9	6,67 (4,5-9,3)	0,30 (0,20-0,50)
• 225 UI	17	7	9,70 (7,9-13,6)	0,31 (0,19-0,52)

En dos se discontinuó por crecimiento folicular mayor de 14 mm los días 15 y 16

casos se observó desarrollo de folículos múltiples, que alcanzaron dimensiones preovulatorias (≥ 15 mm), durante la tercera semana de tratamiento. Inclusive en el caso 1, se detectó el desarrollo de más de cinco folículos grandes. El índice de desarrollo folicular, en estas mujeres, fue de $1,92 \pm 0,7$ mm/día.

En la Tabla 5, se observa que las concentraciones séricas máximas de LH ($0,33 \pm 0,08$ UI/L) fueron prácticamente comparables con los valores de inicio ($0,26 \pm 0,08$ UI/L, con valor $P = 0,13$). Las concentraciones de androstenediona y testosterona tendieron a ser mayores en los dos primeros casos (DAGn y SK), en comparación con el grupo restante; pero no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,78$) entre las concentraciones iniciales ($1,9 \pm 2,1$ nmol/L) y máximas ($2,19 \pm 1,8$ nmol/L) de androstenediona. Para la testosterona, tampoco se halló diferencias ($P = 0,6$) entre los niveles iniciales ($0,56 \pm 0,2$ nmol/L) y máximos ($0,6 \pm 0,1$ nmol/L).

En la Figura 1, se aprecia los incrementos en las concentraciones de FSH obtenidos en los nueve casos, luego de recibir dosis crecientes de la gonadotropina recombinante. Al aumentar la dosis de hFSHr de 150 a 225 UI, se alcanzó niveles máximos en 17 días, como promedio (rango: 15 a 19 días). Después, los valores de FSH disminuyeron hasta los niveles iniciales, luego de 10 a 13 días de la suspensión del tratamiento.

Se comprobó que después de la administración múltiple de hFSHr, hasta la dosis total máxima, la droga fue bien tolerada y no se presentaron reacciones adversas serias relacionadas.

Tabla 3. Concentraciones de FSH, producción de estradiol y desarrollo folicular en respuesta a la administración de hFSHr en las nueve pacientes hipogonadotróficas

Caso	FSH (UI/L)		Estradiol (pmol/L)		Cantidad de folículos ^c (mm) (mm)(mm)		
	Inicial ^a	Máximo ^b	Inicial	Máximo			
• 1	1,22	13,6	26,3	148	0	5	6
• 2	0,28	7,9	19,0	79	1	3	2
• 3	0,13	8,5	27,0	51	0	1	0
• 4	0,45	9,3	39,0	113	1	4	1
• 5	0,53	10,3	29,0	140	3	5	2
• 6	0,80	11,2	31,2	212	7	3	3
• 7	0,19	9,6	30,5	108	1	2	0
• 8	0,62	12,7	40,2	239	2	5	3
• 9	0,09	9,4	26,0	95	1	0	0

a Inicial = Concentración sérica antes de administrar hFSHr
 b Máximo = Concentración sérica máxima durante el estudio
 c Medido por ultrasonografía

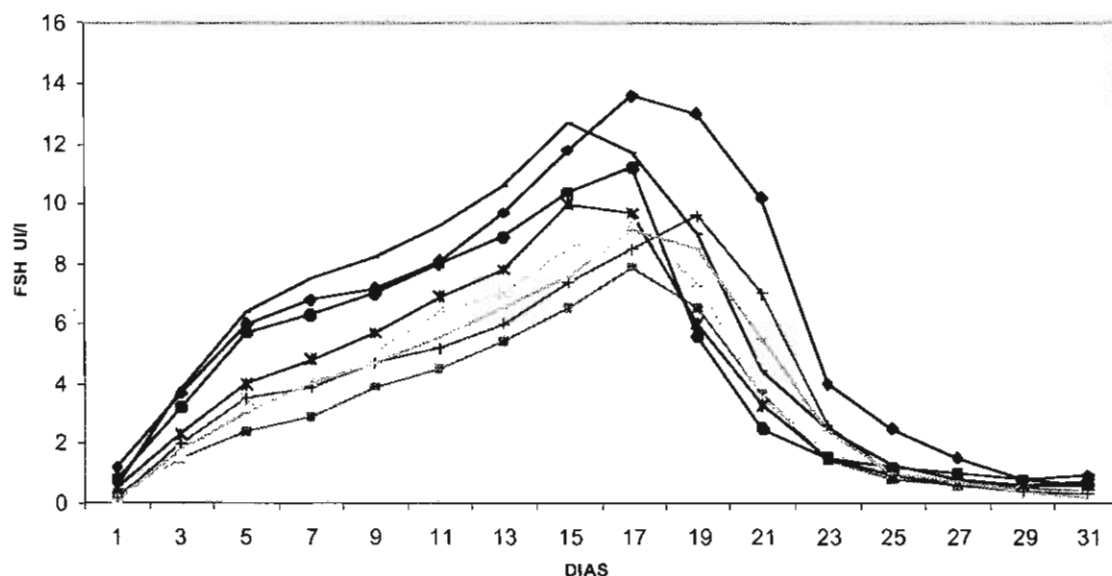


Figura 1. concentraciones de FSH, en los nueve casos, durante la administración de hFSHr en dosis crecientes: 75 UI (semana 1), 150 UI (semana 2) y 225 UI (semana 3).

DISCUSIÓN

El estudio realizado permitió evaluar las respuestas obtenidas luego de la administración de dosis múltiple de hFSHr alfa, en nueve mujeres con hipogonadismo hipogonadotrófico, ya sea por disminución selectiva en la biosíntesis de gonadotropinas (DAGn y SK) o por hipofisectomía previa. La ausencia de LH endógena y el uso de una gonadotropina sintética, al parecer, sin actividad de LH, ofrece la oportunidad de estudiar en modelo clínico los efectos individuales de la FSH sobre la esteroidogénesis ovárica y el desarrollo folicular.

El presente trabajo demuestra que las concentraciones séricas de FSH aumentan paulatinamente luego de las inyecciones intramusculares seriadas y crecientes de hFSHr, hasta el día 17, como promedio, indicando que la velocidad de absorción de la hormona desde el sitio de inyección es buena y supera la velocidad de su redistribución a compartimentos extravasculares, captación gonadal, metabolismo y excreción.

La administración diaria de hFSHr con aumentos semanales (de una a tres ampollas) reveló que las concentraciones séricas parecieran estabilizarse en menos de cinco días, coincidiendo con la vida media calculada de 44 ± 14 h cuando se dio una sola dosis de hFSHr y similar con lo informado para la FSH natural⁷.

Tabla 5. Cambios en los niveles de LH y respuesta androgénica máxima por la administración de la hFSHr en las nueve pacientes hipogonadotróficas

Caso	LH (UI/L)		Androstenediona (nmol/L)		Testosterona (nmol/L)	
	Inicial ^a	Máximo ^b	Inicial	Máximo	Inicial	Máximo
• 1	0,30	0,37	3,19	3,06	0,49	0,62
• 2	< 0,15	0,19	7,50	6,82	0,97	0,74
• 3	0,28	0,34	1,24	1,79	0,40	0,52
• 4	0,22	0,28	1,16	1,94	0,53	0,69
• 5	0,29	0,35	0,36	0,45	0,38	0,47
• 6	0,41	0,52	1,40	2,29	0,67	0,58
• 7	0,21	0,29	0,90	1,25	0,55	0,61
• 8	0,32	0,38	0,81	1,10	0,59	0,70
• 9	0,17	0,21	0,50	0,97	0,48	0,45

a Inicial = Concentración sérica antes de administrar hFSHr

b Máximo = Concentración sérica máxima durante el estudio



Por los hallazgos obtenidos (Tabla 5), se comprueba que la hFSHr carece de actividad de LH intrínseca. Junto a concentraciones séricas de LH prácticamente estables, los niveles séricos de androstenediona y testosterona no mostraron aumentos significativos; en tanto que, las concentraciones séricas máximas de FSH (promedio 10,3 UI/L) alcanzaron el mismo orden de magnitud de los niveles perimenstruales comunicados en ciclos espontáneos⁸. En contraposición, el estradiol sérico sólo presentó un leve aumento (promedio 131,7 pmol/L). Esta deficiencia en la biosíntesis hormonal, por parte de las células de la capa granulosa, podría conjugar con una escasa disponibilidad de sustrato androgénico, fundamental para la aromatización y síntesis ulterior del estrógeno.

Tratando de analizar la importancia potencial del sustrato androgénico, al tomar en cuenta los dos primeros casos, con función suprarrenal conservada, a pesar que los valores de androstenediona y testosterona fueron mayores al comparar con el resto de casos sometidos a hipofisectomía, y por tanto con función suprarrenal ausente, sin embargo, no fue posible, en esta situación, detectar diferencias con respecto a las respuestas máximas de estradiol obtenidas por el uso de hFSHr. Tampoco se halló correlación entre las concentraciones de androstenediona y estradiol.

Otros estudios realizados en mujeres hipogonadotróficas⁹ demostraron que la hFSHr fue capaz de producir un aumento de la inhibina inmunoreactiva, similar al de mujeres normales, pero con discreta elevación del estradiol. La inhibina producida por las células granulosas se considera como indicador de un trabajo funcional celular normal¹⁰ y, actuando como regulador paracrina, estimularía la producción de andrógenos tecales¹¹ proporcionando así algo de sustrato para la síntesis del estradiol. Se daría un mecanismo similar con el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), potente estimulador de la síntesis androgénica tecal¹². En nuestra serie estudiada, mas bien se demostró que, a pesar de actuar ambos mecanismos, las concentraciones séricas circulantes de LH endógena extremadamente bajas cursaron con secreción androgénica deficitaria y sin elevaciones importantes del estrógeno. Es-

tos resultados indican la necesidad de la LH para inducir una esteroidogénesis apropiada.

Por otro lado, en seis de nuestros casos se pudo apreciar el amplio desarrollo folicular, por lo menos de un folículo grande y un buen número de folículos de tamaño mediano, por acción de la hFSHr administrada. Estos hallazgos permiten comprobar que, a pesar del menor aumento estrogénico, los folículos ováricos se desarrollaron normalmente hasta la etapa preovulatoria y con capacidad, por parte de los ovocitos, para ser fecundados. Estas observaciones confirman la presunción de que altas concentraciones intrafoliculares de estradiol no son condición sine qua non para favorecer la maduración folicular; dicho de otro modo, el estradiol no actúa como regulador local del crecimiento y desarrollo folicular, poniendo en duda la presencia de receptores de estradiol dentro del folículo humano, mientras que los receptores androgénicos sí han sido claramente demostrados por histoquímica¹³. A mayor información, se ha informado fecundación y embarazos con el uso de hFSHr combinada con agonistas de GnRH en la reproducción asistida¹⁴ y luego de la inducción de la ovulación en el ovario poliquístico¹⁵.

La información obtenida proporciona evidencias claras a favor de la teoría de 2 células-2 gonadotropinas para la esteroidogénesis folicular y avala aún más el concepto de que el desarrollo folicular normal depende predominantemente de la FSH; en tanto que, la esteroidogénesis se mantiene por acción sinérgica de LH y FSH.

Agradecimiento: Al Instituto Ares-Serono de Ginebra por su colaboración

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lunenfeld B. Treatment of anovulation by human gonadotrophins. *J Internat Federat Gynaecol Obstet* 1963; 1: 153-67.
2. Rodríguez GW. La inducción de ovulación con gonadotropinas. *Simposium IV Jornadas Peruanas de Endocrinología, Trujillo, 1971.*
3. Healy DL, Trounson AO, Andersen AN. Female infertility: causes and treatment. *Lancet* 1994; 343: 1539-44.
4. Daya S, Gunby J, Hughes FC, Collins JA, Sagle MA. Follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1995; 64:347-54.
5. Van Wezenbeek P, Draaijer I, van Meel E, Olijve W. Recombinant follicle-stimulating hormone I. Construction, selection and characterization of a cell line. En: Crommelin DJA, Schellekens H (Eds). *From Clone to Clinic Developments in Biotherapy*. Vol. 1. Dordrecht Germany: Kluwer Academic Publisher. 1990: 245-51.



6. Hard K, Mekking A, Damm JBL, Kamerling JP, de Boer W, et al. 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* 1990; 193: 263-71.
7. Mannaerts B, Shoham Z, Schoot DC, Bouchard P, Harlin J, Fauser B, et al. Single-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human follicle-stimulating hormone (Org. 32489) in gonadotropin-deficient volunteers. *Fertil Steril* 1993; 59: 108-14.
8. Fauser BCJM, Pache TD, Schoot DC. Dynamics of human follicle development. En: Hsueh AJW, Schomberg DW (Eds). *Ovarian Cells Interaction: Genes to Physiology*. Serono International Simposia Series. New York: Springer Verlag. 1993: 134-47.
9. Schoot DC, Harlin J, Shoham Z, Mannaerts B, Lahlou N, et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone and ovarian response in gonadotrophin-deficient woman. *Hum Reprod* 1994; 9:1238-42.
10. McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM. Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 954-61.
11. Illier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 75: R1 - R6.
12. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog C, Hillensjö T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin like growth factor I and insulin. *Fertil Steril* 1993; 59: 323-31.
13. Straus JF. Does estradiol act as a local regulator of follicular growth and development? En: *The Role and Uses of follicle-stimulating hormone in Induction of Ovulation*. Geneva: Ares Serono. 1992: 11-21.
14. Devroey P, Mannaerts B, Smits J, Coelingh Bennink H, van Steirteghem A. Clinical outcome of a pilot efficacy study on recombinant human FSH (Org 324899) combined with various GnRH agonist regimens. *Human Reprod* 1994; 9: 1064-9.
15. Dessel van HJHM, Dondenwinkel PFJ, Coelingh Bennink HJT, Fauser BCJM. First established pregnancy and birth after induction of ovulation with recombinant human follicle-stimulating hormone in polycystic ovary syndrome. *Human Reprod* 1993; 9: 55-6.