

24
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"



CARACTERIZACION DE LAS DIFERENTES ESPECIES
MOLECULARES DE LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE DURANTE EL PERIODO DE
MADURACION SEXUAL DE LA
RATA MACHO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE DE JESUS MEJIA SAAVEDRA

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	6
HIPOTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFIA.....	33

RESUMEN

La glándula hipófisis anterior se obtuvo de ratas macho de 5, 10, 15, 18, 21, 30, 40, 45, 50, y 90 días de edad. Las diferentes especies moleculares de la hormona estimulante del folículo (FSH) presentes en esa glándula fueron separadas por cromatografía de afinidad con Concanavalina-A (Con-A) e isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (IEF-GPA; rango de pH de 3.5 a 9.5). A través de Con-A se separaron dos formas de FSH (FSH-libre y FSH-unidad), las cuales fueron identificadas por radioinmunoanálisis (RIA). La forma FSH-unida siempre se presentó en mayor cantidad que la forma FSH-libre, la relación (FSH-libre/FSH-unida) que guardaron éstas especies no presentó diferencias significativas en las diferentes edades estudiadas.

Cuando los extractos hipofisiarios fueron sometidos a IEF-GPA, el contenido de FSH presente en cada uno de los eluidos de gel fué determinado por RIA así como por radioreceptor (RR). Todas las muestras estudiadas presentaron varios picos de FSH inactivo dentro del rango de pH de 3.0 a 7.0, el pico mayor enfocó en el rango de pH de 4.0 a 4.9. Para determinar diferencias cuantitativas en el patrón de corrimiento de la FSH hipofisiaria, el perfil de IEF-GPA se dividió en 7 áreas: área 1=punto isoeléctrico (pI) de 7.0 a 6.3; área 2=pI de 6.2 a 5.5; área 3=pI de 5.4 a 5.0; área 4=pI de 4.9 a 4.5; área 5=pI de 4.4 a 4.0; área 6=pI de 3.9 a 3.5; área 7=pI < 3.5. La FSH enfocada en el área 4, representó del 25 al 55% del total en ratas de 5 a 30 días de edad, mientras que en animales mayores comprendió del 17 al 27% del total. De manera inversa, en el área 5 enfocó la mayor proporción de FSH en animales de 40 a 90 días de edad comparada con el área 5 de animales de 30 días y menores. En el área 3 de geles correspondientes a animales de 5 a 30 días, enfocó el 14 al 21% del total

de FSH, mientras que en geles de animales mayores solo se enfocó del 6 al 9% del total. Los cambios observados, en el porcentaje de la FSH enfocada en las diferentes áreas de PI, coincidieron con la aparición de espermatogénesis a los 45 días de edad.

Aunque la relación RR/RIA decreció a medida que el PI de la FSH disminuyó (área 1 = 5.17 ± 0.95 ; área 2 = 2.20 ± 0.29 ; área 3 = 0.84 ± 0.24 ; área 4 = 0.60 ± 0.22 ; área 5 = 0.65 ± 0.22), la FSH enfocada en la región más ácida del gel (áreas 6 y 7) mostró un inusitado incremento en esa relación (> 6.0).

Nuestros resultados demostraron que la FSH presente en la hipófisis anterior de ratas macho se encuentra en múltiples formas moleculares, y que la transición de un estado de inmadurez sexual a un estado adulto involucra cambios en las propiedades fisicoquímicas de ésta hormona.

INTRODUCCION

El control hormonal de la función gonadal y reproductiva en roedores y otras especies de mamíferos es predominantemente regulada por dos hormonas gonadotróficas, sintetizadas y secretadas por la hipófisis anterior (11): la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas son denominadas gonadotrofinas y ejercen diversos efectos sobre las gónadas, regulando y manteniendo procesos reproductivos tales como gametogénesis, esteroidogénesis y ovulación (11). En general, la FSH es responsable de la regulación de procesos relacionados con el desarrollo de las células germinales tanto en el testículo como en el ovario, mientras que la LH actúa sobre la producción de esteroides en ambas gónadas. Ambas gonadotrofinas llegan a las gónadas a través del torrente sanguíneo y son reconocidas por receptores específicos localizados en las células de Sertoli dentro del túbulo seminífero de los testículos y en las células de la granulosa del ovario, en el caso de FSH, mientras que para LH se encuentran en las células de Leydig del testículo y en las células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico (24,30).

Al parecer ambas gonadotrofinas son sintetizadas por un mismo tipo de célula, el gonadotropo de la hipófisis anterior(11, 30), y el control de su síntesis y secreción es regulado por la compleja interacción entre hormonas sexuales y otros productos de secreción tubular y folicular ("inhibina"), el sistema nervioso central y la unidad hipotálamo hipofisiaria (2,11) (Fig.No.1).

Recientemente la FSH ha sido objeto de varios estudios, que no se han limitado a la caracterización de su estructura(22,30), mecanismos de acción (32), regulación de su síntesis y secreción (5,11), y efectos biológicos (18), sino también al de su

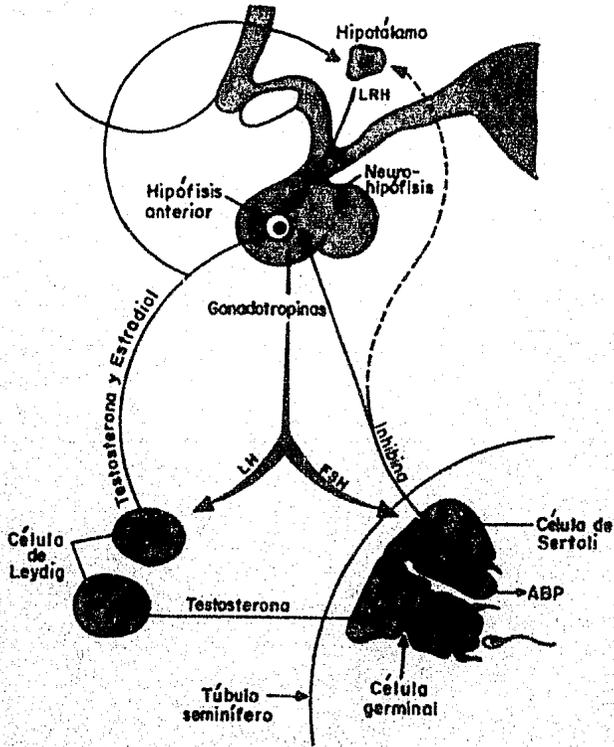


Fig.1 Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gonada(testículo).

polimorfismo (12,13,15,21).

La FSH es una glucoproteína con peso molecular aproximado de 30,000 daltens, compuesta por dos cadenas de polipéptidos glucosiladas (11), denominadas alfa y beta, unidas por enlaces no covalentes (33). La estructura de la cadena alfa es común en las tres hormonas glucoproteicas producidas por la hipófisis anterior, LH, FSH, y TSH (11), así como en la gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por la placenta. Esta subunidad presenta una secuencia de 89 a 92 aminoácidos (30) y contiene dos porciones de carbohidratos unidos a residuos de asparagina (11,30). La subunidad beta tiene una secuencia de 118 aminoácidos (11); ésta es diferente en cada una de las hormonas mencionadas y les confiere a cada una de ellas especificidad biológica (5). Presenta, al igual que la subunidad alfa dos cadenas de carbohidratos unidos a residuos de asparagina. Los carbohidratos que forman estas cadenas son manosa, N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa, y ácido siálico. Estos carbohidratos le confieren a la molécula de FSH propiedades fisicoquímicas y fisiológicas que a última instancia constituyen la base de su polimorfismo (44). El ácido siálico, por ejemplo, juega un papel importante en la actividad biológica de la FSH (9,11), afectando su tiempo de vida media en plasma (a mayor cantidad de residuos de ácido siálico en la molécula, mayor tiempo de circulación y por lo tanto mayor actividad biológica in vivo(28)). Por otro lado, variaciones en el contenido de ácido siálico en la molécula de FSH pueden conferirle un mayor tiempo de vida media con un incremento en su capacidad de unión(42,43,44).

ANTECEDENTES

En los últimos años se ha demostrado que las gonadotropinas existen en múltiples formas moleculares que difieren entre sí en sus propiedades fisicoquímicas (12,13,15,21,28,36,42), inmunológicas y biológicas (36,46). Ha sido posible aislar y parcialmente caracterizar diversas especies o formas moleculares de las gonadotropinas a partir de hipófisis anterior (12,13,15,42), orina y suero (13,36), de diversas especies de mamíferos, incluyendo a primates no humanos y humanos (14,36,46). Esta multiplicidad ha sido demostrada a través de técnicas de fraccionamiento tales como filtración en gel (6,28,31), cromatografía de afinidad (13,15,42), e isoelectroenfoque (12,15). El fenómeno del polimorfismo se encuentra regulado por los productos de secreción endógena de las gónadas (10,15,27,42). Por ejemplo, la FSH hipofisiaria de monos Rhesus (Rh) hembras castradas, posee mayor cantidad de residuos de ácido siálico, desaparece más tardíamente de la circulación y manifiesta mayor actividad biológica in vivo - que la FSH de animales intactos (28). Así mismo, se ha encontrado que la FSH de monos Rh machos intactos difiere de su homóloga en la hembra intacta en su patrón de elución en cromatografía por exclusión (volumen de elución mayor) como en su menor vida media en plasma (27), indicando la existencia de heterogeneidad determinada por el sexo. La FSH de rata se comporta de forma diametralmente opuesta a la FSH del mono Rh (10). La FSH hipofisiaria procedente de ratas macho intactos presenta un volumen de elución menor que la procedente de animales machos castrados y hembras intactas; de igual forma la FSH de ratas macho castrados tratados con andrógenos tiene mayor vida media plasmática que la de los animales castrados no tratados (10).

La cromatografía por afinidad es una de las técnicas que se han utilizado recientemente en el estudio de la heteroge-

ncidad de la FSH en ratas. Empleando Concanavalina A unida a sefarosa (Con-A; la Con-A es una protefna vegetal que posee la propiedad de unir especificamente residuos de carbohidratos) se han encontrado dos especies de FSH (13,45). Una de ellas no se une a la Con-A (FSH-libre) en tanto que la segunda (FSH-unida) se adhiere a la Con-A y es eluida con una solución de glucopiranos(13). Estudios similares en hipófisis anterior de hamsters machos intactos y castrados han revelado la presencia de las dos formas de FSH encontradas en las ratas hembra (42).

Al utilizar la técnica de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (IEF-GPA; está técnica separa las diferentes especies de la FSH en función de su punto isoeléctrico, pI) (12,42), en la separación de las diferentes especies moleculares de la FSH, se han encontrado seis especies con los siguientes pI's: 6.0 a 5.9, 5.7,5.4 a 5.3, 5.1 a 5.0, 4.7,4.2 a 3.8 (12,15,42), tanto en hamsters como en ratas hembras. La proporción relativa de cada una de las seis formas varía dependiendo del estado endócrino del animal al momento de recolección de la muestra: 1) en el hamster hembra castrado y tratado con estrógenos, la forma más ácida (pI de 4.2 a 3.8) no aparece sino hasta después de 28 horas post-inyección(15), 2) en el macho, la proporción relativa de la forma con pI de 4.7 es mayor en el animal castrado que en el intacto y no existe como tal en el animal inmaduro de 28 días de edad(42), 3) en los machos intactos las isohormonas con pI de 6.0,5.7, y 5.3, se encuentran en proporciones relativamente mayores que en el animal castrado (42).

Los estudios sobre la heterogeneidad de la FSH hipofisaria en roedores machos son escasos. Como ya se mencionó, existen diferencias entre los perfiles de IEF de la FSH de hamsters machos intactos, castrados e inmaduros (28 días de edad). Recientemente Foulds y Robertson (20) encontraron diferencias

en la distribución de cargas de la FSH hipofisiaria de ratas machos y hembras, proporcionando así evidencia adicional de que el tipo de gonadotropina producida por la hipófisis anterior está bajo control endócrino (12,41).

En el presente estudio se intentó caracterizar el patrón de elución en cromatografía de afinidad con Con-A así como el perfil de distribución por IEF-GPA de la FSH presente en la hipófisis anterior de ratas macho durante el período de maduración sexual de éstas.

HIPOTESIS

La biosíntesis y secreción de cada una de las especies moleculares de la FSH dependen del estado endócrino (gonadal) del animal presente al momento de su estudio (28,42); ya que la maduración sexual es el resultado de cambios complejos en el ambiente endócrino, la presencia y proporción de cada forma molecular de FSH variarán de acuerdo al estadio de maduración específico.

OBJETIVOS

GENERAL:

Caracterizar las diferentes especies moleculares de la FSH presente en la hipófisis anterior de ratas macho a las edades de 5, 10, 15, 18, 21, 30, 40, 45, 50, y 90 días, en base al contenido y/o conformación de carbohidratos en la molécula y de su punto isoeléctrico.

PARTICULARES:

1) Separación de las diferentes especies moleculares de la FSH por medio de cromatografía de afinidad utilizando Concava valina-A (Con-A).

2) Separación de las diferentes especies moleculares de la FSH por medio de isoelectroenfoque (IEF) en geles de poliacrilamida.

3) Cuantificación de la FSH total presente en suero y en la hipófisis anterior, así como de cada una de sus especies separadas por Con-A e IEF, por medio de radioinmunoanálisis.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas macho intactas de la cepa C-II-Z-V(E. N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M.), de 5, 10, 15, 18, 21, 30, 40, 45, 50, y 90 días de edad, sometidas a un horario de 14 horas de luz y 10 horas de obscuridad (luces encendidas de las 5 A.M. a las 7 P.M.), con libre acceso al agua y alimento.

Cada animal fué sacrificado por medio de decapitación, ob^uteniéndose inmediatamente la hipófisis anterior y la sangre proveniente del tronco. La hipófisis se homogenizó en sol^ución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, 0.05 M; pH 7.0) a la cual se le adicionó previamente un agente antiproteolítico (fenil-metil-sulfonil-fluoruro; Sigma Chemical Co.E.U.A.), a la concentración de 30 mg/100 ml de PBS. El volúmen uti^lizado fué de 100 μ l por hipófisis. La homogenización se llevó a cabo con 10 golpes de un pistilo de teflón en un tubo de vidrio. Los homogenados se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min. a la temperatura de 4°C, y el sobrenadante (extracto de hipófisis) se almacenó a -20°C hasta el día de su procesa^miento. La sangre de cada rata, se dejó coagular durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. a 4°C el sobrenadante (sucro) se al^lmacenó a -20°C hasta el día en que se utilizó. En el caso de las ratas de 5 y 10 días, la sangre procedente de cada 3 animales fué incluida en una sola muestra, siguiéndose poste^riormente el procedimiento mencionado.

Adicionalmente, los testículos de cada animal fueron fija^dos en líquido de Bouin y posteriormente incluidos en parafina. En éstos se realizaron cortes seriados de 10 μ m, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina. A veinte túbulos seminíferos escogidos al azar, se les determinó el área de superficie como se describió previamente(34). En los mismos

rúbulos se cuantificó el contenido de espermatoцитos, espermátides y espermatozoides.

CROMATOGRAFIA EN CONCAVALINA-A (Con-A)

Con el fin de separar las especies de FSH de acuerdo al contenido o conformación particular de carbohidratos en la molécula (manosa y glucosa), los extractos de hipófisis anterior de cada grupo de edades se sometió a cromatografía de afinidad en Con-A unida a microesferas de sefarosa (Pharmacia Fine Chemicals, Piscatway, NJ, E.U.A.; 0.7 x 1.5 cm). La cromatografía se llevó a cabo a 4°C, colectándose 30 fracciones de 1.0 ml cada una. Las primeras 10 fracciones se eluyeron con PBS 0.05 M, pH 7.0, conteniendo cloruro de calcio y cloruro de magnesio a una concentración de 1.0 mM. Las 20 fracciones restantes fueron eluidas con glucopiranososa - 100 mM agregada a la solución anterior. El contenido de FSH presente en cada una de las fracciones fué medido por radioinmunoanálisis (utilizándose de 15 a 200 µl por fracción). La FSH que apareció en las fracciones 1 a 10 fué considerada como FSH-libre, mientras que la FSH presente en las fracciones 11 a 30 se le consideró como FSH-unida. La recuperación de FSH por este método fué del 65 al 85%.

ISOELECTROENFOQUE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

(IEF-GPA)

La separación por IEF se basa en el principio de que cada proteína tiene una carga neta que varía de acuerdo al pH del medio ambiente en que se encuentra. Esta carga neta representa la suma de cargas positivas y negativas en la superficie de la molécula de la proteína. Cuando se pasa de un valor de pH muy bajo a uno muy alto, la carga neta cambia

de manera continua, de positiva a negativa; a cierto valor de pH bien definido, la carga neta se hace igual a cero. Este punto es denominado punto isoeléctrico (pI) de la proteína.

Cada uno de los extractos de hipófisis se electroenfocó, - por duplicado (40 μ l), en geles de poliacrilamida (LKB Instrumens, Inc. Bethesda MD, E.U.A.; rango de pH de 3.5 a 9.5). La muestra se colocó hacia el cátodo. Anterior a ésto se colocaron los electrodos sobre la superficie del gel; para el ánodo se utilizó una solución de ácido fosfórico 1 M, y para el cátodo la solución de hidróxido de sodio 1M. Las condiciones eléctricas bajo las cuales se llevó a cabo cada separación fueron: potencia 12 W, voltaje 1500 V, y corriente 50 mA, a temperatura constante de 4°C. La separación tuvo una duración de 90 min., al término de los cuales se determinó el gradiente de pH. Cada línea de muestra fué recortada en 41 fracciones de 2 mm, éstas se incubaron en 400 μ l de PBS con 0.1% de gelatina durante 18 horas a 4°C. Pasado este tiempo se congelaron a -20°C hasta el día en que se sometieron a radioinmunoanálisis y radioreceptor. La recuperación que se tuvo por éste método fué de 75 al 90%.

YODACION DE LA FSH

La yodación es una técnica mediante la cual se marca radiactivamente a una molécula (FSH). Consiste en sustituir uno o mas átomos de hidrógeno por átomos de yodo 125 (¹²⁵I) en los residuos de tirosina que contiene la hormona (40). Para conseguir dicho objetivo se empleó el método de lactoperoxidasa-glucosa-oxidasa modificado por Bex y Corbin (4). El método consiste en mezclar los siguientes reactivos en el orden en que aparecen:

- 1) 2.5 μ g de FSH de rata (NIAMDD-rFSH-I-5)

- 2) 25 μ l de PBS 0.05 M, pH 7.0
- 3) 25 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M
- 4) 10 μ l de ^{125}I (equivalente a 1 mCi)
- 5) 20 μ l de lactoperoxidasa (Sigma Chemical Co.E.U.A.)
- 6) 10 μ l de glucosa oxidasa (Sigma Chemical Co.E.U.A.)
- 7) 10 μ l de B-D(+)-Glucosa (Sigma Chemical Co.E.U.A.) 0.5% en agua destilada.
- 8) Agitación en vortex durante 25 segundos
- 9) 100 μ l de azida de sodio (0.1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M); con éste reactivo se pone fin a la reacción iniciada por la B-D(+)-Glucosa.

Terminada la reacción, se separó la hormona marcada del ^{125}I no reaccionante por medio de cromatografía por exclusión, empleando Sephadex-G-100 (Pharmacia Fine Chemicals A.D.). La mezcla, hormona marcada y yodo libre, se colocó sobre la superficie de la columna de cromatografía con pipeta Pasteur y se eluyó con PBS 0.05 M, pH 7.0, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (ASB, Sigma Chemical Co. E.U.A.), y 0.02% de azida de sodio.

Durante la cromatografía se colectaron 15 fracciones de 1.0 ml. A cada una de éstas se les determinó el contenido de radiactividad en un contador para radiaciones gamma durante 15 segundos. La hormona marcada se colectó en las fracciones 4 a 6. Posteriormente esas fracciones se mezclaron y se recromatografiaron en Con-A de acuerdo al método descrito por Dufau y col (19), para separarla de fracciones dañadas por la yodación. En ésta cromatografía se colectaron 30 fracciones de 1.0 ml, las primeras 10 fracciones se eluyeron con PBS 0.05 M, pH 7.0, conteniendo cloruro de calcio y cloruro de magnesio - en concentración de 1.0 mM. Las 20 fracciones restantes se eluyeron con glucopiranososa 100 mM en la solución anterior. La hormona dañada no es capaz de unirse a la Con-A y permanece - en el volumen de elución colectándose en las primeras 10 frac

ciones. La hormona no dañada se une a la Con-A y fué desplazada por la glucopiranososa, colectándose en las fracciones 11 a 20. De éstas fracciones, las que contenian mayor cantidad de radiactividad fueron mezcladas y guardadas en alícuotas de 100 μ l a -20°C hasta el momento del radioinmunoanálisis.

RADIOINMUNOANALISIS DE FSH

El radioinmunoanálisis (RIA), es una técnica cuantitativa con alto grado de especificidad y sensibilidad (3), que permite medir pequeñas cantidades de un compuesto determinado. Es una reacción inmunológica competitiva, en la cual dos antígenos (hormona marcada y hormona fría) compiten por un anticuerpo específico.

El RIA para FSH se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones dispuestas por los Institutos Nacionales de la Salud, E.U.A., (NIAMDD). La curva estandard se elaboró empleando la preparación de referencia de FSH de rata (NIAMDD-rFSH-RP-1), con las siguientes dosis: 4, 10, 20, 30, 40, 80, 120, 200, 400, y 800 ng por tubo en un volúmen final de 300 μ l, preparada en PBS 0.05 M, pH 7.0, conteniendo 0.1% de gelatina. En el análisis se incluyeron alícuotas de 25, 50, 100, y 200 μ l de suero de ratas hembras castradas como muestras de control de calidad. Por último, se adicionaron alícuotas por duplicado de cada muestra problema.

A cada tubo se le adicionó hormona marcada, preparada a partir de una de las alícuotas obtenidas en la yodación (descrita anteriormente). Tal alícuota se diluyó en PBS 0.05 M, pH 7.0, con 0.1% de gelatina. A cada uno de los tubos del análisis se les agregó 100 μ l de la solución de hormona marcada con un contenido de radiactividad de 21000 ± 1000 cpm. El anticuerpo (suero de conejo Anti-rFSH, NIAMDD-A-rat-FSH-S-

11) se agregó a todos los tubos diluido 1:3000, preparado en PBS 0.05 M, pH 7.0, con etilen-diamino-tetraacético (EDTA - 0.05 M) y suero normal de conejo diluido 1:300, en un volumen de 200 μ l, excepto en aquellos tubos en los que se cuantificaron las uniones no específicas (o sea toda aquella unión diferente a la unión específica FSH-antiFSH) los cuales llevaron 200 μ l de la solución de PBS + EDTA y suero normal de conejo únicamente. Al principio y al final del análisis se cuantificaron tanto la unión total, en tubos que contenían PBS + 0.1% de gelatina (300 μ l), hormona marcada y anticuerpo, como la unión no específica. Después de agregar el anticuerpo, el análisis se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación se adicionó el segundo anticuerpo, obtenido de un carnero previamente inmunizado, diluido 1:20 en PBS 0.05 M, en un volumen de 200 μ l, el análisis se incubó nuevamente 18 horas a temperatura ambiente. Finalmente, el análisis se centrifugó a 3000 rpm durante 40 min. a 4°C, y el contenido de radiactividad presente en el precipitado de cada uno de los tubos fué cuantificado en un contador Packard Auto-Gamma 500. Para evitar variaciones interanálisis, las muestras de una misma línea así como las de una misma columna se incluyeron en el mismo lote. La variación intraanálisis fué del 7% y la sensibilidad de 6 ng/tubo.

RADIORECEPTOR DE LA FSH

La cuantificación de la FSH por radioreceptor (RR), se llevó a cabo de acuerdo al método descrito previamente por Ulloa Aguirre y col (42), se utilizó un homogenado crudo de túbulo seminífero procedente de ratas machos inmaduros (28 días de edad). En la elaboración de la curva standard se utilizó la preparación de referencia rFSH-RP-1, de los Institutos Nacionales de la Salud, E.U.A., (NIAMDD), en tanto que la hormona marcada fué el standard rFSH-I-5, yodado de acuerdo al método

do ya descrito (4). El volúmen final de incubación fué de 300 μ l (174 μ l de solución amortiguadora del receptor (Tris 0.025 M, cloruro de magnesio 10 mM y ASB 0.1%) más 100 μ l de hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm) más 25 μ l del ho mogenado de túbulos seminíferos), el tiempo de incubación fué de 18 horas a 4°C, con agitación continua. La unión específica fué de 14 a 16%, y la unión no específica fué del 15% con respecto a la unión específica. La sensibilidad obtenida en el análisis fué de 8 ng/tubo. La variación intra e interanálisis fué menor del 10 y 15% respectivamente.

RADIOINMUNOANALISIS DE TESTOSTERONA

La concentración de testosterona en suero fué determinada mediante RIA después de su extracción y separación en cromatografía de celita, como ha sido descrito previamente por Abraham y col. (1). Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron menores del 8 y 10% respectivamente.

ANALISIS ESTADISTICO

Las diferencias dentro de los grupos fueron determinadas por análisis de varianza de un factor, y la prueba de comparación múltiple de Walker-Duncan; las diferencias entre grupos fueron determinadas por medio de análisis de varianza de dos factores, seguida por la prueba de Walker Duncan (35).

RESULTADOS

El contenido de FSH hipofisiaria así como las concentraciones en suero de FSH y testosterona se muestran en la Tabla No.1. En la Tabla No.2, se muestran el patrón histológico y la celularidad de los túbulos seminíferos. Como se ha informado previamente (16,29), todos estos parámetros se incrementaron con la edad.

Como se muestra en la Fig. No.2, cuando los extractos de hipófisis anterior se cromatografiaron en Con-A, se encontraron dos formas de FSH. Una de las formas no se unió a la Con-A (FSH-libre; fracciones 1 a 10), mientras que la otra (FSH-unida; fracciones 11 a 30), si unió a la Con-A y fué eluida con la solución de glucopiranososa. La relación FSH-libre/FSH-unida (0.149 ± 0.019 , $\bar{X} \pm D.E.$), que guardaron estas fracciones, no presentó variaciones significativas en los diferentes estadios de desarrollo de la rata macho.

Cuando los extractos de hipófisis anterior fueron sometidos a IEF-GPA, se obtuvieron varios picos de FSH inmunológicamente activa dentro del rango de pH de 3.0 a 7.0 (Fig.No.3). El pico mayor se enfocó en el rango de pH de 4.0 a 5.0. Para tener una visión cuantitativa más clara de los patrones de IEF obtenidos, el gradiente de pH se dividió en 7 áreas: Area 1 = pI de 6.3 a 7.0; Area 2 = pI de 6.2 a 5.5; Area 3 = pI de 5.4 a 5.0; Area 4 = pI de 4.9 a 4.5; Area 5 = pI de 4.4 a 4.0; Area 6 = pI de 3.9 a 3.5; Area 7 = pI < 3.5. La cantidad de FSH presente en cada una de ellas fué determinada por RIA (Fig.No.4), y por RIA y RR en el caso de animales de 90 días de edad (Fig.No.5). La FSH hipofisiaria presente en las áreas 1 a 5, desplazó del

anticuerpo en una forma paralela a la FSH marcada con ^{125}I ; la presencia de paralelismo en las áreas 6 y 7 no pudo ser determinada debido a su bajo contenido de FSH inmunoactiva.

Como se muestra en la Tabla No.3 y Fig.No.3, del 25 al 55% de la FSH hipofisiaria inmunológicamente activa de ratas de 5 a 30 días de edad enfocó dentro del Area 4 (pI de 4.9 a 4.5; $p < 0.05$, comparada con el Area 4 de animales de 40 a 90 días de edad), mientras que en animales de 40 días y mayores, del 40 al 61% de la FSH inmunoactiva fué enfocada en el Area 5 (pI de 4.4 a 4.0; $p < 0.05$, comparada con el Area 5 de animales de 30 días y menores). Los cambios observados en el pI de la FSH hipofisiaria se correlacionaron estrechamente con el incremento observado en el porcentaje de los túbulos seminíferos conteniendo espermátides y espermátides en maduración a los 40 y 45 días de edad respectivamente (Tabla No.2 y No. 3).

En los extractos hipofisarios de ratas de 40 y 50 días de edad, la FSH enfocada en el Area 6 (pI de 3.9 a 3.5) fué mayor que la observada en los grupos restantes ($p < 0.05$). El Area 3 (pI de 5.4 a 5.0) comprendió del 14 al 21% del total de la FSH en ratas de 5 a 30 días de edad, mientras que en animales mayores sólo se presentó del 6 al 9%.

CAPACIDAD DE UNION DE CADA ISOHORMONA A SU RECEPTOR

El contenido de FSH, en los extractos hipofisarios de ratas de 90 días de edad, fué cuantificado por RIA y RR después de su separación por IEF-GPA. Como se observa en la Fig. No. 5, la FSH presente en cada una de las áreas de pI, fué reconocida por la preparación de receptores. La capacidad de unión al receptor que presentó la FSH varió dependiendo del área analizada, observándose que disminuía hacia la región ácida del

gel. La actividad de FSH expresada por la relación RR/RIA dis
minuyó en la misma dirección (Fig.No.6). Sin embargo, la FSH
enfocada en las áreas 6 y 7, mostró un marcado incremento en
su capacidad de unión al receptor. Las áreas 4 y 5 no presen
taron diferencias significativas en su capacidad de unión al
receptor.

TABLA 1. Contenido de FSH hipofisiaria y concentraciones en suero de FSH y T ($\bar{X} \pm EE$) de ratas macho a través de la maduración sexual y después de la castración.

Edad (días)	Contenido de FSH hipofisiario ($\mu\text{g}/\text{hipófisis}$)	FSH en suero (ng/ml)	T en suero (ng/ml)	n
5	2.1 \pm 0.06 ^c	192 \pm 7 ^c	0.342 \pm 0.094 ^a	4 ^e (7) ^f
10	3.8 \pm 0.10 ^c	125 \pm 11 ^d	0.185 \pm 0.015	4 ^e (7) ^f
15	6.3 \pm 1.00	80 \pm 6	0.139 \pm 0.036 ^u	8
18	5.0 \pm 0.1	90 \pm 9 ^d	0.381 \pm 0.074 ^a	7
21	5.6 \pm 0.37 ^d	48 \pm 5 ^d	0.517 \pm 0.052 ^a	8
30	14.5 \pm 1.50 ^c	144 \pm 17 ^d	0.714 \pm 0.093 ^a	10
40	48.4 \pm 10.16 ^d	203 \pm 18 ^d	0.972 \pm 0.157	7
45	185.0 \pm 33.01 ^b	290 \pm 34	1.036 \pm 0.408	6
50	119.5 \pm 31.90	298 \pm 28 ^b	1.017 \pm 0.054	7
90	134.8 \pm 22.09 ^a	245 \pm 14 ^d	1.090 \pm 0.200 ^d	6
castradas	181.4 \pm 33.90	1475 \pm 64	0.133 \pm 0.007	9

^a p < 0.05 vs el grupo siguiente

^b p < 0.02 " " "

^c p < 0.01 " " "

^d p < 0.001 " " "

^e número de mezclas (3 muestras individuales por mezcla).

^f número de hipófisis.

TABLA 2. Patrón histológico de los túbulos seminíferos: cambios con la edad.

Edad (días)	CELULARIDAD TUBULAR(% DE TUBULOS)					Area de superficie Tubular ($\mu^2 \times 10^3$)
	Espermátides	Espermátides en maduración	Mitosis en Espermatocitos.	Espermatocitos	Espermatozoides maduros	
5	0	0	0	0	0	27.52 \pm 0.93 ^a
10	0	0	0	0	0	46.43 \pm 1.96
15	0	0	0	0	0	54.48 \pm 1.98
18	0	0	0	0	0	53.67 \pm 2.17 ^a
21	0	0	0	100	0	78.82 \pm 3.19 ^a
30	14	0	4	100	0	188.70 \pm 8.48 ^a
40	56	0	4	100	0	256.92 \pm 6.33 ^a
45	100	72	2	100	2	417.40 \pm 7.27 ^a
50	100	100	4	100	8	613.73 \pm 24.03 ^a
90	100	100	5	100	16	1055.26 \pm 53.57

^ap < 0.01 vs el grupo siguiente.

TABLA 3. Cambios en la distribución de FSH hipofisiaria de ratas macho a lo largo de un gradiente de pH, y en relación con la edad ($\bar{X} \pm EE$).

Edad (días)	A R E A D E pI						
	1 (7.0-6.2) ^g	2 (6.2-5.5)	3 (5.4-5.0)	4 (4.9-4.5)	5 (4.4-4.0)	6 (3.9-3.5)	7 (\leq 3.5)
5	14.7 \pm 2.5	16.2 \pm 2.5 ^a	13.9 \pm 4.0	25.2 \pm 4.0	18.7 \pm 5.0	5.6 \pm 1.6	5.6 \pm 0.6
10	9.3 \pm 2.5	12.1 \pm 1.2	22.9 \pm 3.0 ^b	32.6 \pm 5.0 ^c	17.4 \pm 3.7	1.1 \pm 0.2	4.7 \pm 1.8
15	4.9 \pm 1.8	11.3 \pm 0.6	14.2 \pm 2.5 ^b	45.5 \pm 6.0 ^c	21.5 \pm 2.7	1.1 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4
18	4.6 \pm 1.2	11.8 \pm 1.6	17.1 \pm 4.2 ^b	40.8 \pm 6.4 ^c	21.7 \pm 2.6	1.0 \pm 0.4	2.2 \pm 0.5
21	5.0 \pm 0.9	14.1 \pm 1.7	15.5 \pm 3.1 ^b	50.4 \pm 1.2 ^c	13.2 \pm 2.7	0.7 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3
28	4.5 \pm 1.9	9.9 \pm 0.7	15.0 \pm 3.2 ^b	55.8 \pm 3.0 ^c	13.4 \pm 3.4	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2
30	4.3 \pm 1.1	10.5 \pm 1.6	20.8 \pm 2.2 ^b	47.5 \pm 2.7 ^c	13.1 \pm 2.2	1.4 \pm 0.3	2.3 \pm 0.9
40	2.5 \pm 0.7	9.0 \pm 2.7	6.6 \pm 1.1	20.3 \pm 5.0	41.5 \pm 1.9 ^{d,e}	22.6 \pm 8.0 ^f	0.7 \pm 0.1
45	1.7 \pm 0.1	7.5 \pm 0.9	8.7 \pm 0.8	16.5 \pm 0.8	61.7 \pm 2.5 ^d	0.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
50	3.3 \pm 0.7	7.3 \pm 2.2	6.2 \pm 1.0	19.1 \pm 4.7	41.6 \pm 1.4 ^{d,e}	21.0 \pm 7.1 ^f	1.2 \pm 0.2
90	2.5 \pm 0.3	7.2 \pm 0.2	8.2 \pm 0.7	26.8 \pm 4.7	54.6 \pm 4.9 ^d	0.5 \pm 0.1	0.1 \pm 0.03
castrados	3.5 \pm 0.6	9.9 \pm 0.4	14.5 \pm 1.0 ^g	27.9 \pm 1.7	44.5 \pm 0.8 ^{d,e}	0.2 \pm 0.3	0.06 \pm 0.02

^g rango de pI

^a p < 0.05 vs 28 to 90 días

^b como grupo, p < 0.05 vs 40 a 90 días

^c como grupo p < 0.05 vs 40 a 90 días

^d como grupo p < 0.05 vs 5 a 30 días

^f p < 0.05 comparado con cada uno de los grupos restantes

^g p < 0.05 vs 90 días

^e p < 0.05 vs 45 y 90 días.

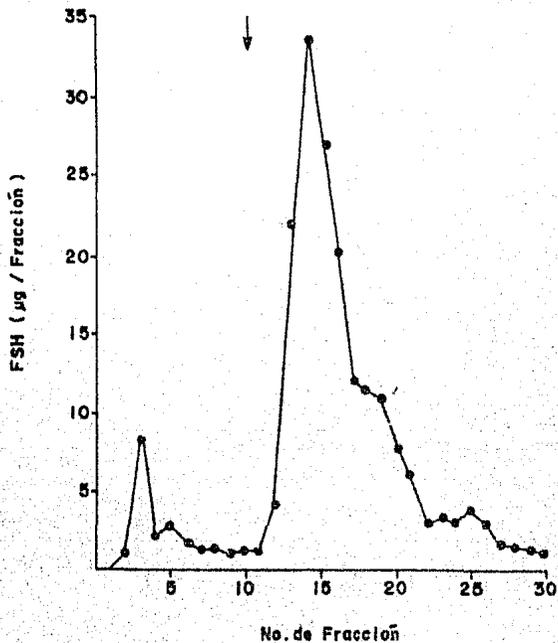


Fig.2 Patrón de elución de FSH hipofisiaria procedente de una rata macho de 45 días de edad. Las 10 primeras fracciones representa a la forma libre de FSH, en tanto las 20 restantes a la forma unida. La flecha indica la fracción en la que se inició la elución con glucopiramosa.

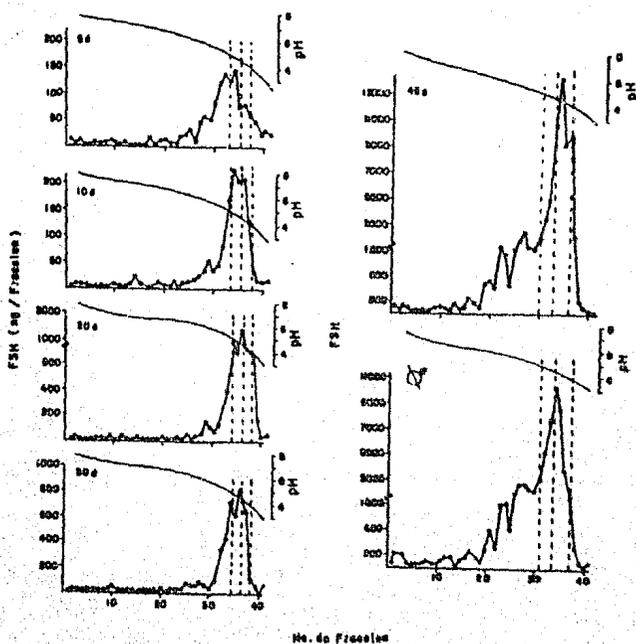


Fig.3 Muestras representativas del perfil de IEF de FSH hipofisiaria procedente de ratas machos de 5, 10, 20, 30 y 45 días de edad. Se incluye el perfil de un animal adulto (90 días) castrado. El patrón correspondiente a animales adultos (90 días) intactos se muestra en la figura 5. Las líneas discontinuas demarcan las áreas No.4 y No.5.(ver texto).

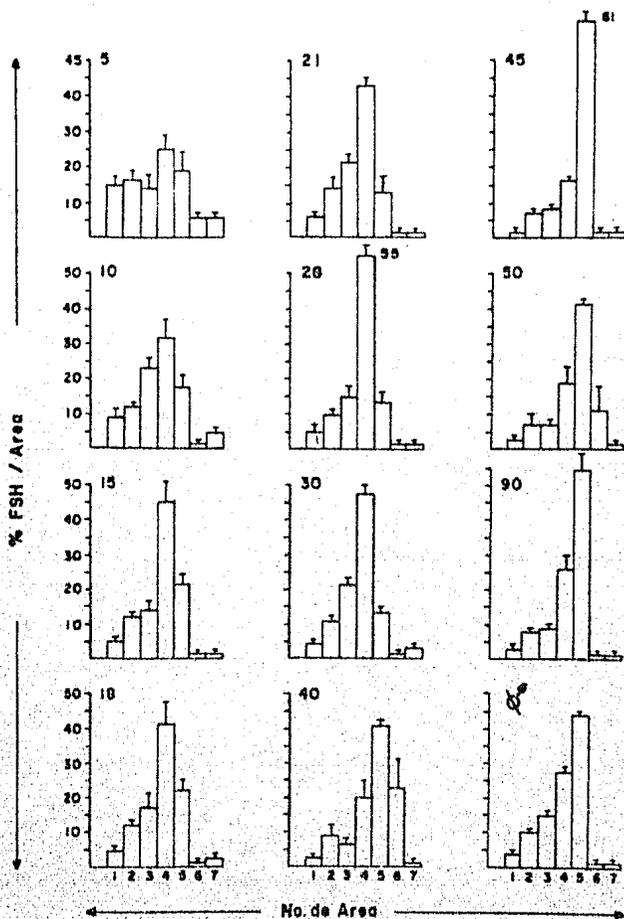


Fig. 4 Distribución relativa de FSH hipofisiaria en IEF-GPA a través de la maduración sexual de la rata macho. Los resultados son expresados en términos de porcentaje de recuperación de FSH en cada área, considerando como 100% al total de la hormona recuperado dentro del rango de pH de 7.0 - 3.0.

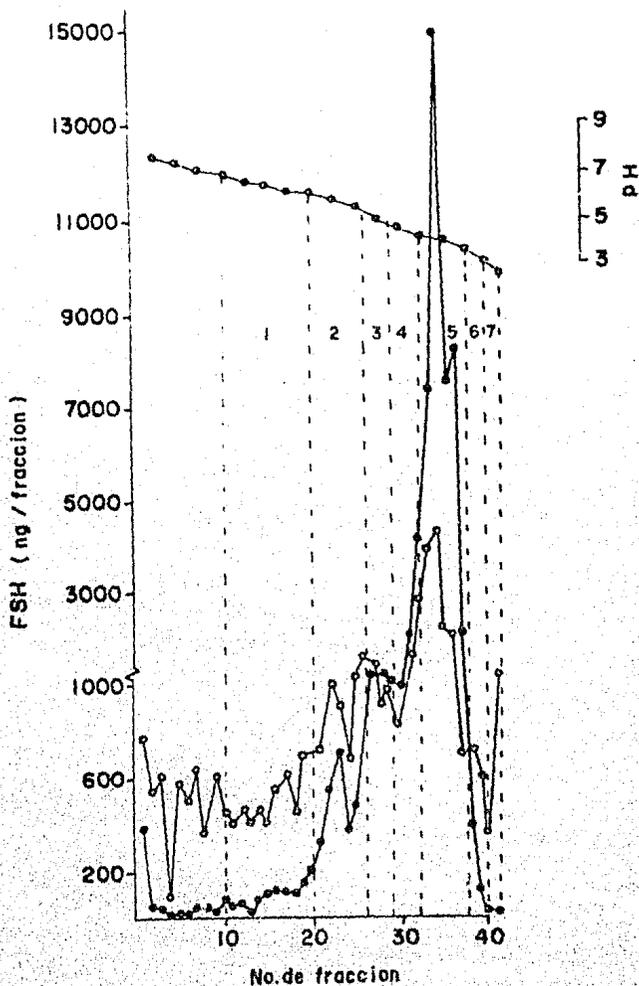


Fig.5 Patrón representativo de FSH hipofisiaria procedente de una rata macho adulta (90 días) después de IEF-GPA. Los puntos oscuros representa a la FSH inmunoactiva, en tanto que los círculos claros a la FSH identificada por radioreceptor. Los círculos superiores señalan el gradiente de pH; las líneas verticales discontinuas delimitan las áreas del gel (ver texto).

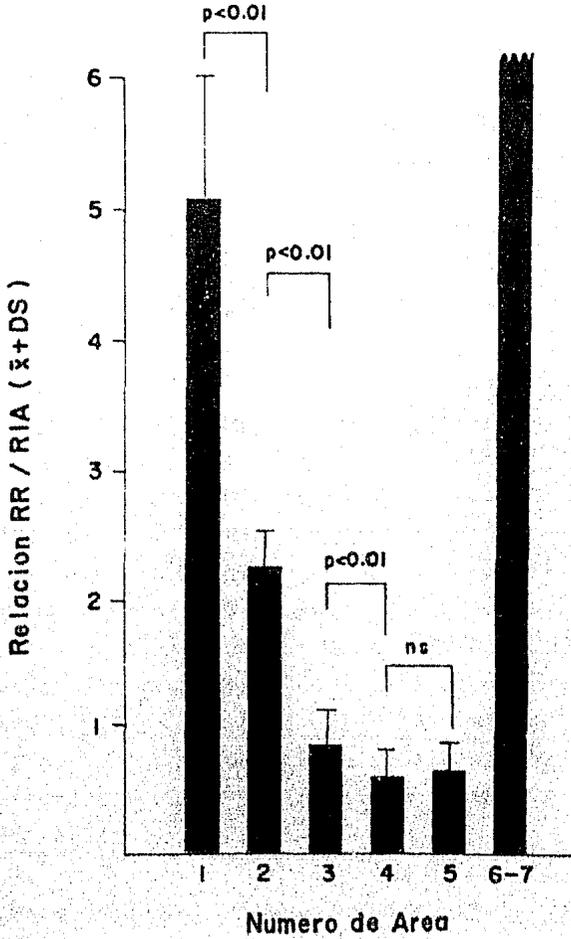


Fig.6 Relación radioreceptor/radioinmunoanálisis de la FSH hipofisiaria procedente de una rata macho adulta (90 días), de acuerdo a cada una de las áreas de pH en que fué dividido el gel (ver texto).

DISCUSION

El micropolimorfismo presentado por la FSH y por las hormonas glucoproteicas de la hipófisis anterior, es un fenómeno originado, probablemente, por variaciones en la proporción de carbohidratos incorporados en la molécula (13,28,45), por el estado endócrino que presente el organismo al momento de su estudio (10,15), o por ambos (26,37).

En estudios previos se ha demostrado que existen múltiples formas de gonadotrofinas dentro de la hipófisis anterior de varias especies animales (11,14,39). La cantidad y proporción de esas formas depende de la técnica utilizada en su separación y de las condiciones endócrinas existentes al momento de recolección de la muestra (10,26,39). La mayor parte de los estudios referentes a la heterogeneidad de la FSH en roedores y en específico en ratas macho, se han llevado a cabo sin considerar la transición de un estado de inmadurez sexual a un estado adulto. Esta observación es importante ya que la pubertad representa un estado endócrino cambiante, el cual hipotéticamente podría modificar la estructura molecular de las gonadotrofinas.

En el presente estudio utilizamos Concanavalina-A, la cual es una proteína vegetal que une específicamente residuos de carbohidratos presentes en la superficie de las glucoproteínas para separar las isohormonas de FSH presentes en la hipófisis anterior de ratas macho en diferentes estadios de desarrollo sexual. Los extractos hipofisarios presentaron dos formas moleculares de FSH, previamente encontradas en hamsters machos y hamsters hembras y ratas hembras (13,42). En las diferentes edades analizadas en el presente estudio, se observó que la forma FSH-unida fue mayor proporcionalmente que la forma FSH-libre, y la relación que presentaron éstas (FSH-li

bre /FSH-unida) no presentó variación durante el desarrollo sexual del animal. La ausencia de variación en la relación descrita podría deberse ya sea a que la conformación de carbohidratos en las formas separadas no sufre modificaciones importantes, o bien que los cambios promovidos por el medio ambiente endócrino son tan finos que no fué posible detectar los a través de esta técnica. En estudios previos se han informado cambios en la relación presentada por estas dos especies de FSH en diferentes modelos de estudio (42), y manipulando en forma exógena el ambiente endócrino (13,45) de los organismos estudiados.

Al utilizar la técnica de isoelectroenfoque, las diferentes especies de FSH fueron separadas de acuerdo al pI de cada una. Mediante esta técnica, se observó un claro desplazamiento de la FSH inmunológicamente activa presente en el pico mayor hacia la región más ácida del gel, coincidiendo con la aparición de espermatozoides maduros entre los 45 y 50 días de edad. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los informes previos de Robertson y col (37), quienes encontraron que la isohormonas de la FSH hipofisiaria de ratas macho adultas intactas y castradas enfocan predominantemente en un pI de 4.0 a 4.5. El comportamiento de la FSH hipofisiaria de ratas macho a lo largo de su maduración sexual contrasta claramente con el comportamiento presentado en las ratas hembra (12), en las que se presenta un incremento en las formas menos ácidas ($pI > 4.5$) de la FSH al tiempo de la apertura vaginal y durante el estado adulto (20,37). Estos hallazgos apoyan el concepto de que las hormonas ováricas (estrógenos) y testiculares (andrógenos) inducen efectos cualitativamente opuestos sobre la molécula de FSH sintetizada por la hipófisis anterior (9,10).

El análisis por radioreceptor reveló que la capacidad de unión de la FSH a su receptor membranal disminuyó a medida

que el pI de las formas separadas era más ácido. Considerando que el pI de la hormona disminuye a medida que su contenido de ácido siálico aumenta (43), estos hallazgos sugieren que a mayor presencia de este carbohidrato, menor su capacidad de unión al receptor. De forma sorprendente, las áreas 4 y 5 no presentaron diferencias significativas en su capacidad de unión al receptor; es posible que la isohormona del área 5 sea una molécula con mayor contenido de ácido siálico (43), mayor tiempo de vida media en plasma (7), y por lo tanto mayor actividad biológica in vivo.

Por otro lado, se encontraron diferencias en la FSH hipofisiaria de animales de 40 días y mayores, y en animales de 30 días y menores. El contenido de la forma de FSH presente en el área 3 (pI de 5.4 a 5.0) fué mayor en el segundo grupo de animales, mientras que el contenido de la forma presente en el área 6 (pI de 3.9 a 3.5) fué mayor en el primero. Aunque las isohormonas de la FSH enfocadas en esas áreas presentaron alta actividad biológica in vitro, la cantidad delectable de la forma más ácida siempre fué mínima, por lo cual su importancia fisiológica real es incierta.

Otro aspecto importante fué la inusitada capacidad de unión al receptor que mostraron las isohormonas presentes en las áreas 6 y 7, contrastando con la extremadamente baja actividad inmunológica encontrada en las mismas. En estudios recientes (8) utilizando cromatoenfoco como técnica de separación, se ha encontrado que formas de FSH hipofisiaria con pI de 3.7 y 3.4 presentan alta actividad biológica in vitro. Esta observación en concierto con las descritas anteriormente, es indicativa de la posible influencia de otros factores presentes en la molécula, además del ácido siálico, en la capacidad de unión de la FSH a su receptor, y por lo tanto en su expresión biológica in vitro.

Las bases bioquímicas de la microheterogeneidad presentada por la FSH, no han sido claramente definidas; posiblemente, la proporción de ácido siálico incorporado en la molécula de FSH es uno de los factores que contribuyen a este fenómeno (3,38). En estudios realizados con extractos hipofisarios tratados con neuraminidasa (15,43), enzima que separa residuos de ácido siálico presentes en la superficie de la molécula (11,43), se ha encontrado que el pI de la FSH se desplaza hacia el cátodo, y el micropolimorfismo presentado por la FSH disminuye e inclusive desaparece. Estos estudios apoyan la hipótesis anteriormente mencionada, de que el ácido siálico es, en gran parte, el responsable del pI presentado por la molécula de la FSH y por lo tanto de su micropolimorfismo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la maduración sexual involucra cambios en las características fisicoquímicas de la FSH hipofisaria. Probablemente varias especies de FSH con potencias biológicas particulares sean secretadas, en diferentes proporciones, por la hipófisis anterior para llevar a cabo acciones específicas sobre la maduración y función testicular en sus diferentes etapas de desarrollo. La síntesis de esas diferentes formas de FSH son probablemente el resultado de la exposición de la hipófisis anterior a factores hipotalámicos (LHRH), a hormonas gonadales (testosterona) o a ambos (12,17). Resultados obtenidos en estudios previos han demostrado que la exposición in vitro de la hipófisis anterior a esos factores modifica el tipo de FSH sintetizada por el gonadotropo (21,25). Así mismo, se ha informado que las células adenohipofisarias en cultivo, después de ser tratadas con testosterona, secretan una mayor cantidad de isohormonas ácidas de FSH (23).

Es indudable que la descripción del fenómeno del micropolimorfismo de las gonadotrofinas modificará de manera importante nuestro concepto tradicional acerca de la regulación de la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

CONCLUSIONES

- 1.- La FSH presente en la hipófisis anterior de ratas macho se encuentra en varias formas moleculares cuyo número y proporción dependen de la técnica utilizada en su separación y del estado endócrino del animal al momento de recolección de la muestra.
- 2.- La maduración sexual en la rata macho se asocia a cam
bios en las propiedades fisicoquímicas de la FSH hipofi
siaria, particularmente en su punto isoeléctrico.
- 3.- Las diversas formas moleculares de la FSH difieren entre
sí en su capacidad de unión al receptor y por lo tanto
en su potencia biológica in vitro.
- 4.- Los productos de secreción ováricos (estrógenos) y tes
ticulares (andrógenos) afectan de manera diametralmente
opuesta el punto isoeléctrico de la molécula de FSH hi
pofisiaria, y por lo tanto su actividad biológica in
vitro.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abraham G.E., Manlimos F.S., Garza R. (1977) Radioimmunoassay of steroids. In: Abraham G.E. (ed) Handbok of radioimmunoassay. Marcel Dekker Inc., New York, pp 591.
- 2.- Araki S., Toran-Allerand D., Ferin M., Vande W.R. (1975) Immunoassay reactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during maturation in the rat: ontogeny of regional hypothalamic difference. *Endocrinology* 97:696.
- 3.- Bedolla T.N., Ulloa-Aguirre A., Landeros V.J., Pérez P.J. (1984) Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. *Rev. Invest. Clin.* 36:179.
- 4.- Bex F.J., Corbin A. (1981) Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hipohysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology* 108:273.
- 5.- Beyer T.A., Rearich J.I., Paulson J.C., Pricels J.P., Sadler J.E., Hill R.L. (1979) Biosynthesis of mammalian glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 254:12531.
- 6.- Blum W., Gupta D. (1980) Age an sex-dependent nature of the polymorphic forms of rata pituitary FSH: the role of glycosilation. *Neuroendocrinol Lett.* 2:357.
- 7.- Blum W.F.P., Gupta D. (1985) Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released in vitro and metabolic clearence rates of its various forms. *J. Endocrinol.* 105:29.

- 8.- Blum W.F.P., Riegelbauer G., Gupta D. (1985) Heterogeneity of rat FSH by Chromatofocusing: studies on *in vitro* bioactivity of pituitary FSH forms and effect of neuraminidase treatment. *J. Endocrinol.* 105:17.
- 9.- Bogdanove E.M., Campbell G.T., Blair E.D., Mula M.E., Miller A.E., Grossman G.H. (1974) Gonad-pituitary feedback involves qualitative change: Androgens alter the type of FSH secreted by the rat pituitary. *Endocrinology.* 95:219.
- 10.- Bogdanove E.M., Campbell G.T., Peckham W.D. (1974) FSH pleomorphism in the rat, regulation by gonadal steroids *Endocrine Res. Commun.* 1:87.
- 11.- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C. (1983) Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev.* 4:179.
- 12.- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A., Ramaley J.A. (1983) sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction.* 28:196.
- 13.- Chappel S.C. (1981) The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by Concanavalin-A chromatography. *Endocrinology.* 109:935.
- 14.- Chappel S.C., Bethea C.L., Spies H.G. (1984) Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology.* 115:452.

- 15.- Chappel S.C., Coutifaris C., Jacobs S.J. (1982) Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology*. 110:847.
- 16.- Dalkin A.C., Bourne G.A., Pieper D.R., Regiani S., Marshall J. (1981) Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology*. 108:1658.
- 17.- Dohler K.D., Wuttke W. (1975) Changes with age in level of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinology*. 97: 898.
- 18.- Dorrington J.H., Armstrong D.T. (1979) Effects of FSH on gonadal functions. *Rec. Prog. Horm. Res.* 35:301.
- 19.- Dufau M.L., Tsukahara T., Catt K.J. (1972) Interaction of glycoprotein hormones with agarose Concanavalin-A. *Biochemica et Biophysica Acta*. 278:281.
- 20.- Foulds L.M., Robertson D.M. (1983) Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 31:117.
- 21.- Galle P.C., Ulloa-Aguirre A., Chappel S.C. (1983) Effects of Oestradiol phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *Journal of Endocrinology*. 99:31.
- 22.- Grimek H.J., McShan W.H. (1974) Isolation and Characterization of the subunits of highly purified FSH. *J. Biol.*

Chem. 249:5725.

- 23.- Kennedy J., Chappel S.C. (1985) Direct Pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno and radioreceptor assay. *Endocrinology*. 116:741.
- 24.- Ketelsleger J.M., Hetzel W.D., Sherins R.J., Catt K. J. (1978) Developmental changes in testicular gonadotropin receptor: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology*. 103:212.
- 25.- Miller C., Ulloa-Aguirre A., Hyland L., Chappel S.C. (1983) Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil Steril*. 40:242.
- 26.- Mori F. (1969) Antigenic structure of human gonadotropins: contribution of carbohydrate moiety to the antigenic structure of pituitary follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 85:330.
- 27.- Peckham W.D., Knobil E. (1976) Qualitative changes in the pituitary gonadotropins of the male Rhesus monkey following castration. *Endocrinology*. 98:1061.
- 28.- Peckham W.D., Yamaji T., Dierschke D.J., Knobil E. (1963) Gonadal function and the biological and physicochemical properties of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*. 92:1660.
- 29.- Ramaley J.A. (1979) Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biol. Reprod.* 20: 1.
- 30.- Rathnam P., Saxena B.B. (1984) Hormone receptor in growth

and reproduction. edited by B.B. Saxena et al. Raven Press N.Y. pp 21.

- 31.- Reichert L.E., Ramsey R.B. (1977) Evidence for the existence of a large molecular weight protein human pituitary tissue having follicle-stimulating hormone activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44:545.
- 32.- Reichert L.E., Bhalla V.K. (1974) Development of a radioligand tissue receptor assay for human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 94:483.
- 33.- Reichert L.E., Ward D.N. (1974) on the isolation and Characterization of the and subunits of human pituitary FSH. *Endocrinology.* 94:655.
- 34.- Revilla R. Dominguez C.R. (1984) Testicular changes in the rat by prepubertal administration of a synthetic antiandrogen. *Arch. Androl.* 13:59.
- 35.- Rimm A.A., Hartz J.A., Kalbfleisch H.J., Anderson J.A., Hoffman G.R., *Basic Biostatistics in Medicine and Epidemiology.* Appleton Century-Crofts/New York.
- 36.- Robertson D.M., Van Damme M.P., Diczfaluzy E. (1977) Biological and immunological characterization of human luteinizing hormone. I. Biological profile in pituitary and plasma samples after electrofocusing. *Moll. Cell. Endocrinol.* 9:45.
- 37.- Robertson D.M., Foulds S.M., Ellis S. (1982) Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. *Endocrinology.* 111:385.

- 38.- Sherins R.J., Vaitukaitis J.L., Chrambach A. (1973) Physical characterization of hFSH and its desialylation products by isoelectric focusing and electrophoresis in polyacrilamide gel. *Endocrinology.* 92:1135.
- 39.- Suttajit M., Reichert L., Wintzler R.J. (1971) Effect of modification of N-acetyl neuroaminic acid on the biological activity of human and ovine follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 246:3405.
- 40.- Tower B.B., Clark B.R., Rubin R.T. (1977) Preparation of ^{125}I polipeptide hormones for radioimmunoassay using glucose oxidase with LPO. *Litfe. Sci.* 21:959.
- 41.- Ulloa-Aguirre A., Coutifaris C., Chappel S.C. (1983) Multiple species of FSH present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. *Acta Endocrinologica.* 102:343
- 42.- Ulloa-Aguirre A., Chappel S.C. (1982) Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *Journal of endocrinology.* 95:257.
- 43.- Ulloa-Aguirre A., Miller C., Hyland L., Chappel S.C. (1984) Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by Neuraminidase digestion. *Biology of Reproduction.* 30:382.
- 44.- Ulloa-Aguirre A., Chappel S.C. (1982) Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary (AP) FSH: Receptor binding activity of each AP-FSH species separated by isoelectric focusing. XXII Reunion anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, Morelia, Mich.
- 45.- Ulloa-Aguirre A., Torra E., Domínguez R., Scherpbier R., Larrea F. (1985) Effects of oestradiol-17B and LRH upon

the two fractions of pituitary follicle-stimulating hormone separated by concanavalin-A chromatography. *Acta Endocrinologica*. 110:475.

- 46.- Wide L. (1981) Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:682.