

11282 3
2ej

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Postgrado e Investigación

Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

Departamento de Biología de la Reproducción

**ESTUDIOS SOBRE LA MICROHETEROGENEIDAD POR CARGA
DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO HIPOFISARIA
EN LA RATA HEMBRA ANDROGENIZADA**

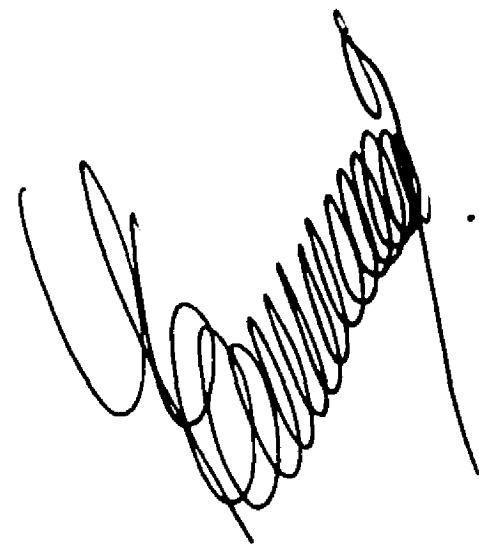
Tesis que presenta

Alfredo Antonio Ulloa y Aguirre

para obtener el grado de Doctor en Ciencias Médicas

México D.F., 1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Vo. Bo.

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

<u>Sección</u>	<u>Página</u>
Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	10
Hipótesis	10
Materiales y Métodos	11
Resultados	17
Discusión	22
Conclusiones	26
Referencias	28
Publicaciones	

RESUMEN

En el presente trabajo se separaron mediante cromatofoco (rango de pH de 7.5 a 4.0) las diferentes formas de la hormona estimulante del folículo (FSH) extraídas de hipófisis anteriores de ratas androgenizadas neonatalmente mediante la administración de 100 µg de propionato de testosterona, así como de testigos normales; en ambos grupos los animales fueron decapitados a los 5, 10, 18, 21, 30, 60 y 90 días de edad. Con fines comparativos se estudiaron también glándulas hipofisarias obtenidas de ratas macho adultos de 90 días de edad. En todos los grupos de animales se encontraron múltiples formas de la FSH dentro de un rango de pH de 7.5 a 4.0, así como una forma recuperada después de la adición de 1.0 mol NaCl/l a las columnas de cromatofoco ("pico de sal"). En animales de 5 a 30 días de edad (testigos y androgenizados durante el periodo neonatal) la mayoría de la FSH depositada en la columna fue recuperada dentro del pico de sal (45-85% del total de la FSH inmunoreactiva recuperada). Sin embargo, conforme los animales avanzaron en edad, la cantidad de la FSH enfocada dentro de regiones menos ácidas [punto isoeléctrico (pI) de 5.9 a 5.0] se incrementó significativamente; las hipófisis de animales de 60 días presentaron la mayor proporción del total de la FSH recuperada y enfocada dentro de este rango de pH (testigos de 60 días, 39.2±0.6%; androgenizadas, 23.1±0.9%; testigos de 30 días, 11.8±1.4%; androgenizadas, 8.9±1.4%; p<0.03 60 días vs 30 días para ambos grupos). Esta desviación hacia pIs menos ácidos de la hormona se

presentó de una manera atenuada en los animales androgenizados comparados con los testigos (p<0.01).

En ratas adultas testigo, el patrón de distribución por cromatofoco de la FSH intrahipofisaria varió según el día del ciclo estral. Los extractos hipofisarios de ratas testigo decapitadas durante la mañana del día del proestro, estro y diestro 1, presentaron las mayores proporciones de la FSH inmunoreactiva (23.2-28.8% del total) enfocada dentro de un rango de pH de 5.9-5.0, en tanto que únicamente el 10.4% de la FSH proveniente de animales androgenizados fue recuperada dentro de este rango (p<0.05). En animales testigo decapitados durante la mañana del proestro y del estro, se encontró que del 10 al 26% de la FSH intrahipofisaria enfocó dentro de la región más alcalina (pI 7.5-6.0); el patrón por cromatofoco de la FSH intrahipofisaria proveniente de ratas androgenizadas neonatalmente se caracterizó por presentar no más de una isoforma de la FSH en esta región (1.5±0.5% del total). En las ratas macho adultas, la mayoría de la FSH intrahipofisaria enfocó predominantemente dentro de un rango de pH de 4.9-4.0 (52.4±1.2% del total de la FSH inmunoreactiva) así como en el pico de sal (pH <4.0) (33.1±2.4% del total). Estudios *in vitro* empleando células de la hipófisis anterior en cultivo incubadas en presencia o ausencia de esteroides sexuales, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de ambas, lograron demostrar que esta última (GnRH) fue posiblemente la responsable de

Inducir a nivel hipofisario los cambios observados en el pI de la FSH durante la mañana del día del proestro.

Todas las formas de la FSH aisladas por cromatografía representaron dímeros compuestos por subunidades α y β a juzgar por su patrón de elución en Sephadex G-100. Las formas de la FSH con pI de 7.4 a 6.08 y 7.4 a 5.5, mostraron la mayor capacidad de unión a su receptor así como actividad biológica *in vitro*, respectivamente.

Estos resultados permiten sugerir que un patrón cíclico o "femenino" de secreción hipotalámica y gonadal conllevan hacia la

producción final de formas menos ácidas de la FSH con alta potencia biológica a nivel de la célula blanco, en tanto que un patrón de secreción tónica o "masculina" (como el que prevalece en animales machos o hembras con el síndrome anovulatorio inducido por andrógenos) se asocia a la producción de formas de la hormona fuertemente ácidas. El hallazgo de diferencias cualitativas y cuantitativas entre las moléculas pleomórficas de la FSH de animales adultos ciclistas y los androgenizados, le brinda un apoyo adicional al concepto acerca de la existencia de una dicotomía sexual en términos del tipo específico de la FSH producida por la hipófisis anterior.

INTRODUCCION

La hormona estimulante del foliculo (FSH) es una gonadotropina que pertenece, junto con la hormona luteinizante (LH) y la tirotropina, a una familia de hormonas hipofisarias de naturaleza glucoproteica (1). Cada una de estas hormonas son heterodimeros compuestos por una subunidad α y una β (2). En una especie animal determinada, la subunidad α se encuentra codificada por un gene comùn, en tanto que su subunidad β , la cual confiere la especificidad hormonal, es producto de la transcripción de diferentes genes particulares para cada hormona (3,4). Ambas subunidades contienen una o dos cadenas de oligosacáridos heterogéneos ligadas al aminoácido asparagina, las cuales presentan diferentes grados de sulfatación y sialización (1). Este amplio espectro en glucosilación, sialización y sulfatación, constituye la base química de la formación de sus isoformas así como de la extensa heterogeneidad por carga que presentan.

La hormona estimulante del foliculo existe en diferentes formas moleculares tanto en la hipófisis anterior (HA) como en el suero y la orina de numerosas especies animales

incluyendo la humana (5-25). El número y abundancia relativa de cada isohormona dependerán de la técnica específica empleada en su separación, del origen de la muestra biológica y del status endocrino del donador (7,10-12,14,18-21,25-28). En el estudio de esta heterogeneidad se han empleado diversas técnicas de separación tales como filtración en gel (28-30), cromatografía por afinidad (7,12,18) y recientemente isoelectroenfoque (IEF) (8,12,25,26) y cromatoenfoque (CF; 16,17,19,31-33) [estas dos últimas técnicas permiten la separación de las diferentes formas moleculares de las gonadotropinas según su punto isoeléctrico (pI)]. El CF presenta algunas ventajas sobre el IEF, de las cuales la más importante es que las proteínas que se encuentren fuera de la ventana del rango de pH estudiado, pueden ser fácilmente recuperadas y cuantificadas. Utilizando cualesquiera de estas dos técnicas se han identificado 6 a 10 componentes de la FSH, heterogeneos en su carga y con pls de 6.4 a 3.8 (5,8,12,16,19). En algunas condiciones experimentales ha sido posible identificar componentes

adicionales de la hormona en el "volumen vacío" o después de la adición de 1.0 mol/l de NaCl a las columnas de CF (16,19). Estas diferentes especies, formas moleculares o isohormonas de la FSH, difieren una de la otra no únicamente en sus pI sino también en su abundancia relativa, actividad de unión a su receptor, bioactividad *in vitro* y vida media plasmática. En términos generales, los componentes de la FSH con pI >5.0 son menos abundantes que aquellos con pI relativamente más ácidos (5,12,25,26). Estas diferentes formas moleculares de la FSH, caracterizadas inicialmente en extractos crudos de HA, han sido también identificadas claramente en sistemas *in vitro*, por ejemplo, en células hipofisarias dispersadas enzimáticamente y mantenidas en cultivo (15). Estudios por cromatografía en gel de las diferentes especies de la FSH hipofisaria, han demostrado que todas son dímeros compuestos por las 2 subunidades (15,16).

Se ha encontrado que la FSH intrahipofisaria y circulante de primates no humanos y humanos existe también en diferentes formas moleculares (16,20,34,35). Chappel y cols (16) y Kahn y cols (34) empleando CF e IEF, respectivamente, han encontrado

múltiples formas de la FSH intracelular en HA de primates no humanos; el perfil de estas isohormonas es similar al caracterizado en roedores. Así mismo, se han aislado diferentes isohormonas de la FSH en HA normales obtenidas de autopsias de varones y mujeres en diferentes edades, así como en cultivos de células provenientes de tumores hipofisarios productores de la FSH (20,22,23). Estudios llevados a cabo por Wide (20), empleando la técnica de electroforesis en suspensión de agarosa, han demostrado que la FSH de la HA humana está compuesta por un número variable de formas (por lo menos veinte) con diferencias mínimas entre sus respectivas cargas eléctricas

En sistemas *in vitro*, todas las formas intracelulares de la FSH son aparentemente secretadas hacia el medio de cultivo (15,32,36). Ullos Aguirre y cols. (15) encontraron que el medio de cultivo proveniente de células de la HA del criceto (hamster dorado) hembra cultivadas durante cuatro días, contiene en condiciones basales, seis componentes bien definidos de la FSH separables por IEF en geles de poliacrilamida; estos componentes presentaron pI idénticos a los encontrados

después del IEF de extractos crudos de HA y de lisados de células enzimáticamente dispersadas y cultivadas durante 4 días. Miller y cols (36) y Chappel y cols (16) han informado resultados similares después de incubar durante 2 horas hipófisis de cricetos y monos hembra, respectivamente. Miller y cols. (36) demostraron además que la adición del péptido liberador de las gonadotropinas (GnRH) al medio de cultivo, incrementó la secreción de las formas más básicas, con mayor actividad biológica en sistemas *in vitro*.

La secreción de la FSH heterogénea no ocurre únicamente en condiciones *in vitro* sino también *in vivo*. En condiciones basales, se han detectado varias formas moleculares de la FSH Inmunoactiva en el suero de ratas machos adultos (32). En este estudio en particular, se detectó una disminución en la proporción relativa de las isohormonas menos ácidas, hallazgo que sugiere la existencia de diferencias en la tasa de depuración metabólica entre las diversas formas moleculares. Estudios recientes en humanos han demostrado la existencia de múltiples formas de la FSH en el suero y que ciertas manipulaciones endocrinas o estados fisiológicos específicos del donador, son

capaces de inducir cambios en el perfil heterogéneo de la hormona secretada (10,35).

De los estudios descritos anteriormente, se puede concluir que la FSH no se encuentra representada por una molécula de estructura única, sino por un continuum de diferentes formas moleculares con propiedades fisicoquímicas y biológicas particulares para cada una.

En el estudio de la actividad biológica de cada isohormona de la FSH se han empleado diferentes técnicas *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos de los análisis *in vitro* así como del radioinmunoanálisis (RIA) han sido utilizados para calcular las relaciones radioreceptor/radioinmunoanálisis (RRA/RIA) y actividad biológica/inmunológica (B/I) de la gonadotropina en estudio. Estos índices expresan, respectivamente, la actividad de unión al receptor y la potencia biológica de la hormona a nivel de la célula blanco. En el estudio de la actividad biológica *in vitro* de las diferentes especies de la FSH, se ha empleado un análisis por radioreceptor utilizando como ligador a homogenados de túbulos seminíferos obtenidos de cricetos o ratas macho prepuberales (12,14,25,26).

Mediante esta técnica, se ha encontrado que cinco de las seis formas de la FSH separadas por IEF, poseen la capacidad de unirse a su receptor (12,26). El componente con un pI de 4.2-3.8 presenta una actividad de unión considerablemente reducida a juzgar por este método (12,26). Esta actividad de unión al receptor es máxima en las formas de la FSH con pIs > 5.3 y se encuentra persistentemente disminuida en las formas con pIs de 5.1-3.8 (12). Esta tendencia se ha encontrado en forma casi constante en la mayoría de los modelos animales estudiados, principalmente en los roedores y primates (12,14,16).

Un segundo método empleado en el estudio de la actividad biológica *in vitro* de los diferentes componentes de la FSH es el bioensayo basado en la capacidad de la FSH para estimular la síntesis y secreción de activadores del plasminógeno en células de la granulosa de la rata en cultivo (36,37). Con este sistema se han obtenido resultados muy similares a los observados en el análisis por radioreceptor (5,13,36). Las formas de la FSH con puntos isoeléctricos de 6.0 a 5.3 presentan mayor actividad biológica que las más ácidas (pI 5.1-3.8) cuando son analizadas a concentraciones equivalentes

(36). Existe por lo tanto una estrecha correlación entre el pI de la isohormona, su capacidad de unión al receptor y su actividad biológica *in vitro*.

Recientemente, Wide y Hobson (24) han analizado las propiedades biológicas de las diferentes formas moleculares de la FSH hipofisaria humana, separadas mediante electroforesis. Estos investigadores emplearon un análisis *in vitro* basado en la producción de estradiol por células de Sertoli en cultivo provenientes de ratas de 10 días de edad (38) así como la prueba *in vivo* del incremento en el peso de los ovarios inducida por la administración exógena de hCG y FSH (39). En el bioensayo *in vitro* encontraron que las formas más básicas de la FSH mostraban la mayor potencia, mientras que las más ácidas expresaban una actividad muy importante *in vivo*. El hallazgo de que las formas ácidas de la hormona presentan una vida media plasmática relativamente prolongada (23,40), sugiere la existencia de una correlación positiva entre la actividad biológica *in vivo* de una isohormona en particular y su vida media plasmática.

El contenido de ácido silícico de una

hormona glicosilada como la FSH, se encuentra estrechamente relacionado con su punto isoelectrico, carga eléctrica media, vida media plasmática, actividad de unión al receptor y potencias biológicas in vitro e in vivo (6,8,10,17,32,33,41,42) [en la FSH, el porcentaje de oligosacáridos que poseen residuos de ácido siálico varía de 28 a 83% dependiendo de la especie animal estudiada; el resto de los oligosacáridos son neutros (sin carga eléctrica; 10 a 32% del total), sulfatados (2 a 30%) o mixtos (un residuo de ácido siálico y otro de sulfato; 1 a 10 % del total) (1)]. Diversas evidencias experimentales apoyan estas relaciones: 1. Por medio de métodos indirectos (digestión con neuraminidasa), se ha demostrado que paralelamente al aumento en el pI de una de las isohormonas de la FSH, disminuye su contenido en ácido siálico y aumenta su potencia biológica in vitro (17); 2. Wide y Wide (40) han demostrado que la FSH hipofisaria obtenida de varones adultos y mujeres ancianas presenta una desaparición plasmática mas lenta que la proveniente de mujeres en edad reproductiva. Wide (23) ha sido capaz de demostrar que estas preparaciones de la FSH contienen mayor cantidad de residuos de ácido siálico comparadas con las de las donadoras

jóvenes. 3. La desialización de la FSH y la LH así como de la gonadotropina coriónica humana (hCG), disminuye sus actividades biológicas in vivo sin alterar significativamente sus propiedades inmunológicas (42-44); la disminución en actividad in vivo de la hormona desializada se ha atribuido a una tasa de depuración metabólica más rápida. 4. Blum y Gupta (32) y Blum y cols (33) han demostrado recientemente que los componentes más ácidos de la FSH hipofisaria de ratas machos adultos, están ricamente sializados, presentan una vida media plasmática prolongada y son más abundantes en el suero.

Aunque son desconocidos los mecanismos biológicos involucrados en la interacción de estos componentes moleculares de la FSH con su receptor en la glándula blanco, es probable que además del contenido particular de ácido siálico de la isohormona, las variaciones en la cantidad o arreglo espacial de otros carbohidratos situados internamente participen también en forma importante (26). Las formas de la FSH más básicas tienen mayor afinidad por la Concanavalina-A (la Concanavalina-A es una proteína vegetal con gran afinidad para

residuos de azúcar tales como manosa, glucosa y glucosamina, que se encuentran incorporados en las moléculas de los oligosacáridos) que las isohormonas con puntos isoelectrónicos menores (26). Si los residuos de ácido siálico de las moléculas ácidas son eliminados enzimáticamente, las formas resultantes menos ácidas presentarán un incremento en su capacidad de unión a la lectina (26). La observación de que tal aumento en la afinidad para Concanavalina-A se acompaña de una mayor capacidad de unión al receptor, permite sugerir la existencia de una estrecha relación entre el contenido particular de los carbohidratos internos al ácido siálico, su arreglo espacial, o ambos, y el comportamiento de la isohormona a nivel de la célula blanco. Alternativamente, este hallazgo indicaría la presencia de efectos inhibitorios del ácido siálico sobre la unión de la FSH a su receptor.

La mayoría de los estudios relacionados con la heterogeneidad por carga de la FSH, han demostrado que el patrón por IEF o por CF varía dependiendo del estado endocrinológico del donador (8,10,12,14, 16,21,25,26). La administración de estradiol a cricetos ovariectomizados es capaz de

modificar el perfil de distribución por CF de la FSH hipofisaria (31). La exposición a este esteroide durante 20 horas se acompaña de aumentos en las proporciones relativas de las isohormonas más ácidas (con menor actividad biológica *in vitro*) de la FSH; sin embargo, si el tiempo de exposición se prolonga durante 10 horas adicionales (periodo durante el cual estos animales inician la secreción máxima de gonadotropinas), es posible inducir aumentos en las proporciones relativas de las formas menos ácidas (31). Ya que este desplazamiento de las formas de la FSH de menor a mayor pI puede ser prevenido mediante la administración concomitante de fenobarbital (este fármaco evita la descarga de GnRH inducida por estradiol), se ha sugerido que la producción de las isohormonas de la FSH, es regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación entre la gónada y el hipotálamo. En apoyo a esta hipótesis, se ha encontrado que el perfil de heterogeneidad por carga de la FSH varía durante el ciclo estral, en donde la proporción relativa de las formas menos ácidas es más evidente durante las horas que preceden a la descarga de LH y FSH inducida por GnRH y los estrógenos (proestro a las 13 horas) (26). Como sería de

esperar, existen diferencias importantes en la heterogeneidad por carga de la FSH tanto entre sexos como después de la castración. Ulloa-Aguirre y Chappel (12) encontraron que las hipófisis anteriores obtenidas de cricetos macho castrados, presentaban incrementos significativos en sus contenidos de formas moleculares de la FSH más ácidas (pl 4.7) en comparación con las glándulas de animales intactos. Por otra parte, el patrón de distribución por IEF de la FSH hipofisaria de animales machos adultos fue diferente del obtenido en las hembras; las isohormonas del macho fueron más ácidas que las de las donadoras hembra (25,26). Esta dicotomía sexual de las hormonas hipofisarias, ha llevado a postular la existencia de una FSH "androgénica" y de otra "estrogénica" o femenina, considerando que los esteroides gonadales tienen un papel crítico en el tipo específico de la FSH producida por la HA (29).

De los estudios descritos anteriormente, es posible concluir que las hormonas esteroides sexuales (principalmente estrógenos) y la GnRH determinan concertadamente las características fisicoquímicas y la potencia biológica de la FSH por producirse y secretarse a la

circulación. Los efectos de estos dos factores son mediados posiblemente a través de modificaciones co- y post-traduccionales en el contenido o arreglo espacial de los carbohidratos en la molécula de la gonadotropina (1). De hecho, Liu y Jackson (45) han demostrado que la GnRH regula el grado de glicosilación de la molécula de LH. El resultado final de esta fina interacción entre la gónada, el hipotálamo y la hipófisis sería la producción y secreción de diferentes tipos de la FSH, en proporciones acordes con los requerimientos fisiológicos del sujeto en un momento determinado, para llevar a cabo acciones temporales específicas sobre la función gonadal.

En la presente tesis se describen una serie de estudios encaminados a obtener evidencias adicionales que apoyen la hipótesis de la dicotomía sexual en la producción del tipo específico de la FSH sintetizada por la HA. Para llevar a cabo este objetivo se caracterizó el perfil de heterogeneidad por carga de la FSH hipofisaria en el modelo experimental de la rata hembra androgenizada (46-48). En este modelo, las ratas hembras recién nacidas que son sujetas a androgenización

hipotalámica mediante la administración de testosterona en los primeros 5 días de vida, permanecen en estro persistente durante la edad adulta y desarrollan ovarios poliquísticos hipersecretorios de andrógenos aromatizables (46). La unidad hipotálamo-hipofisaria de los animales androgenizados presenta características de secreción gonadotrópica semejantes a las del macho adulto en cuanto a que no guarda un patrón cíclico de secreción (49,50). Esta secreción tónica de las gonadotropinas induce el desarrollo de quistes ováricos, los cuales al ser persistente y acíclicamente estimulados por la LH, producen un exceso de andrógenos aromatizables (50), perpetuándose así el patrón de secreción tónico de la unidad hipotálamo-hipofisaria. Este modelo, cuya contraparte en el humano está representada por el Síndrome de Ovarios Poliquísticos (51), ofrece un ambiente endócrino rico en andrógenos y estrógenos, sin variaciones cíclicas significativas en el tono hipotalámico de GnRH.

Si la hipótesis de la dicotomía sexual en la glicosilación de la FSH es correcta, la rata hembra androgenizada durante el periodo neonatal no debe presentar modificaciones

significativas en la heterogeneidad por carga de su FSH intrahipofisaria durante la prepubertad; sin embargo, durante su maduración sexual, debe desarrollar la capacidad para producir moléculas de la FSH con características fisicoquímicas y biológicas más semejantes a las del animal macho.

OBJETIVOS

1. Estudiar la heterogeneidad por carga de la FSH hipofisaria de ratas hembras androgenizadas utilizando la técnica de cromatoenfoco,
2. Caracterizar cada una de las formas aisladas de la FSH en cuanto a peso molecular aparente, actividad de unión a su receptor y potencia biológica *in vitro* y
3. Analizar la participación de los esteroides sexuales y de la hormona hipotalámica liberadora de las gonadotropinas en la secreción de las diferentes formas moleculares de la FSH, empleando sistemas *in vitro*.

HIPOTESIS

La FSH sintetizada por la HA de ratas hembras androgenizadas existe en múltiples formas moleculares que pueden ser

separadas por su punto isoeléctrico. El patrón de heterogeneidad por carga de la FSH hipofisaria de estos animales es de tipo masculino debido a la predominancia de los andrógenos como esteroide sexual. Al igual que lo observado en el animal macho, las formas moleculares de la FSH en la hembra androgenizada tenderán a ser más ácidas y con menor actividad biológica *in vitro*. Existe una dicotomía sexual en el tipo específico de la FSH sintetizada por la hipófisis anterior.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon ratas adultas hembra preñadas de la cepa CII Z-V (18) mantenidas en cajas individuales bajo condiciones de luz controladas (luz encendida de las 05.00 a las 19.00 h). Las ratas hembra recién nacidas fueron inyectadas s.c. con 100 µg de propionato de testosterona disuelto en aceite de maíz (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, E.U.A.) (PT) o vehículo (testigos) en el día 1 de vida (día del nacimiento). Los animales fueron decapitados en grupos de por lo menos diez animales a los 5, 10, 18, 21, 30, 60 y 90 días de edad y las hipófisis anteriores se separaron de la porción posterior mediante disección bajo

microscopio. En esta cepa particular de ratas, la apertura vaginal se presenta a los 42 ± 1.5 días de edad; es posible detectar ciclos estrales regulares únicamente en aquellos animales mayores de 70 ± 1.0 días. Las hipófisis anteriores de ratas testigo adultas (90 días de edad) se obtuvieron entre las 09.00 y 10.00 h de cada día del ciclo estral; únicamente fueron incluidos aquellos animales que hubieran mostrado consecutivamente tres ciclos estrales regulares de 4 días. Se obtuvieron también glándulas hipofisarias de ratas macho adultos (intactos) de 90 días de edad, exclusivamente para propósitos comparativos. Cada glándula fue individualmente pesada y homogeneizada con 10 golpes de un pistilo de teflón a 4°C en 100 µl de amortiguador de fosfatos (0.05 mol/l)-salino fisiológico (PBS; pH 7.5) conteniendo 0.3 mg/ml del inhibidor de proteasas fenil-metilo-fluoruro de sulfonilo (Sigma). El homogenado se centrifugó a $1000 \times g$ por 30 minutos a 4°C y la fracción sobrenadante (extracto de hipófisis anterior) fue recolectada y almacenada en congelación a -20°C hasta el día en que se realizó el cromatofoco. Los ovarios fueron disecados, pesados, fijados en líquido de Bouin y parafinados. Se realizaron cortes

seriados de 10 μm de grosor que fueron teñidos con hematoxilina eosina y posteriormente se midió el diámetro folicular con la ayuda de un ocular micrométrico según el método de Weischen (52).

a) Cromatofoco de extractos de hipófisis anterior:

La obtención de las diferentes formas moleculares de la FSH intrahipofisaria se realizó utilizando el cromatofoco como método de fraccionamiento por carga eléctrica (53). El poliamortiguador-74 y la resina de intercambio (PBE-94) fueron adquiridas de Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ, E.U.A). La columna de PBE fue construida con dimensiones de 30 x 1 cm y equilibrada con 15 volúmenes de amortiguador de Imidazol-HCl (0.025 mol/l, pH 7.4). Posteriormente se depositó sobre la superficie de la columna una muestra (poza de 6 a 7 extractos hipofisarios individuales por grupo) de extractos hipofisarios que habían sido previamente equilibrados con el amortiguador de elución (Poliamortiguador 74 a una dilución 1:8 en agua desionizada) mediante cromatografía en Sefadex G-25 (microcolumnas de 6.7 x 0.6

cm; Pharmacia Fine Chemicals). Inicialmente se corrieron 5 ml del amortiguador de elución para evitar la exposición de la muestra depositada a extremos de pH. Finalmente se colectaron entre 110 y 130 fracciones de 2 ml a una velocidad de flujo de 1 ml/4 min a 4°C. El pH de cada fracción fue simultáneamente medido y cuando el eluido de la columna alcanzó un pH de 4.0 el amortiguador se cambió por una solución de NaCl (1 mol/l) para desplazar cualquier material no recuperado dentro del rango de pH de 7.5 a 4.0 (pico de sal). Cada fracción fue almacenada en congelación a -20°C hasta el día en que se realizó el radioinmunoanálisis (RIA) de la FSH. Se cromatofocaron separadamente en columnas por duplicado un total de 3 a 4 pozas de extractos de HA por grupo. Las recuperaciones de la FSH por este método fueron de 76 \pm 4% de la cantidad total originalmente depositada en la columna.

b) Cromatografía en Sefadex G-100 de cada isoforma intrahipofisaria de la FSH:

Para analizar si la totalidad de las diferentes formas moleculares identificadas mediante CF representaban dímeros de la FSH (hormona completa), subunidades alfa y beta

libres o ambos, se determinó su peso molecular aparente mediante cromatografía por exclusión en Sefadex G-100. Posterior a la determinación del contenido de la FSH de cada fracción obtenida después de la separación por cromatoenfoco de una poza de extractos de HA proveniente de ratas hembra adultas ovariectomizadas (de 120 días de edad, castradas a los 90 días), las fracciones que contenían las mayores concentraciones de cada isohormona de la FSH, fueron dializadas separadamente contra 0.01 mol/l de carbonato de amonio (pH 7.5) y concentradas por liofilización. Cada forma de la FSH o mezcla de formas con pH próximos fueron redisueltas en 0.05 mol/l de PBS conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (Sigma; PBS-ASB) y posteriormente cromatografiadas a través de una columna de Sefadex G-100 (57 x 2.7 cm), la cual había sido calibrada con azul dextrán (Sigma; M, 2000,000), ASB (Sigma; M, 67,000), ¹²⁵I-rFSH-I-6 (NIDDK, Bethesda, MD, E.U.A.; M, 32,000), ovalbúmina (Sigma; M, 21,500) y citocromo C (Sigma; M, 13,370). Como eluyente de la columna se utilizó PBS-ASB y la velocidad de flujo fue de 7 ml/h a 4°C. Todas las fracciones recolectadas (de 1 ml cada una), fueron almacenadas en congelación hasta la cuantificación de su

contenido de FSH por RIA.

c) RIA de la FSH:

FSH de rata altamente purificada (NIDDK rFSH-I-6) fue sometida a radiomarcaje con ¹²⁵I por el método de lactoperoxidasa-glucosa oxidasa como fue descrito por Bex y Corbin (54). Después de la separación de la fracción radiomarcada de la FSH mediante cromatografía en Sefadex G-100, la ¹²⁵I-FSH fue purificada por medio de cromatografía por afinidad en Concanavalina A (Pharmacia) (55). El RIA de rFSH se llevó a cabo empleando el estuche proporcionado por el NIDDK siguiendo el método de Coutifaris y Chappel (56). La preparación de referencia empleada en la construcción de la curva estándar fue la preparación de referencia (RP) rFSH-1 ó rFSH-2 (NIDDK); rFSH-RP-2 es 45 veces más potente que la preparación de referencia 1. Los resultados son expresados en nanogramos o microgramos de rFSH-RP-1 a menos que se especifique lo contrario. Para evitar variaciones entre los análisis, todas las muestras provenientes de una misma columna fueron incluidas en la misma corrida. La variación dentro del análisis fue de 7% y la sensibilidad de 4 a 8 ng/tubo (RP-1).

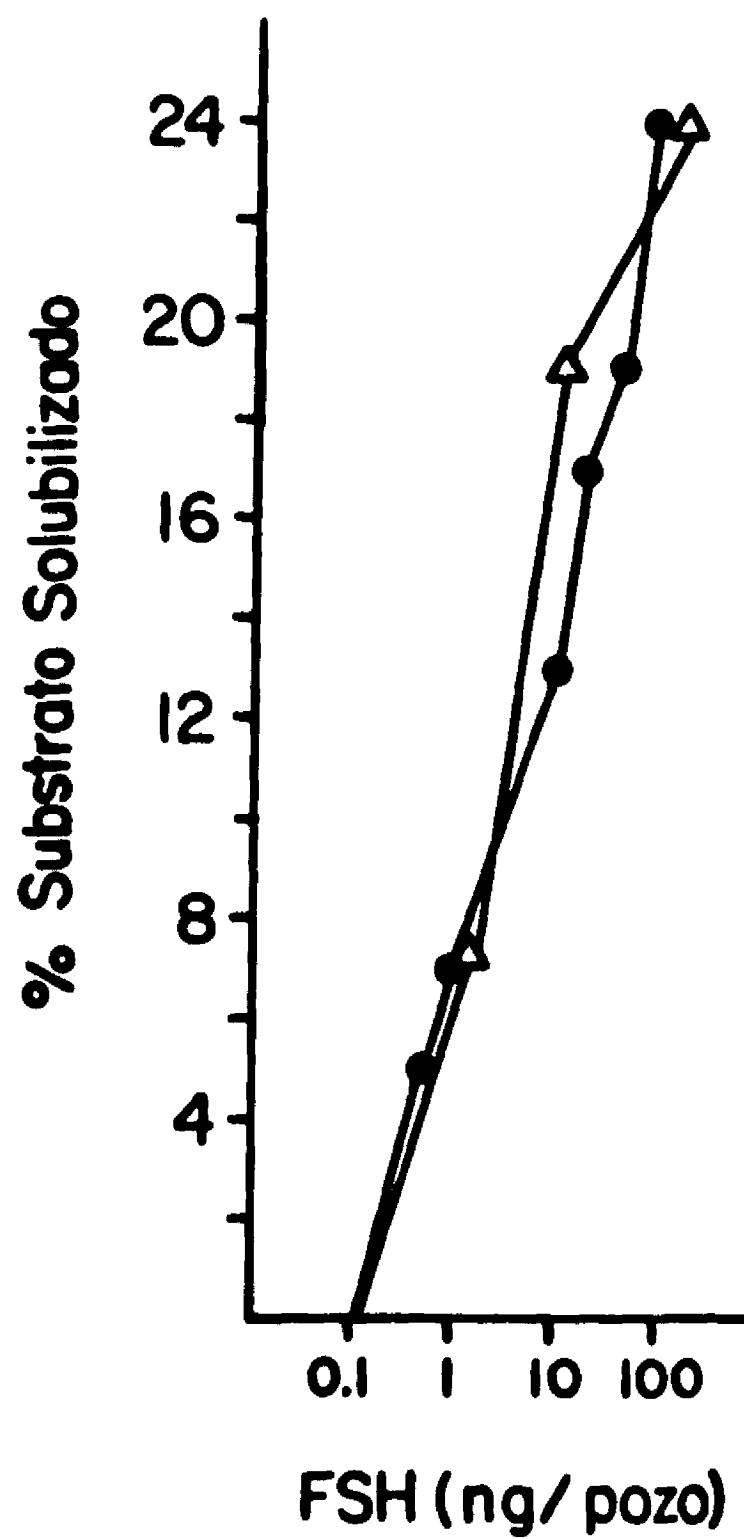
d) Análisis por radioreceptor (RRA) de la FSH:

Con el objeto de determinar la capacidad de unión a su receptor, cada isohormona mayor o poza de formas menores con pls cercanos e identificadas después del cromatoenfoue de extractos hipofisarios provenientes de ratas adultas decapitadas en la mañana del proestro (pl 7.4, 6.08, 5.45-5.15, 4.88-4.42 y pico de sal, ver Figura 4 para su identificación), fueron sometidas a cuantificación por RRA. Previo a este procedimiento, cada muestra fue excluida cromatográficamente a través de Sefadex G-100 tal y como se describió en la subsección b. El RRA se llevó a cabo empleando como ligador a homogenados de túbulos seminíferos provenientes de ratas macho de 28 días de edad y siguiendo el método de Ulloa-Aguirre y Chappel (12). Cada muestra fue analizada a 3 ó 4 concentraciones diferentes por duplicado. La variación dentro del análisis fue <12% y entre los análisis <18%. El estándar de la FSH empleado en la construcción de la curva fue la preparación RP-2 y la hormona radiomarcada rFSH-I-6. La sensibilidad del método fue de 8 ng/ tubo. La actividad de unión al receptor de cada isohormona se

expresa en términos de la relación RRA/RIA.

e) Bioensayo in vitro de FSH:

La actividad biológica de cada isohormona identificada por medio del cromatoenfoue de extractos hipofisarios de ratas decapitadas durante la mañana del día del proestro (ver subsección g para su aislamiento y la Figura 4 para su identificación), se valoró empleando el método del activador del plasminógeno descrito por Beers y Strickland (37) y modificado por Miller y cols. (36). Este método se basa en la capacidad de la la FSH para inducir la síntesis y secreción de activador del plasminógeno por células de la granulosa en cultivo. El estándar empleado en la elaboración de la curva fue la preparación altamente purificada hFSH-I-3 (NIDDK), que de manera idéntica a la hFSH-I-2 del mismo origen (NIDDK), presenta las mismas potencias biológica e inmunológica que sus homólogos en la rata (rFSH-I-5 e I-6, NIDDK) (Figura 1). Estos estándares de referencia son inmunológicamente 30 veces más potentes que el estándar RP-1. Cada uno de los concentrados de las isohormonas se valoró por triplicado a 3 ó 4 diferentes concentraciones. Las tres isohormonas



●-● rFSH I-5 ($DE_{50} = 2.6 \pm 1.85$)
 Δ-Δ hFSH I-2 ($DE_{50} = 3.1 \pm 0.12$)

FIGURA 1

Efecto de diferentes dosis de la rFSH y la hFSH en la producción de activador del plasminógeno por células de la granulosa en cultivo. No se encontraron diferencias significativas entre las DE_{50} de ambos estándares.

menos ácidas (pls 7.40, 6.08 y 5.45 a 5.15), se analizaron sin previa exclusión cromatográfica a través de Sefadex G-100, en tanto que las más ácidas (pl 4.88-4.42 y pico de sal) se analizaron tanto antes como después de este procedimiento. La potencia biológica *in vitro*, se expresa como la relación actividad biológica/actividad inmunológica (relación B/I) después de la conversión de la cantidad inmunológica detectada en ng de rFSH-RP-1 a ng de hFSH-I-3. Todas las isohormonas fueron incluidas en la misma corrida para evitar las variaciones entre los análisis. La variación dentro del análisis fue <20% y la sensibilidad igual a 1 ng en términos de hFSH-I-3 (30 ng de rFSH-RP-1).

f) Cultivo de células de la hipófisis anterior y separación de las isohormonas secretadas mediante enfoque isoelectrico:

Con el objeto de identificar aquellos factores hormonales tanto gonadales como hipotalámicos (GnRH) que de una u otra manera podrían estar involucrados en la regulación de la producción y secreción de las diferentes formas moleculares de la FSH a nivel hipofisario, se analizó la heterogeneidad por carga de la FSH

intracelular y secretada empleando cultivos de células de la hipófisis anterior provenientes de ratas hembra inmaduras de 21 días de edad. Las células cultivadas fueron incubadas en presencia o ausencia de los diferentes factores hormonales gonadales e hipotalámicos a los cuales la hipófisis anterior se encuentra expuesta, en condiciones fisiológicas, ya sea en forma tónica (como en el caso del macho o de la hembra androgenizada) o de manera secuencial y cíclica, como sucede con la hembra adulta cicliante. Las células fueron dispersadas siguiendo el método descrito por Vale y cols (65) y sembradas en medio de Eagle modificado (Dulbecco) (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) conteniendo 5 µg/ml de insulina, 4 mmol/l de glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 25 mmol/l de HEPES (Sigma) y 10% de suero fetal de ternera inactivado, a una densidad equivalente a 2 hipófisis/pozo e incubadas en 5% CO₂-95% aire húmedo a 37°C durante 6 días. Durante los 2 primeros días, las células fueron preincubadas en ausencia de factores; al tercer día los pozos fueron enjuagados dos veces con medio libre de suero, añadiéndose posteriormente medio de cultivo sin suero fetal ni factores o con estradiol (3.67 nmol/l), estradiol +

progesterona (3.67 y 31.8 nmol/l, respectivamente) o testosterona (4 nmol/l) dejándolos en incubación por 24 horas. Al quinto día de cultivo se agregó GnRH (Genentech, San Francisco CA, EUA) a una concentración final de 10 nmol/l a la mitad de los pozos de los grupos testigo sin factores, estradiol, testosterona y estradiol+progesterona; esta concentración del péptido hipotalámico liberador es suficiente para inducir la secreción máxima de la FSH inmunoreactiva (57). En estas diferentes condiciones, la incubación se prolongó por 48 horas más al cabo de las cuales los medios y las células fueron recolectados separadamente, dializados contra 2 cambios de 0.01 mol/l carbonato de amonio a 4°C y concentrados por liofilización. El número de pozos por grupo de incubación por cultivo fue de 3; se sembraron y analizaron un total de 3 cultivos.

Los liofilizados fueron resuspendidos en 100 µl de PBS y las diferentes formas moleculares de la FSH contenidas en cada muestra, se separaron de acuerdo a su carga eléctrica mediante enfoque isoelectrico en geles de poliacrilamida [rangos de pH de 6.5 a 4.0 ó 8.5 a 3.5 (LKB Instruments,

Piscataway, NJ, E.U.A)], siguiendo el método descrito por Ulloa-Aguirre y cols (12,25,26) y depositando en los carriles del gel volúmenes de 10 a 40 µl de muestra. Ya que la separación en geles con un gradiente de pH de 8.5 a 3.5 reveló un patrón de distribución de la FSH similar al obtenido con los geles corridos en el rango de 6.5 a 4.0, se emplearon ambos indistintamente para la separación de las diferentes isoformas secretadas. El isoelectroenfoco se llevó a cabo durante 2.5 h a 8°C para los geles con rango de pH de 6.5 a 4.0 y durante 1.5 h a 4°C para aquéllos con un gradiente de pH de 8.5 a 3.5, al cabo de los cuales previa medición del gradiente de pH, se fraccionó cada carril en 27 rebanadas de 3 mm cada una. Las proteínas contenidas en cada fracción o rebanada de gel, fueron recuperadas mediante incubación en 400 µl de PBS-ABS durante 24 horas a 4°C. Cada fracción eluida fue cuantificada en su contenido de la FSH por RIA. Se realizaron un total de 3 a 4 electroenfocos por grupo de incubación por cultivo. El IEF en geles de poliacrilamida fue seleccionado como método de separación en estos estudios considerando la cantidad relativamente baja de la FSH recuperada de los cultivos en comparación

con la contenida en los extractos de homogenados crudos de hipófisis anteriores.

g) Análisis estadístico:

Las diferencias entre grupos fueron analizadas empleando un análisis de varianza (una vía) cuando el número de grupos fue >3; este análisis fue seguido de la prueba de comparación múltiple de Walker y Duncan (58). Cuando el número de grupos fue igual a 2, se aplicó la prueba de t de Student. Para determinar el grado de correlación entre la cantidad de la FSH recuperada dentro de un rango específico de pH y la edad del donador se empleó un análisis de correlación. Finalmente, para comparar las diferencias entre los valores de las pendientes generadas por el estándar de la FSH y las diferentes isohormonas obtenidas mediante cromatoenfoco en el RIA y RRA, se utilizó la prueba de t de Student para valores no pareados. Se consideró como diferencia significativa a aquellos valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Todos los extractos de HA sometidos a

cromatoenfoco presentaron varios picos de la FSH inmunactiva dentro de un rango de pH de 7.5 a 4.0 así como en aquellas fracciones recuperadas después de la adición de 1.0 mol/l de NaCl a las columnas de CF (pico de sal) (Figuras 2 a 5). Cada uno de estos picos representó una isohormona o especie particular de la FSH. Todos los picos identificados en las fracciones recolectadas, desplazaron al trazador (^{125}I -FSH) del anticuerpo en forma paralela con la curva estándar, sin encontrarse diferencias significativas entre los valores de sus pendientes (Figura 6). La presencia y abundancia relativa de estas isohormonas identificadas varió dependiendo del estadio de maduración sexual, el día específico del ciclo estral, el sexo del donador y las manipulaciones experimentales realizadas. Con el objeto de cuantificar las diferencias en los patrones de CF de la FSH entre los diferentes grupos de animales, cada perfil de CF fue dividido en 4 regiones según los siguientes rangos de pH: área 1, pl 7.5-6.0; área 2, pl 5.9-5.0; área 3, pl 4.9-4.0; área 4, pl <4.0 (pico de sal), y la cantidad de la FSH inmunactiva presente en cada una de ellas se utilizó en las comparaciones estadísticas.

Patrones de distribución por

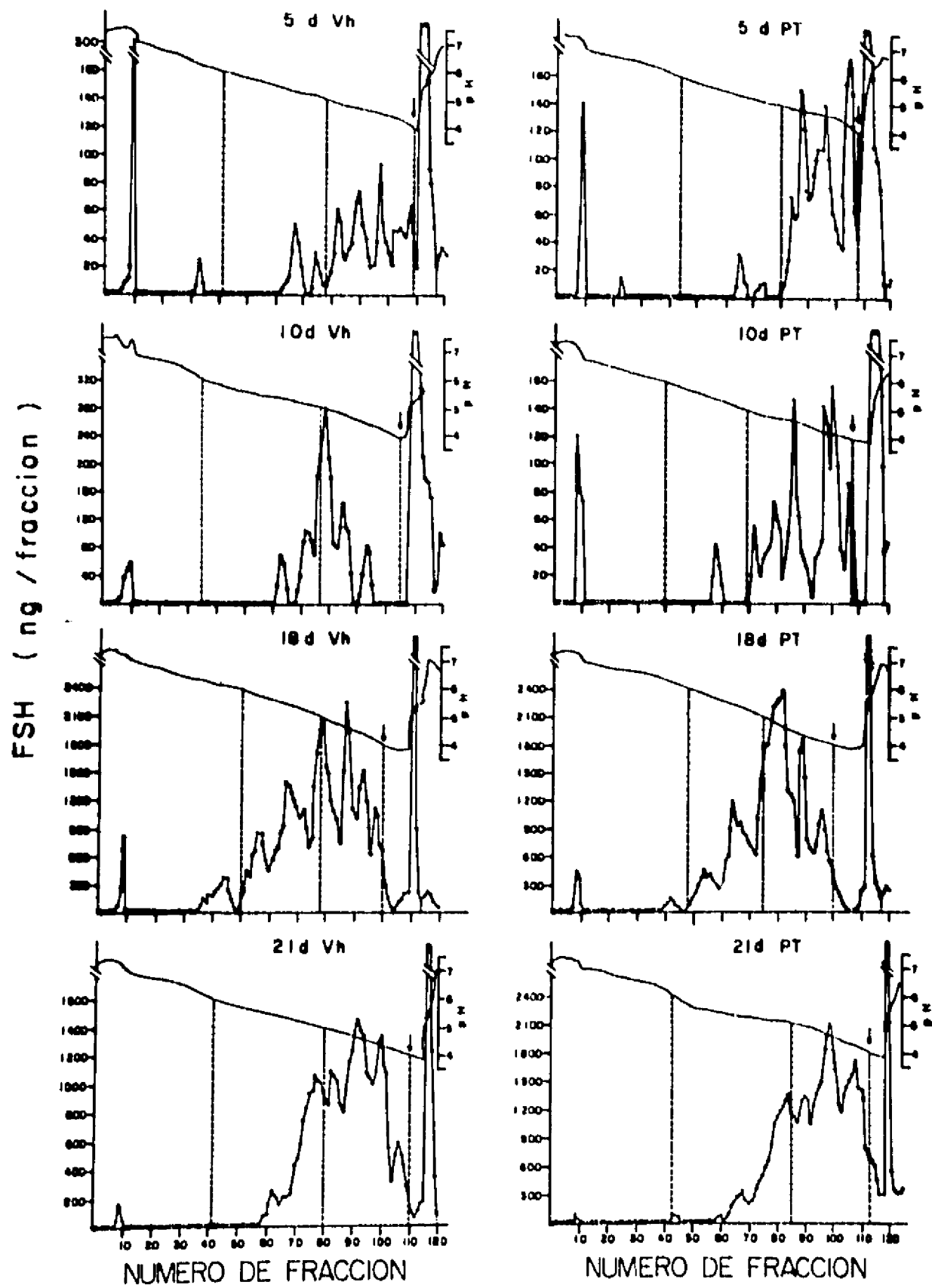


FIGURA 2

Patrones representativos de distribución por pI de la FSH intrahipofisaria después del cromatofoco de extractos de hipófisis anteriores obtenidas de ratas testigo (Vh) y androgenizadas (PT), decapitadas a los 5, 10, 18 y 21 días de edad. Cada columna fue eluida con 1 mol/l de NaCl al detectar en los eluidos un pH de 4.0. Las líneas verticales discontinuas, señalan las divisiones del gradiente de pH en las siguientes áreas: pI 7.5-6.0, pI 5.9-5.0, pI 4.9-4.0 y pI <4.0 (pico de sal). Las flechas marcan la fracción en la que se inició la adición de 1 mol NaCl/l.

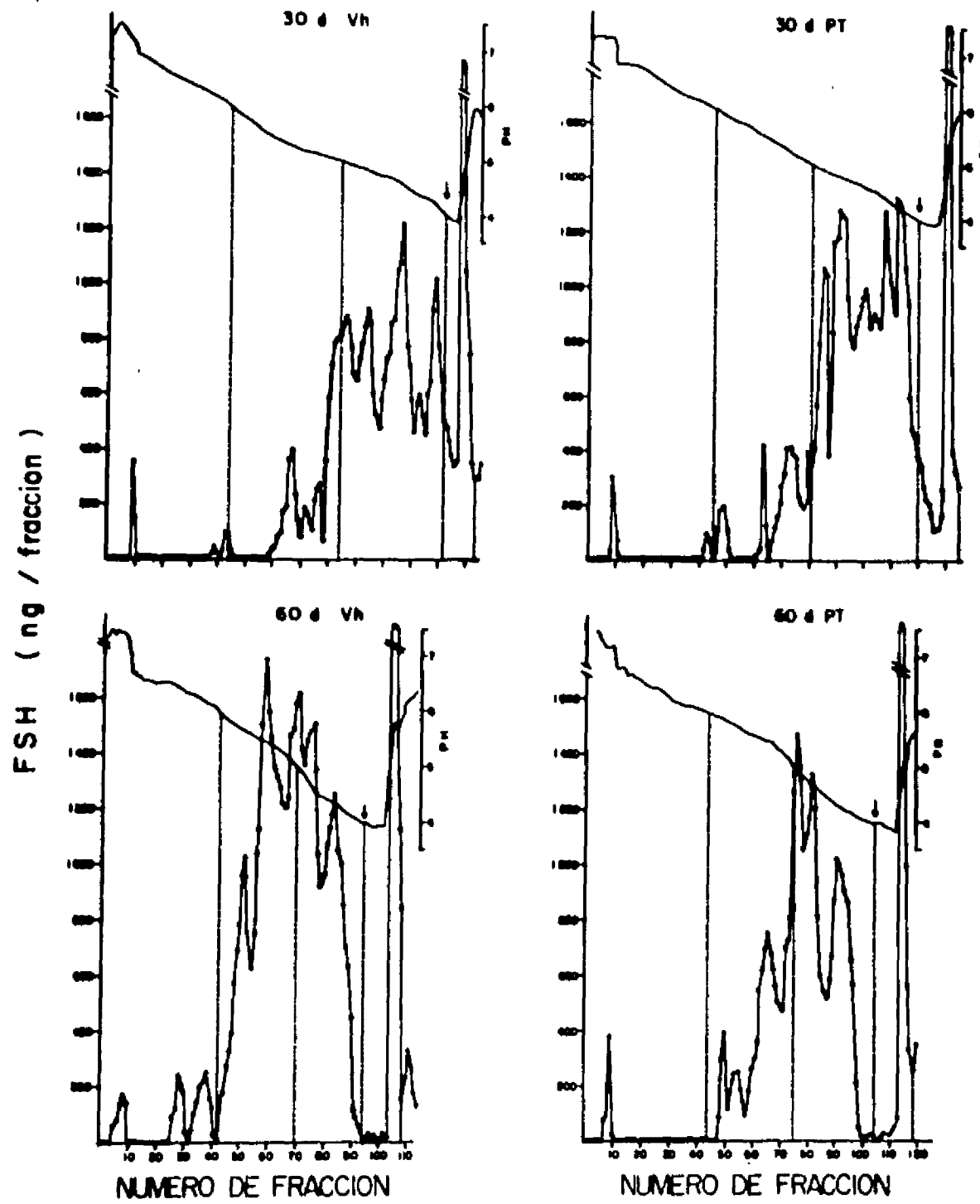


FIGURA 3

Patrones representativos de distribución por pl de la FSH intrahipofisaria después del cromatofoco de extractos de hipófisis anteriores obtenidas de ratas testigo (Vh) y androgenizadas (PT), decapitadas a los 30 y 60 días de edad. Las líneas discontinuas marcan las divisiones del gradiente de pH (ver leyenda de la Figura 2). Las flechas muestran la fracción en la que se inició la elución de 1 mol/l de NaCl.

cromatoenfoco de la FSH intrahipofisaria en animales testigo y tratados con PT y decapitados entre los 5 y 30 días de edad:

En los grupos testigo y experimental de 5 a 30 días de edad, la mayoría de la FSH intrahipofisaria cromatoenfocada fue recuperada dentro del pico de sal (45 a 85% del total de la FSH inmunoreactiva recuperada) así como dentro de un rango de pH de 4.9-4.0 (12-39% del total) (Figuras 2 y 3, Tabla 1). La cantidad relativa de la FSH recuperada dentro de este pico de sal (pH<4.0), disminuyó progresivamente conforme los animales avanzaron en edad ($r = -0.729$ y -0.732 , $p < 0.01$, tanto para los grupos testigo como para los tratados con PT); por el contrario, la cantidad relativa de la FSH recuperada dentro de las áreas 2 (pl 5.9-5.0) y 3 (pl 4.9-4.0) se incrementó significativamente (Tabla 1).

En los grupos testigo y experimental con edades entre 18 y 30 días, las distribuciones por CF de la FSH fueron similares, detectándose únicamente discretas pero significativas diferencias en las cantidades de la FSH recuperadas dentro de las áreas 1 y 2 (valores de pl de 7.5- 6.0 y 5.9-5.0 respectivamente) entre los animales testigo

y tratados con PT de 18 días de edad (Tabla 1). Aún cuando los patrones de distribución de la FSH de los animales testigo más jóvenes (5 y 10 días) fueron aparentemente diferentes a los de los experimentales de la misma edad, se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos en la cantidad de la FSH recuperada dentro del gradiente de pH correspondiente al área 2 (pl 5.9-5.0) ($p < 0.01$) únicamente en los animales de 10 días.

Patrones de distribución por cromatoenfoco de la FSH intrahipofisaria en animales testigo y tratados con PT y decapitados a los 60 y 90 días de edad:

A los 60 y 90 días de edad se detectaron claras diferencias significativas, tanto cualitativas como cuantitativas, entre los patrones de distribución de la FSH por CF de los animales hembras testigo y las androgenizadas durante el periodo neonatal (Figuras 3, 4 y 5; Tablas 1 y 2). En ambos grupos se observó un incremento significativo en la cantidad de la FSH recuperada dentro del rango de pH de 5.9-5.0 a los 60 días de edad; este incremento en moléculas de la FSH menos ácidas, fue sin embargo más pronunciado en

Tabla 1. Cambios en la distribución de FSH a través de un gradiente con pH en hipófisis anteriores obtenidas de animales testigo y tratados con propionato de testosterona (PT) de 5 a 60 días de edad. Los valores representan la media \pm E.E. (n=3 ó 4 cromatoenfoces por grupo).

FSH por área (como % del total recuperado)

Edad (días)	pI 7.5 - 6.0		pI 5.9 - 5.0		pI 4.9 - 4.0		pI < 4.0	
	Testigo	PT	Testigo	PT	Testigo	PT	Testigo	PT
5	1.9 \pm 1.1 ^{abc}	1.5 \pm 0.5 ^{abc}	1.1 \pm 0.6 ^a	0.5 \pm 0.3 ^a	12.0 \pm 1.1 ^a	13.0 \pm 1.1 ^a	85.2 \pm 2.0 ^a	84.9 \pm 2.0 ^a
10	1.2 \pm 0.1 ^a	1.5 \pm 0.2 ^{ac}	0.07 \pm 0.06 ^a	0.9 \pm 0.02 ^{a*}	21.0 \pm 4.5 ^{ab}	28.5 \pm 1.8 ^b	77.7 \pm 4.5 ^a	70.0 \pm 2.9 ^b
18	3.5 \pm 0.2 ^b	1.6 \pm 0.1 ^{a*}	22.0 \pm 0.9 ^b	14.2 \pm 2.0 ^{b*}	29.7 \pm 1.5 ^b	37.0 \pm 3.6 ^{cb}	44.8 \pm 0.5 ^b	47.1 \pm 3.6 ^{cd}
21	0.7 \pm 0.1 ^c	0.6 \pm 0.2 ^b	15.4 \pm 1.5 ^c	10.9 \pm 0.3 ^b	35.7 \pm 1.4 ^c	38.7 \pm 1.4 ^c	48.2 \pm 3.0 ^{cb}	49.6 \pm 1.4 ^d
30	1.0 \pm 0.1 ^{ac}	0.7 \pm 0.1 ^b	11.8 \pm 1.4 ^c	8.9 \pm 1.4 ^b	30.9 \pm 0.9 ^b	32.8 \pm 0.9 ^b	56.3 \pm 1.7 ^c	57.6 \pm 2.2 ^c
60	4.1 \pm 0.4 ^{bd}	1.1 \pm 0.1 ^{c*}	39.2 \pm 0.6 ^d	23.1 \pm 0.9 ^{c*}	31.0 \pm 1.0 ^{bc}	40.0 \pm 1.6 ^{c*}	25.7 \pm 1.5 ^d	36.0 \pm 0.7 ^{e*}

pI, punto isoeléctrico

Las medias identificadas por diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.03$) dentro de la misma columna (ANOVA y prueba de Walker y Duncan).

* $p < 0.01$ vs testigo en el mismo rango de pI (prueba de t no pareada).

Tabla 2. Cambios en la distribución de FSH a través de un gradiente de pH en hipófisis anteriores obtenidas de ratas adultas de 90 días de edad ya sea testigos ó tratadas con propionato de testosterona (PT). Los valores representan la media \pm E.E. (n=3 ó 4 cromatoenfoces por grupo).

<u>FSH por área (como % del total recuperado)</u>				
	<u>pI 7.5 - 6.0</u>	<u>pI 5.9 - 5.0</u>	<u>pI 4.9 - 4.0</u>	<u>pI < 4.0</u>
<u>Grupo</u>				
PROESTRO	26.5 \pm 1.1 ^a	28.8 \pm 2.0 ^a	17.5 \pm 1.5 ^a	27.1 \pm 1.8 ^a
ESTRO	10.0 \pm 1.5 ^b	25.4 \pm 1.5 ^a	25.2 \pm 1.3 ^b	39.4 \pm 2.6 ^{bd}
DIESTRO 1	3.3 \pm 0.3 ^c	23.2 \pm 2.6 ^a	24.5 \pm 0.7 ^b	49.0 \pm 2.9 ^b
DIESTRO 2	1.3 \pm 0.6 ^d	11.6 \pm 0.5 ^b	27.6 \pm 1.1 ^b	59.5 \pm 1.2 ^c
PT	1.5 \pm 0.5 ^{de}	10.4 \pm 2.1 ^b	23.4 \pm 2.2 ^{ab}	64.7 \pm 4.0 ^c
MACHOS	3.0 \pm 0.5 ^{ce}	11.5 \pm 3.2 ^b	52.4 \pm 1.2 ^c	33.1 \pm 2.4 ^{ad}

pI, punto isoeléctrico

Las medias identificadas por diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) en el mismo rango de pI (ANOVA y prueba de Walker y Duncan).

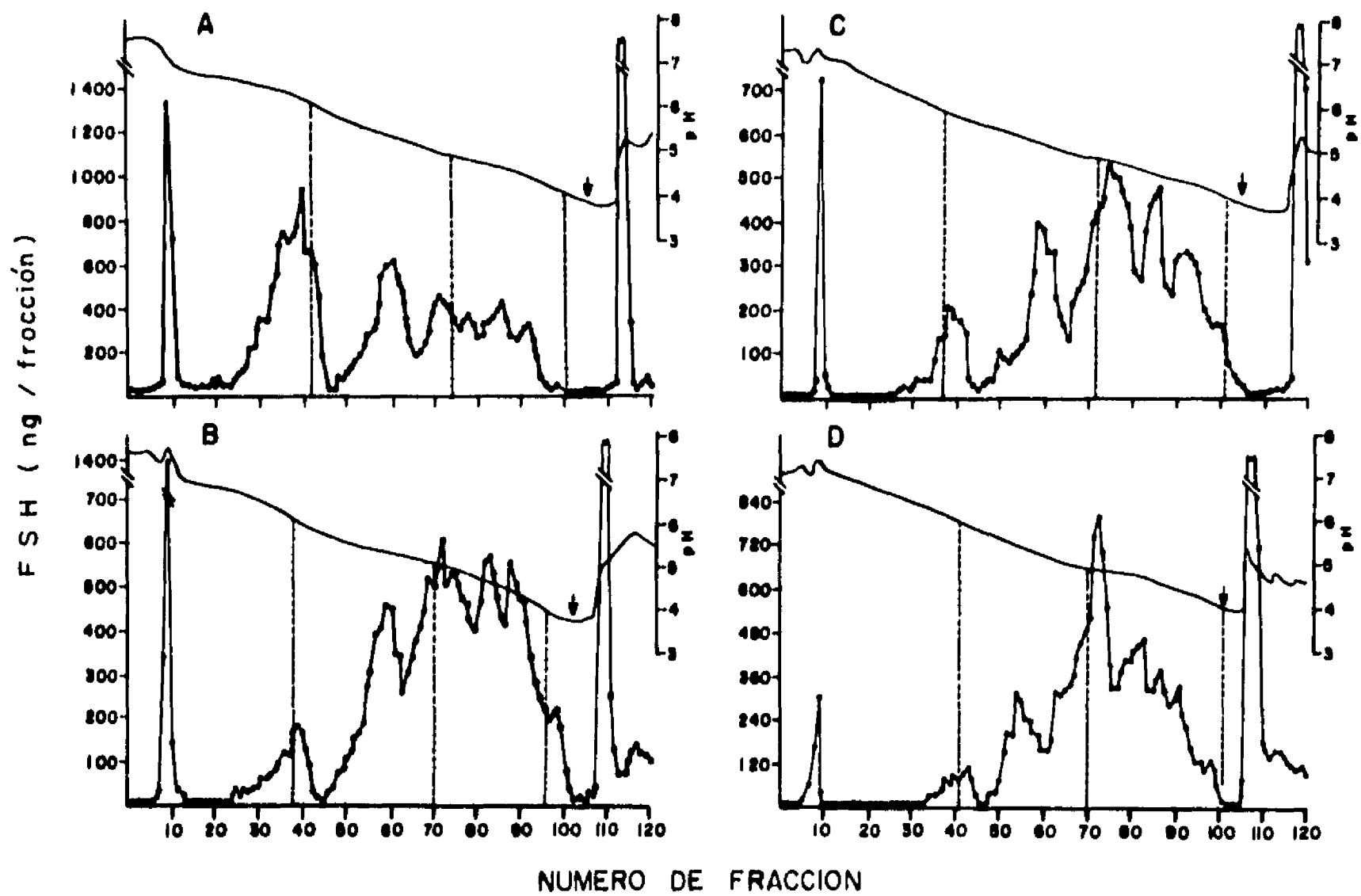


FIGURA 4

Patrones representativos de distribución por pI de la FSH intrahipofisaria después del cromatofoco de extractos de hipófisis anteriores obtenidas de ratas testigo de 90 días de edad, decapitadas durante la mañana de los días del proestro (A), estro (B), diestro 1 (C) y diestro 2 (D). Las flechas indican la adición de 1 mol/l de NaCl a las columnas.

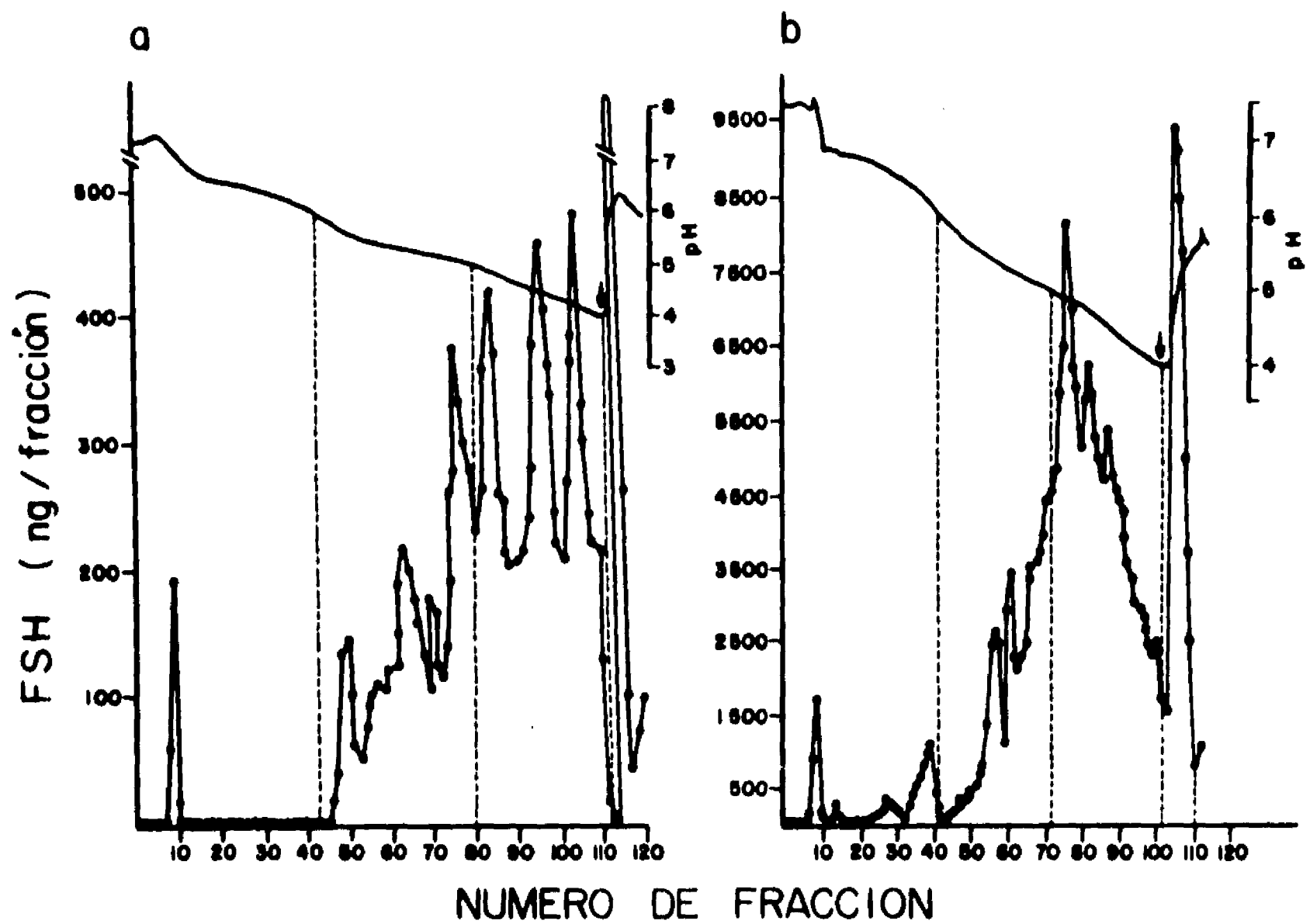


FIGURA 5

Patrones representativos de distribución por pl de la FSH intrahipofisaria después del cromatoenfoco de extractos de hipófisis anteriores obtenidas de hembras adultas androgenizadas durante el periodo neonatal (a) y de ratas adultas macho (b). Las flechas indican la adición de 1 mol/l de NaCl a las columnas.

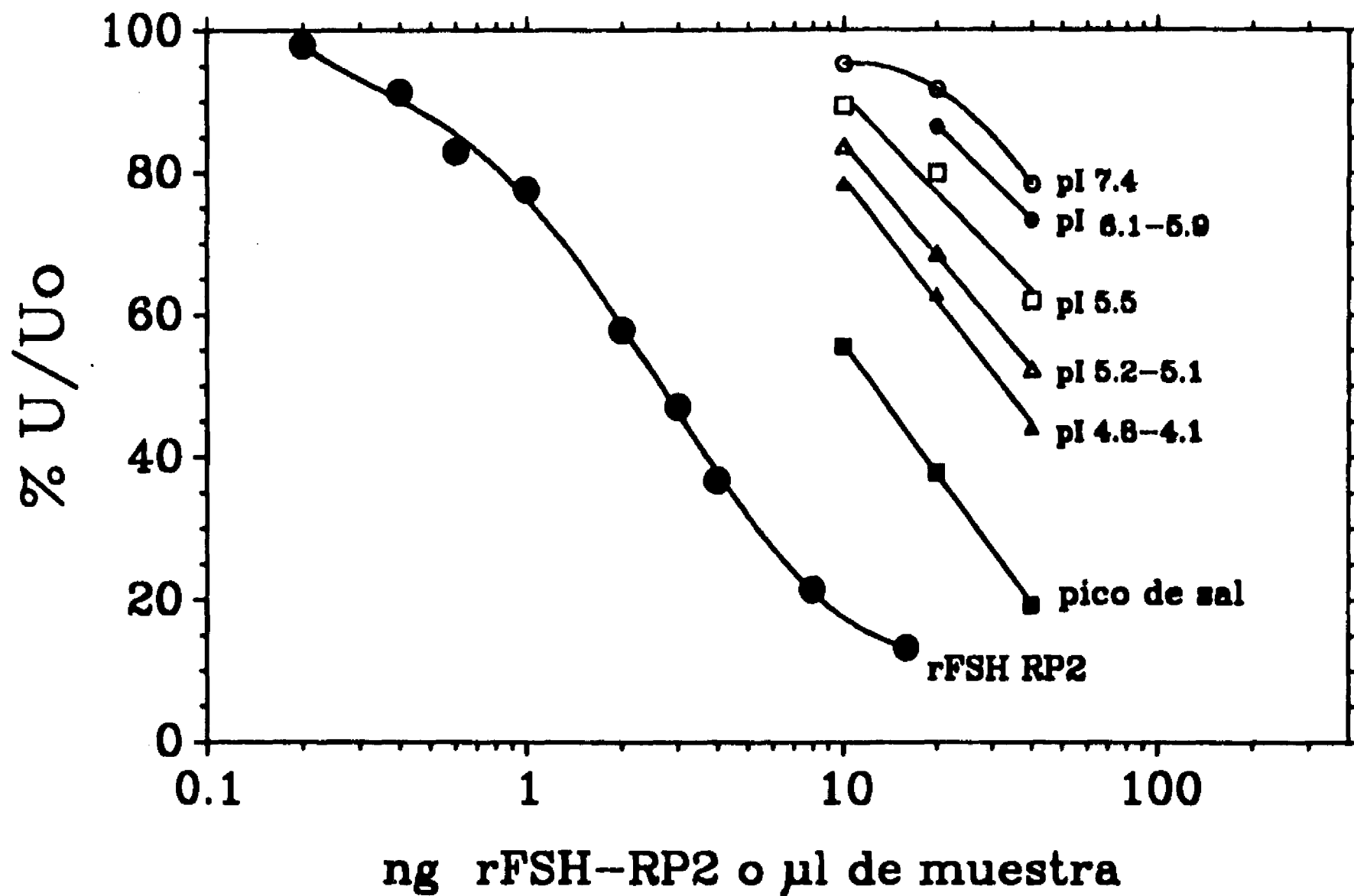


FIGURA 6

Capacidad de cada isohormona mayor o poza de isohormonas menores de FSH para desplazar ^{125}I -FSH del anticuerpo en el sistema de RIA empleado. Las isohormonas de FSH fueron obtenidas después del cromatofoco de extractos hipofisarios de ratas adultas testigo decapitadas en la mañana del proestro (Ver Figura 4). Se encontraron idénticos resultados con el empleo del estándar RP-1.

el grupo testigo que en el androgenizado ($p < 0.01$) (Tabla 1). Por el contrario, la cantidad de la FSH recuperada en las regiones más ácidas ($pH < 4.9$) fue mayor en las ratas tratadas con PT ($p < 0.01$).

En los animales adultos (de 90 días de edad), los patrones de distribución por CF de la FSH intrahipofisaria variaron dependiendo del día específico del ciclo y de la exposición a testosterona durante el periodo neonatal. Todas las hembras adultas androgenizadas neonatalmente presentaban estro vaginal persistente el día de su decapitación. Como se muestra en la Figura 4 y en la Tabla 2, los extractos hipofisarios de las ratas testigo decapitadas durante la mañana del día del proestro y del estro, presentaron mayores cantidades de la FSH inmunoreactiva dentro de los valores de pH de 5.9-5.0 (area 2) que los animales decapitados la mañana del diestro 2 y los androgenizados (Figura 5), en los cuales la mayoría de la FSH fue recuperada en la región con pls de 4.9-4.0 y el pico del sal (>87% del total de la FSH recuperado). Las hipófisis anteriores obtenidas el día del proestro y del estro, contenían las proporciones más altas de la FSH alcalina, la cual enfocó en pls de 7.5-6.0 (Tabla 2 y

Figura 4); el patrón de cromatoenfoco de las ratas androgenizadas se caracterizó por mostrar no más de un pico de la FSH en esta región alcalina (Figura 5). Por lo tanto, el desarrollo sexual y la adquisición de competencia reproductiva en los testigos, se asoció con un incremento en las proporciones relativas de moléculas de la FSH con valores de pl menos ácidos; este incremento fisiológico hacia la producción de formas de la FSH más básicas y con mayor actividad biológica de la FSH (vide infra), fue parcialmente inhibido por la administración de testosterona durante el periodo neonatal.

La FSH intrahipofisaria de los animales machos adultos enfocó predominantemente en la región con pl de 4.9-4.0 ($52.4 \pm 1.2\%$ del total recuperado; $\bar{X} \pm EE$) (Figura 5), en tanto que únicamente $23.4 \pm 2.2\%$ de la FSH intrahipofisaria total proveniente de los animales adultos androgenizados, fue recuperada dentro de este gradiente de pH ($p < 0.01$) (Tabla 2). Sin embargo, la cantidad de la FSH recuperada dentro del pico de sal fue mayor en las hembras androgenizadas que en los machos intactos ($64.7 \pm 4.0\%$ vs 33.1 ± 2.4 , $p < 0.01$). Las proporciones de la FSH recuperadas dentro de regiones menos

ácidas (pH 7.5-5.0), fue similar en ambos grupos.

Cromatografía en Sefadex G-100 de las isohormonas de la FSH:

Con el objeto de investigar si las isohormonas de la FSH obtenidas por CF correspondían a dímeros de subunidades α y β , todas las isohormonas posibles presentes en extractos de hembras adultas castradas (Figura 7A), fueron concentradas en 7 pozas y posteriormente cromatografiadas a través de Sefadex G-100. Como se muestra en las Figuras 7B a 7H, todos los picos obtenidos por CF eluyeron a través de Sefadex G-100 en proximidad con el estándar de la FSH (peso molecular aparente de 44,000-54,000 en este sistema). En todas las columnas se detectaron cantidades mínimas de la FSH en las fracciones correspondientes a un peso molecular aparente de 21,500; estos pequeños picos de la FSH inmunoreactiva podrían corresponder a subunidades libres detectadas por el sistema de RIA de la FSH empleado en el estudio. Por lo tanto, la mayoría de la Inmunosactividad recuperada en forma de isohormonas de la FSH después de CF correspondió a formas dimericas.

Radioreceptor y bioensayo in vitro de las diferentes isohormonas de la FSH separadas por cromatofoco:

Cada uno de los picos (isohormonas) de la FSH obtenidos después del cromatofoco de extractos de animales decapitados durante la mañana del día del proestro (Figura 4A), fue analizado por RIA y por RRA después de su separación cromatográfica en Sefadex G-100 y de su concentración por liofilización. En ambos sistemas, todas las isohormonas mostraron desplazamiento del trazador en forma paralela al estándar empleado (Figuras 6 y 8). En la Figura 9 se muestran las relaciones RRA:RIA que expresan la actividad de unión de cada isohormona a su receptor. Las isohormonas mayores con pIs de 7.40 y 6.08, mostraron la actividad más alta, en tanto que aquella identificada en el pico de sal resultó ser la menos activa.

En virtud de que la unión al receptor no expresa directamente la activación de los sistemas membranales e intracelulares que conllevan a una respuesta biológica, se llevaron a cabo bioensayos in vitro para analizar la potencia biológica de cada isohormona. En la Figura 10 se muestran los

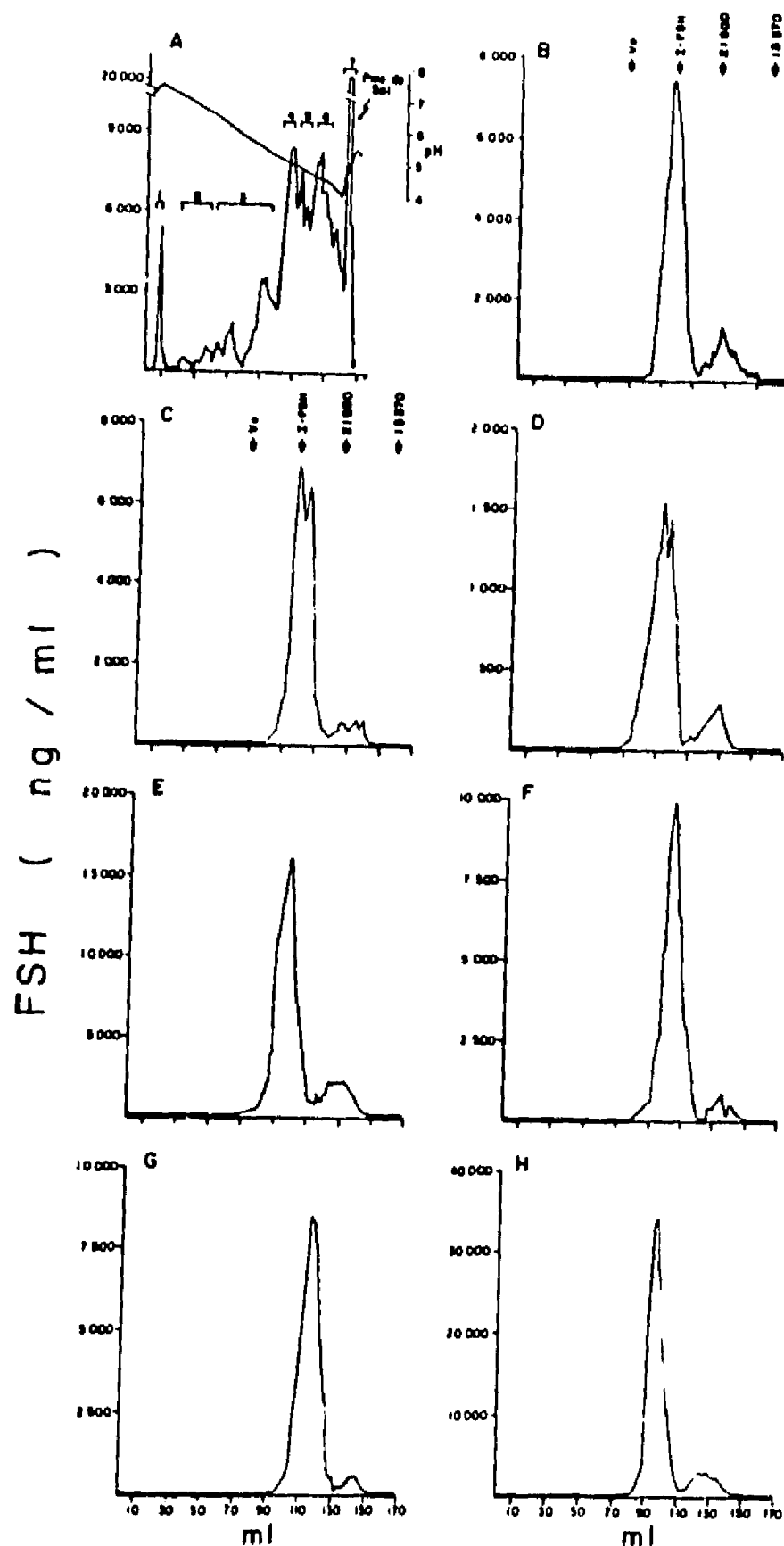


FIGURA 7

Cromatografía por exclusión en Sephadex G-100, de cada pico mayor de FSH o poza de picos menores recuperados después del cromatoenfoco de extractos de hipófisis anteriores de ratas adultas ovariectomizadas. A: Patrón de cromatoenfoco de FSH intrahipofisaria proveniente de ratas ovariectomizadas. Los números sobre cada pico o grupo de picos indican el pico individual o la poza de picos concentrados y cromatografiados: 1, pl 7.36; 2, pls 7.0-6.65; 3, pls 5.90-5.45; 4, pl 5.06; 5, pl 4.86; 6, pl 4.60; 7, pico de sal. B a H: Cromatografía por exclusión de los picos o pozas 1 a 7. Vo= volumen vacío; I-FSH= 125 I-FSH; 21,500 y 13,370 representan los pesos moleculares de la ovalbúmina y el citocromo C respectivamente.

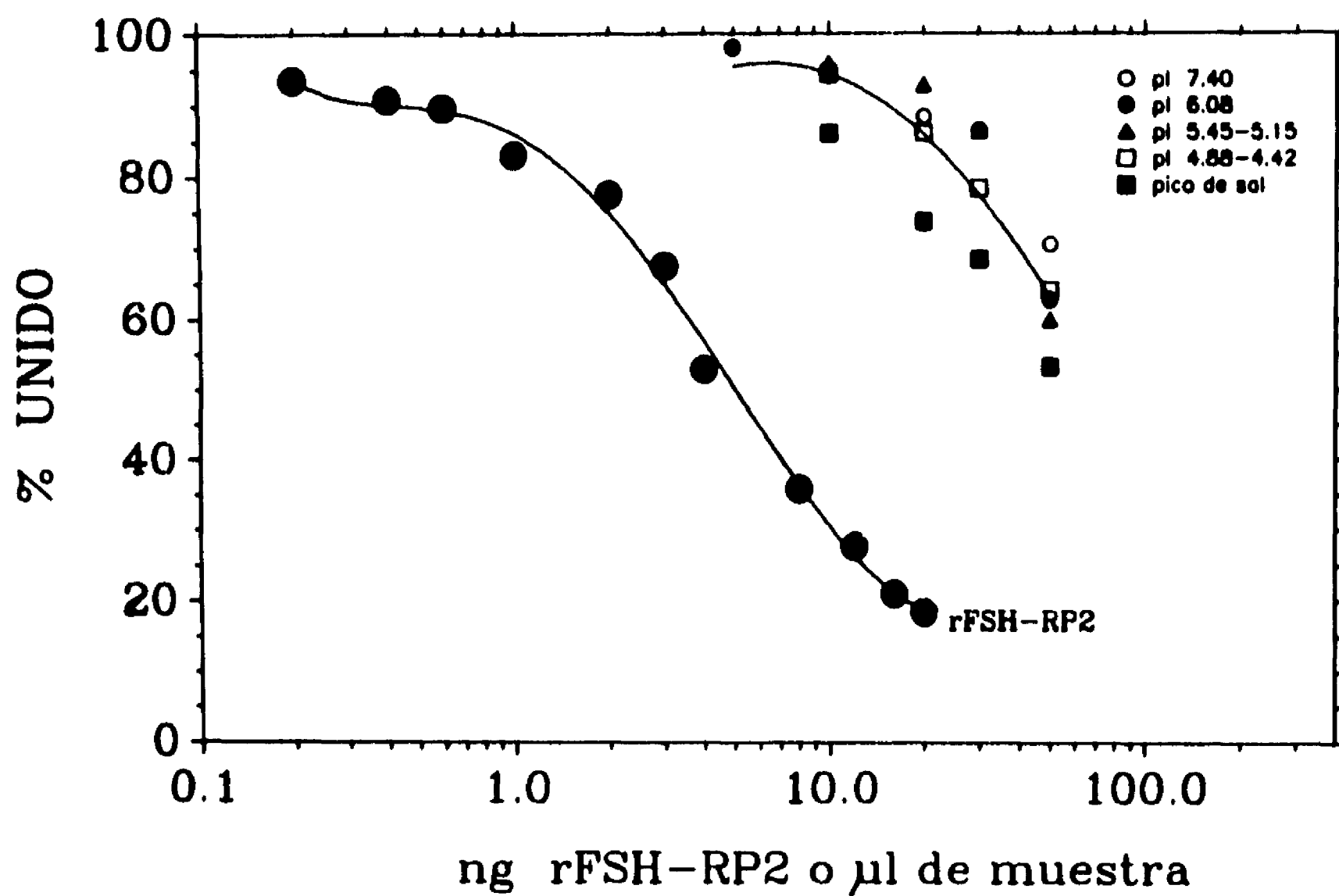


FIGURA 8

Curvas de desplazamiento en el análisis por radioreceptor de cada isohormona mayor o poza de isohormonas menores de FSH obtenidas después del CF de extractos hipofisarios de ratas adultas normales decapitadas durante la mañana del día del proestro (Ver Figura 4).

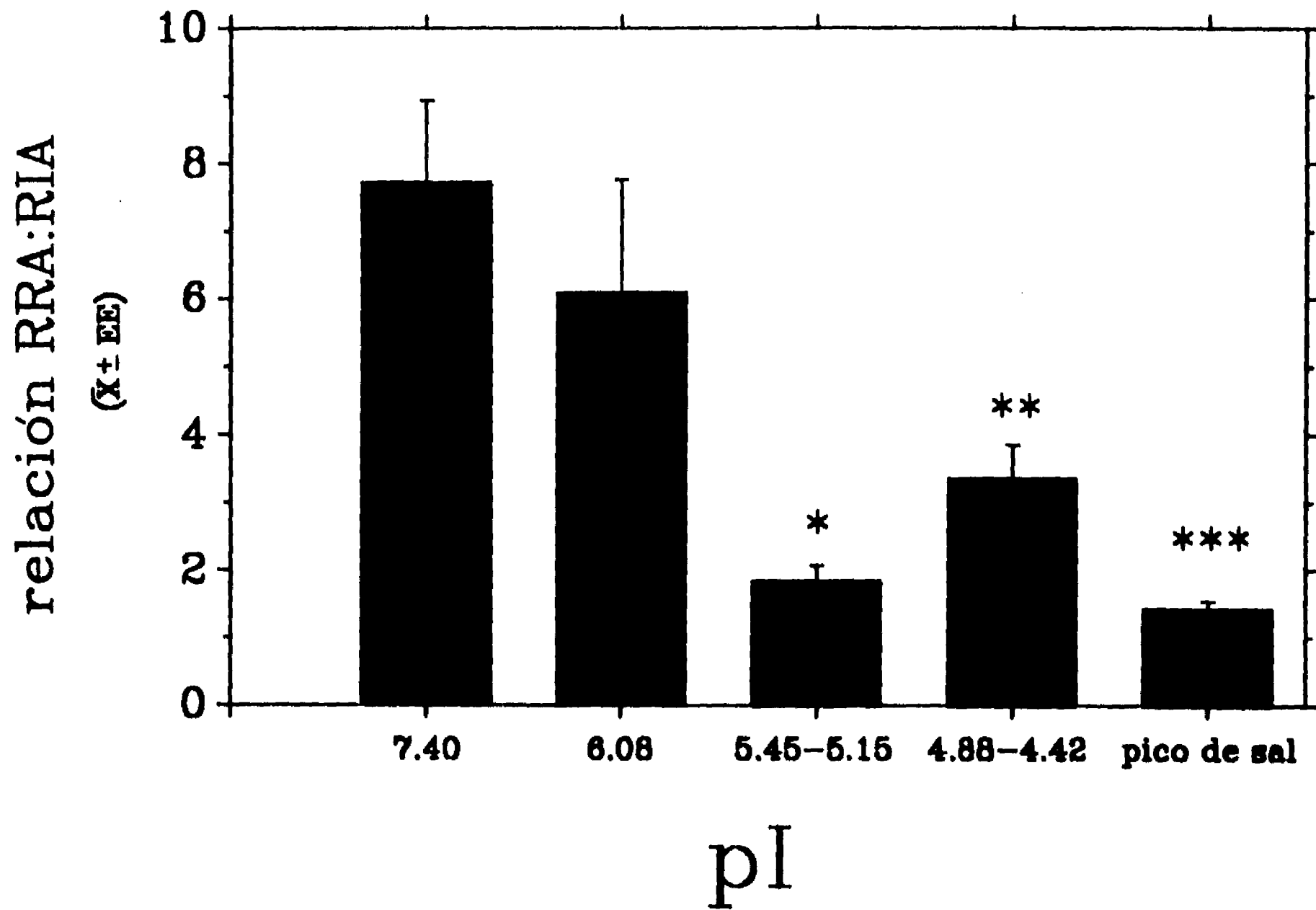


FIGURA 9

Actividad de unión al receptor de cada isohormona mayor o poza de isohormonas menores de FSH obtenidas después del CF de extractos hipofisarios de ratas adultas normales decapitadas durante la mañana del proestro. La actividad es expresada como la relación RRA:RIA y cada valor representa la media ± EE. *, p=0.01 vs pls 7.40, 6.08 y 4.88-4.42; **, p=0.01 vs pls 7.40, 6.08, 5.45-5.15 y pico del sal; ***, p=0.01 vs pls 7.40, 6.08 y 4.88-4.41.

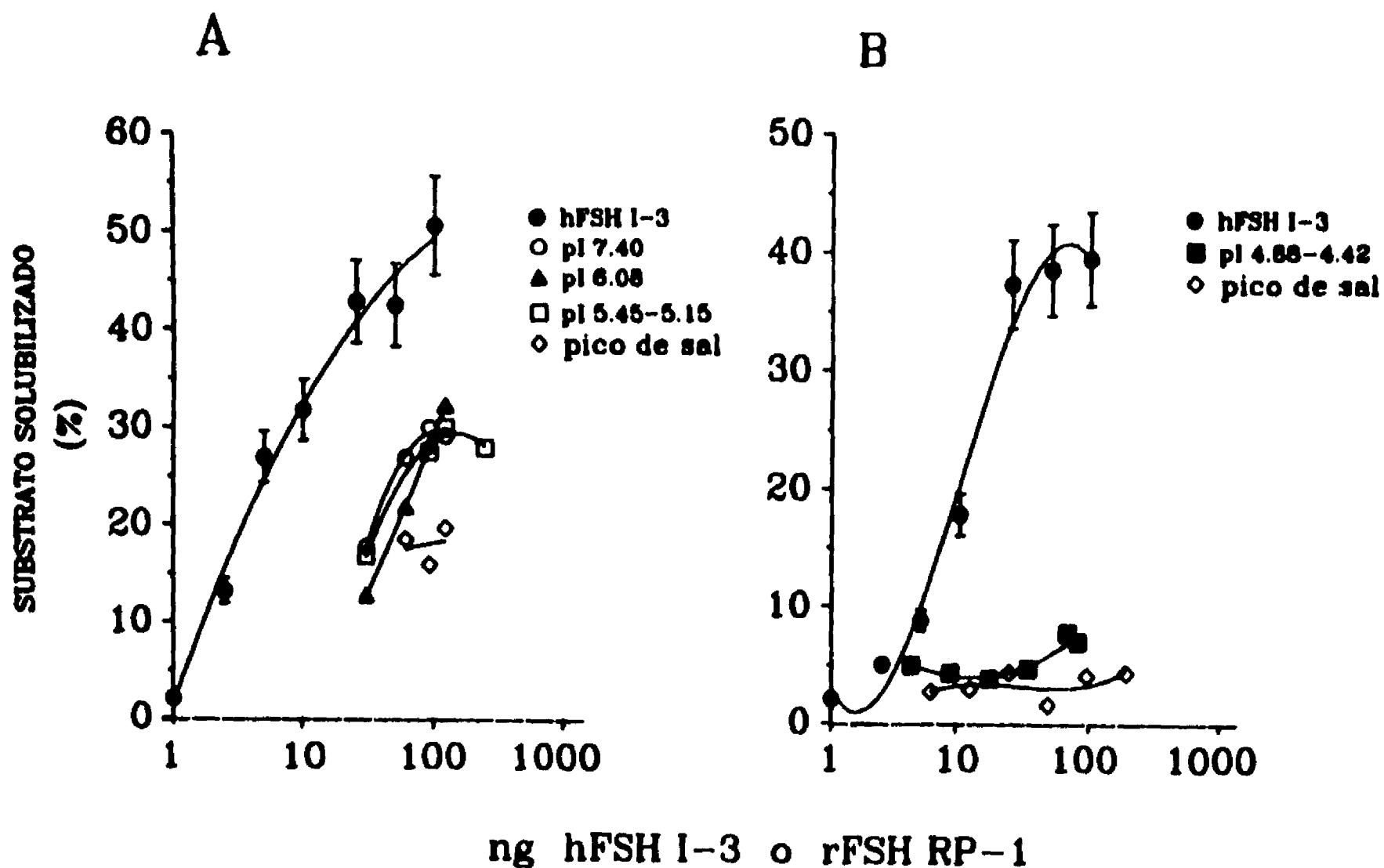


FIGURA 10

A: Capacidad de cada isohormona mayor o poza de isohormonas menores de FSH para estimular la producción del activador del plasminógeno en células de la granulosa cultivadas. La actividad de la poza con pls 4.88-4.42 fue similar a la del pico de sal y no se muestra para una mayor claridad de la figura. Las concentraciones de las diferentes isohormonas se expresan en términos del estándar RP-1 para evitar la sobreposición con la curva estándar (hFSH I-3). **B:** Actividad de la poza con pls 4.88-4.42 y del pico de sal después de la exclusión cromatográfica en Sefadex G-100. Cada valor representa la media de incubaciones por triplicado.

resultados de la capacidad de cada isohormona mayor (o pozas de isohormonas menores) de la FSH para estimular la producción de activador del plasminógeno por células de la granulosa en cultivo. A las dosis analizadas, las isoformas de la FSH con pls de 4.88-4.42 así como el pico de sal mostraron una actividad mínima en este sistema, en tanto que las formas con pls 7.40, 6.08 y 5.45-5.15 exhibieron actividades significativas y paralelas con el estándar hFSH-I-3. Las relaciones B:I para estas tres isohormonas fueron de 3.08 ± 0.24 (pl 7.40), 2.26 ± 0.14 (pl 6.08) y 2.30 ± 0.45 (pl 5.45-5.15) ($p < 0.05$ pl 7.40 vs pls 6.08 y 5.45-5.15).

Diámetro folicular en las ratas testigo y androgenizadas durante el periodo neonatal:

La Tabla 3 muestra el promedio de los folículos medidos en los ovarios de animales testigo y experimentales de 18 a 90 días de edad. Con la excepción del grupo de 18 días, no se detectaron diferencias significativas en la proporción de folículos de 300-500 μm entre los animales testigo y androgenizados de 18 a 60 días de edad. A los 90 días, sin embargo, el porcentaje de folículos $> 500 \mu\text{m}$ fue el doble en los animales androgenizados que en los testigos

(46% vs 19%, $p < 0.05$).

Efectos in vitro de diferentes factores hormonales gonadales e hipotalámico sobre la producción y secreción de las isohormonas de la FSH:

En la figura 11 se muestran las concentraciones de la FSH secretada a los medios de cultivo bajo las diferentes condiciones experimentales. En todas las incubaciones, la adición de GnRH indujo un aumento significativo en la cantidad de la FSH secretada hacia el medio de cultivo en comparación con las incubaciones testigo. En las figuras 12 y 13 se muestran patrones representativos de separación por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida de la FSH secretada *in vitro*, después de la incubación de células de la hipófisis anterior con las diferentes hormonas gonadales e hipotalámica. En todas las condiciones de cultivo estudiadas, se detectaron por lo menos 2 formas mayores de la FSH, tanto en los lisados celulares como en los concentrados del medio de cultivo (la FSH secretada); estas formas mayores y predominantes presentaron pls < 5.5 sin importar las variables introducidas. Únicamente en las incubaciones con GnRH

Tabla 3. Diámetro promedio de los folículos ováricos medidos en los animales testigo y tratados con propionato de testosterona (PT) durante el periodo neonatal. Los valores representan la media \pm E.E. (n=6) y son expresados como el porcentaje de la población folicular medida total.

Edad (días)	Número de folículos (% del total)				
	300-349 μ m	350-399 μ m	400-449 μ m	450-499 μ m	500 μ m
10					
Testigo	100	-	-	-	-
PT	100	-	-	-	-
18					
Testigo	60 \pm 2	40 \pm 4	-	-	-
PT	53 \pm 10	19 \pm 6*	17 \pm 6	9 \pm 4	2 \pm 2
21					
Testigo	52 \pm 8	30 \pm 8	8 \pm 2	8 \pm 2	2 \pm 2
PT	39 \pm 9	25 \pm 5	15 \pm 7	15 \pm 8	5 \pm 3
30					
Testigo	34 \pm 8	15 \pm 4	17 \pm 5	15 \pm 4	18 \pm 6
PT	22 \pm 2	17 \pm 3	20 \pm 4	17 \pm 4	23 \pm 5
60					
Testigo	28 \pm 6	29 \pm 9	10 \pm 4	8 \pm 3	25 \pm 5
PT	26 \pm 4	27 \pm 5	10 \pm 4	5 \pm 2	32 \pm 4
90					
Testigo ⁺	30 \pm 6	19 \pm 3	21 \pm 5	11 \pm 3	19 \pm 5
PT	9 \pm 4*	18 \pm 5	15 \pm 5	12 \pm 5	46 \pm 11*

* $P < 0.05$ Vs Testigo (prueba de t)

+ Día del Estro

CONDICION
EXPERIMENTAL

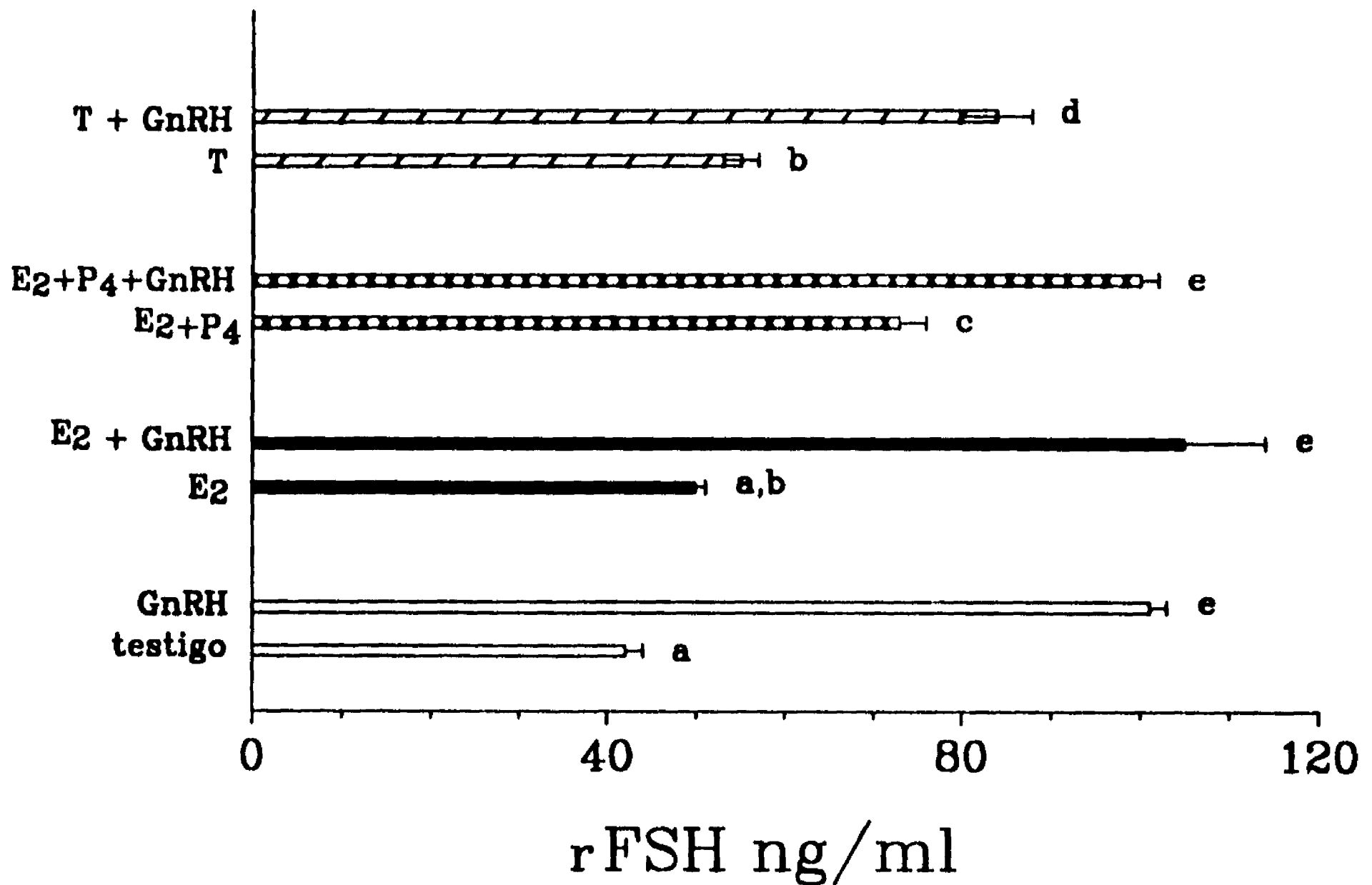


FIGURA 11

Concentraciones de la rFSH secretada por células de la hipófisis anterior en cultivo e incubadas en ausencia (testigo) o presencia de GnRH, estradiol (E₂), estradiol + progesterona (E₂+P₄) y testosterona (T), solos o en diferentes combinaciones. Las concentraciones se expresan como nanogramos de rFSH inmunoreactiva/ml de medio. Las barras indican la media ± error estándar de incubaciones efectuadas por triplicado. Aquellas barras identificadas con diferentes letras indican la existencia de una diferencia significativa (p<0.05) entre ellas.

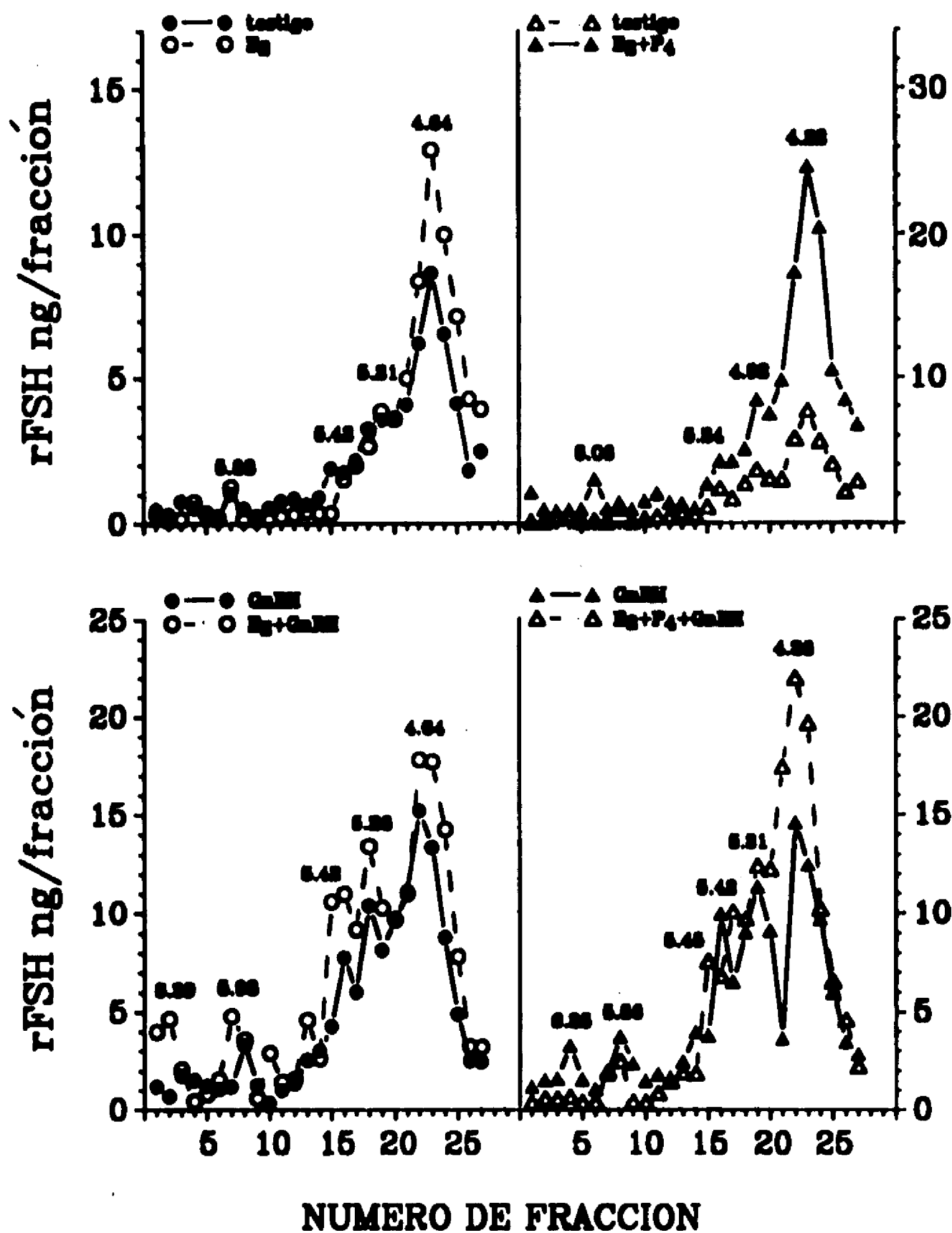


FIGURA 12

Isoelectroenfoco en geles de poliacrilamida con un rango de pH de 4.0 a 6.5, de las isohormonas de FSH secretadas por células de la hipófisis anterior en cultivo e incubadas en presencia o ausencia (testigo) de diferentes esteroides gonadales, de GnRH o de ambos. Los números sobre cada pico de inmunoreactividad de la FSH indican el pI de dicha isohormona. Se obtuvieron resultados similares en 2 cultivos adicionales. E₂= 17β-estradiol; P₄= progesterona.

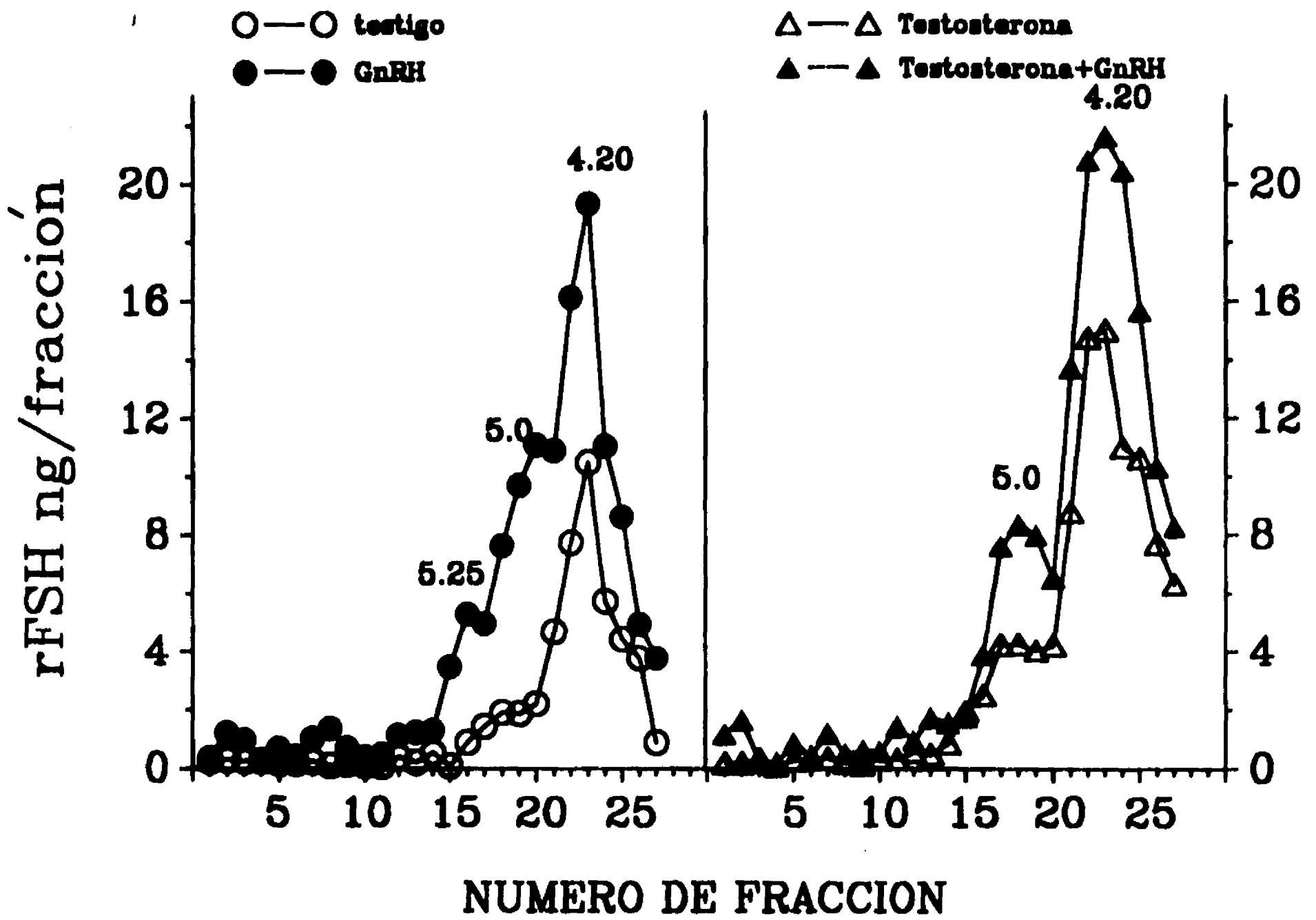


FIGURA 13

Isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida con un rango de pH de 4.0 a 6.5, de las isohormonas de FSH secretadas por células de la hipófisis anterior en cultivo e incubadas en presencia o ausencia (testigo) de testosterona, GnRH y testosterona+GnRH. Los números sobre cada pico de inmunoreactividad de FSH indican el pI de dicha isohormona.

Tabla 4. Cambios en la distribución de pH de la FSH secretada de células de la hipófisis anterior en cultivo incubadas en presencia o ausencia (testigo) de esteroides sexuales, GnRH y esteroides sexuales + GnRH. Los valores representan a la media \pm error estándar de 3 a 5 corridas por grupo.

<u>Tratamiento</u>	<u>FSH por zona (como % del total recuperado)</u>		
	<u>pl 6.5 - 6.0</u>	<u>pl 5.9 - 5.0</u>	<u>pl 4.9 - 4.0</u>
Testigo	5.3 \pm 1.8	32.1 \pm 1.2 ^a	65.6 \pm 1.0 ^{ab}
Estradiol	5.5 \pm 2.8	21.7 \pm 1.9 ^b	72.9 \pm 4.5 ^b
Estradiol+progesterona	3.6 \pm 1.4	19.7 \pm 5.0 ^{ab}	76.6 \pm 8.6 ^b
GnRH	5.8 \pm 0.9	43.2 \pm 2.0 ^c	51.1 \pm 1.4 ^c
Estradiol+GnRH	7.3 \pm 1.6	39.4 \pm 2.5 ^c	53.3 \pm 3.6 ^c
Estradiol+progesterona+GnRH	8.5 \pm 2.8	29.5 \pm 2.9 ^{ab}	61.5 \pm 3.8 ^{abc}

Las medias de los valores identificados por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) (ANOVA y prueba de comparación múltiple de Walker y Duncan)

Tabla 5. Cambios en la distribución de pH de la FSH secretada de células de la hipófisis anterior en cultivo incubadas en presencia o ausencia (testigo) de testosterona, GnRH y testosterona + GnRH. Los valores representan a la media \pm error estándar de 4 a 5 corridas por grupo.

<u>Tratamiento</u>	<u>FSH por zona (como % del total recuperado)</u>		
	<u>pI 6.5 - 6.0</u>	<u>pI 5.9 - 5.0</u>	<u>pI 4.9 - 4.0</u>
Control	2.2 \pm 0.9	13.8 \pm 0.5 ^a	83.9 \pm 1.2 ^a
GnRH	4.3 \pm 2.4	20.7 \pm 1.9 ^b	75.0 \pm 2.4 ^b
Testosterona	1.1 \pm 0.4	12.8 \pm 1.6 ^a	86.0 \pm 1.7 ^a
Testosterona+GnRH	2.2 \pm 0.7	20.2 \pm 1.6 ^b	77.6 \pm 1.8 ^b

Las medias de los valores identificados por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) (ANOVA y prueba de comparación múltiple de Walker y Duncan)

fue posible detectar de manera clara y consistente 2 formas menores secretadas de la FSH con puntos isoelectrónicos >5.5 (pls 6.15-6.35 y 5.9-5.6)(Fig. 12, panel inferior).

Las incubaciones en presencia únicamente de estradiol, testosterona o estradiol+progesterona, mostraron un pico dominante de la FSH secretada con pls de 4.9-4.3, así como una ó dos formas menores con pls de 5.45 a 5.21; estos patrones fueron similares a los obtenidos en condiciones testigo (Figs. 12 y 13). Todos los cultivos que incluyeron GnRH, con excepción de los coincubados en presencia de estradiol+progesterona, mostraron un incremento claro en la abundancia relativa de formas secretadas menos ácidas con pls entre 5.9 y 5.0 (Figs. 12 y 13 y Tablas 4 y 5); la adición de progesterona a los cultivos con estrógenos +GnRH, inhibió estos incrementos (Figura 12, panel inferior y Tabla 4). El patrón de distribución por IEF de la FSH Intrahipofisaria presente en los lisados celulares, fue similar a los de la FSH secretada en su grupo de incubación correspondiente, con 2 excepciones: 1. la cantidad intracelular de la FSH inmunoreactiva detectada en los lisados de células expuestas a GnRH fue mínima posiblemente por depleción secundaria a la

acción prolongada del péptido; 2. La hormona intracelular fue discretamente más ácida que la secretada.

DISCUSION

Los resultados de esta investigación extienden estudios previos de fraccionamiento de la FSH Intrahipofisaria que emplearon gradientes de pH cercanos (6.0-4.0) como técnica de separación (14). En esos estudios, Chappel y cols (14) detectaron que en las hipófisis anteriores de ratas hembra inmaduras decapitadas antes del día de la apertura vaginal, la mayoría de la Inmunoactividad de la FSH migraba dentro de las regiones más ácidas del gel (4.2-3.8); no se observaron modificaciones importantes en su patrón de distribución por pl sino hasta el día de la apertura vaginal, momento durante el cual se incrementó significativamente el porcentaje de formas de la FSH con alta capacidad de unión al receptor y pls de 6.0 a 5.0. Estos autores no detectaron diferencias entre los patrones de electroenfoque de la FSH de ratas decapitadas durante el día de la apertura vaginal y las decapitadas en la mañana (08:00 h) del día del proestro.

En el presente estudio, empleando una ventana de pH más amplia, fue posible identificar tanto en los testigos como en los animales androgenizados, desviaciones significativas más tempranas (a los 18 días de edad) en el pl de la FSH intrahipofisaria hacia regiones menos ácidas. Aún cuando este cambio en la distribución de pH no fue abolido en su totalidad por la administración de testosterona durante el periodo neonatal, la producción de la FSH con pls menos ácidos se presentó de una manera atenuada en las hembras androgenizadas en comparación con los testigos.

En condiciones fisiológicas, la hipófisis anterior de la rata se encuentra expuesta a concentraciones variables tanto de GnRH como de esteroides sexuales (estradiol y progesterona), dependiendo del día específico del ciclo estral (59,60). Los cambios más dramáticos se presentan durante el día del proestro, cuya mañana se caracteriza por presentar incrementos significativos en las concentraciones de estradiol y GnRH, en tanto que entre las 22:00 y 24:00 h es posible detectar aumentos importantes en las concentraciones circulantes de estradiol y progesterona (59). Los incrementos

matutinos en las concentraciones circulantes de estradiol son los responsables, por un mecanismo de retroalimentación positiva, del aumento en la secreción de GnRH hipotalámico, el cual induce en turno la liberación preovulatoria de las gonadotropinas alrededor de las 15:00 h del mismo día (13,18,59).

En ratas adultas normales (de 90 días de edad), el patrón de distribución por CF de la FSH intrahipofisaria se caracterizó por la presencia de un incremento marcado en las cantidades relativas de moléculas de la FSH con alta actividad biológica (pls de 7.5-5.0), particularmente en momentos durante los cuales la glándula hipofisaria se encontró expuesta a altas concentraciones de estrógenos ováricos y de GnRH, o sea, durante la mañana del día del proestro (59,60). Esta observación concuerda con el estudio de Galle y cols. (31) quienes encontraron incrementos significativos en la proporción de formas de la FSH con pls >5.2 en cricetos ovariectomizados expuestos en forma aguda a altas concentraciones de estradiol. Estos mismos investigadores también encontraron que la desviación hacia formas de la FSH más básicas, podía ser abolida mediante la administración de

fenobarbital (el fenobarbital inhibe el pico de secreción de la GnRH hipotalámica inducida por la exposición aguda a altas concentraciones de estradiol), sugiriendo por lo tanto que en condiciones fisiológicas la acción acoplada de estrógenos y GnRH es el factor que determina los tipos específicos de la FSH que serán producidos y secretados por la hipófisis durante momentos fisiológicos específicos.

En los experimentos *in vitro* llevados a cabo en el presente estudio, fuimos capaces de definir que el péptido hipotalámico GnRH es el efector directo responsable de la producción y secreción de moléculas de la FSH con pls menos ácidos y por lo tanto mayores capacidad de unión al receptor y actividad biológica a nivel de la célula blanco; ya que estas moléculas se caracterizan por presentar vida media plasmática corta (*vide infra*), su posible acción en condiciones fisiológicas se limitaría a inducir, junto con la LH, la ruptura folicular y la ovulación. Es posible que la GnRH actúe en el gonadotropo modificando la glicosilación de la FSH a nivel co-ó postraducciona tal y como Liu y Jackson (45) lo han sugerido para LH en sistemas *in vitro*. Nuestros resultados sugieren, así

mismo, que los esteroides sexuales estrógenos y testosterona, no ejercen un efecto directo en la regulación de la heterogeneidad por carga (grado de incorporación de residuos de ácido siálico o de sulfato) de la FSH a nivel hipofisario, sino que lo llevan a cabo indirectamente por modificaciones en la producción de GnRH, en su secreción temporal o en ambas. Fue interesante el encontrar que la inclusión de progesterona en los cultivos con estrógenos +GnRH inhibió el incremento en la producción y secreción de moléculas de la FSH menos ácidas (con pls >5.5 y entre 5.45 y 5.20) observado en las incubaciones con GnRH solo o asociado a estrógenos. Es posible que en condiciones fisiológicas, la presencia de progesterona en concentraciones elevadas [tal y como se observa entre las 22:00 y 24:00 h del proestro (59)], incremente a nivel hipofisario la producción selectiva de moléculas de la FSH predominantemente ácidas, secretables, de vida media larga (*vide infra*) y por lo tanto más adecuadas para una estimulación prolongada sobre el ovario; esta condición sería aparentemente la ideal para el reclutamiento efectivo de nuevos folículos durante la mañana del día del estro.

Los animales adultos androgenizados (machos intactos y hembras adultas tratadas con PT durante el periodo neonatal), presentaron patrones de distribución de la FSH por CF cualitativa y cuantitativamente diferentes a aquellos mostrados por las hembras adultas cíclicas. En los androgenizados se detectó una disminución en la cantidad relativa de formas de la FSH con pls >5.0 y alta potencia biológica; la mayor parte de las moléculas de la FSH intrahipofisarias fueron recuperadas dentro del rango más ácido (pl 4.9-4.0) y en el pico de sal. En virtud de que las ratas adultas con el síndrome anovulatorio inducido por andrógenos presentan concentraciones relativamente elevadas de estradiol como resultado de la aromatización periférica de los andrógenos gonadales (50), debería esperarse que sus glándulas hipofisarias mostraran proporcionalmente formas más básicas de la FSH, como aquellas detectadas en las testigos durante los días del proestro y estro. Esta aparente discrepancia podría ser explicada por la exposición continua, en vez de cíclica, de las hembras androgenizadas a los estrógenos circulantes y por la bien conocida incapacidad del tejido hipotalámico adulto para concentrar y responder a los estrógenos como resultado

de la exposición neonatal a los andrógenos (49-64). En conjunto, los resultados presentados demuestran que un patrón cíclico o "femenino" de secreción gonadal e hipotalámica, induce incrementos temporales en la producción de isoformas menos ácidas de la FSH, las cuales presentan una vida media en la circulación relativamente disminuida por su bajo contenido en ácido siálico (17,33), pero una alta potencia biológica a nivel de su célula blanco (presente tesis, 33). Por el contrario, un sistema de secreción tónico o "masculino", como el que prevalece en machos adultos y hembras androgenizadas, lleva a la hipófisis anterior hacia la producción de moléculas de la FSH fuertemente ácidas, cuyos efectos biológicos están más relacionados a su alto contenido en ácido siálico y vida media plasmática prolongada (17,33).

Fue interesante encontrar que en las hembras adultas androgenizadas, la acumulación de moléculas ácidas de la FSH se correlacionó con un incremento significativo en el porcentaje de folículos >500 μm de diámetro y los cuales podrían representar una condición prequística. El estudio presente, sin embargo, no nos

permite definir claramente si estas moléculas de la FSH de vida media prolongada producidas por la hipófisis de las hembras androgenizadas, es directamente responsable de la formación de los folículos prequísticos o quísticos característicos de este síndrome (47).

Fue notorio que en algunas de las condiciones fisiológicas analizadas, la mayoría de la FSH intrahipofisaria separada por cromatofoco fue recuperada dentro de las fracciones correspondientes al pico de sal. Es probable que este pico de la FSH fuertemente ácido, detectado más allá del límite inferior del gradiente de pH, se encuentre compuesto a su vez por varios componentes imposibles de definir mediante los métodos de cromatofoco disponibles en la actualidad. De hecho, Chappel y cols (16) han demostrado que en hipófisis de monos hembra *Cynomolgus*, este pico de la FSH reúne por lo menos dos isoformas separables por cromatografía de intercambio iónico y que su digestión con neuraminidasa conlleva a la producción de varias de las isoformas de la FSH (con pI 7.0-5.1) detectadas en los extractos crudos de la hipófisis anterior. Es posible que esta forma particular de la FSH, represente a una

familia de precursores de isoformas maduras y secretables de la hormona, considerando particularmente que en el presente estudio comprendió más del 70% del total de la FSH intrahipofisaria recuperada después del cromatofoco de extractos provenientes de los animales más inmaduros (de 5 y 10 días de edad), y menos del 30% de la FSH total identificada en muestras recolectadas durante la mañana del día del proestro, horas antes del pico preovulatorio de la FSH.

La presente caracterización de los patrones de heterogeneidad por carga de la FSH intracelular y secretada durante diferentes condiciones *in vivo* e *in vitro*, indican claramente que esta gonadotropina no es estructuralmente una molécula única, sino más bien un continuo de formas diferentes cuyas características fisicoquímicas y biológicas son reguladas por el patrón particular de secreción gonadal e hipotalámica existente en un momento fisiológico determinado.

CONCLUSIONES

La hipófisis anterior de la rata produce y secreta múltiples formas moleculares de la FSH. La abundancia relativa de cada

isohormona depende del estado fisiológico presente en el animal donador al momento de la recolección de la muestra.

Cada isohormona presenta actividades de unión a su receptor y biológica *in vitro* particulares y que dependen de sus propiedades fisicoquímicas. El presente trabajo confirma y extiende estudios previos que sugieren la existencia de una dicotomía sexual respecto al tipo específico de molécula de la FSH producida y secretada por la hipófisis anterior del roedor. Aún

cuando la acción concertada de los esteroides gonadales y la GnRH determina el tipo predominante de moléculas que serán secretadas en un momento fisiológico específico, es probable que el péptido GnRH sea el efector directo de este fenómeno mediante la inducción de modificaciones en la estructura de los oligosacáridos incorporados a la molécula de la hormona, particularmente a nivel de sus residuos terminales cargados negativamente (ácido siálico, grupos sulfato o ambos).

REFERENCIAS

1. Baenziger JU, Green Ed (1988) Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. **Biochem. Biophys. Acta** 947:287.
2. Pierce JG, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu. Rev. Biochem.** 50:465.
3. Naylor SL, Chin WW, Goodman HM, Calley PA, Grzeschik K-H, Sakaguchi AY (1983) Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. **Somat. Cell. Genet.**, 9:757
4. Godine JE, Chin WW, Habener JF (1980) Luteinizing and follicle-stimulating hormones, cell-free translations of messenger RNAs coding for subunit precursors. **J. Biol. Chem.**, 255:8780.
5. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Chappel SC (1988) Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. **Hum. Reprod.** 3:491.
6. Sherins RJ, Vaitukaitis JL, Chrambach A (1973) Physical characterization of FSH and its desialylation products by isoelectrofocusing and electrophoresis in polyacrylamide gel. **Endocrinology** 92:1135.
7. Chappel SC (1981) The presence of two species of follicle-stimulating hormone within hamster anterior pituitary glands as disclosed by Concanavalin A chromatography. **Endocrinology** 109:935.
8. Chappel SC, Coutifaris C, Jacobs SC (1982) Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. **Endocrinology** 110:847.
9. Zaidi AA, Froyss B, Diezfalusy E (1982) Biological and immunological properties of different molecular species of human follicle-stimulating hormone: electrofocusing profiles of eight highly purified preparations. **J. Endocrinol.** 92:195.
10. Wide L. (1982) Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 55:682.
11. Robertson DM, Foulds LM, Ellis S (1982) Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. **Endocrinology** 111:385.
12. Ulloa-Aguirre A, Chappel SC (1982) Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. **J. Endocrinol.** 95:257.
13. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C (1983) Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. **Endocrine Rev.** 4:179.
14. Chappel SC, Ulloa-Aguirre A, Ramaley J (1983) Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. **Biol. Reprod.** 28:196.
15. Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C, Chappel SC (1983) Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. **Acta Endocrinol.** 102:343.
16. Chappel SC, Bethea CL, Spies HG (1984) Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. **Endocrinology**, 115:452.
17. Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L.

Chappel SC (1984) Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol. Reprod.* 30:382.

18. Ulloa-Aguirre A, Torra E, Dominguez R, Scherpbier R, Larrea F. (1985) Effects of oestradiol-17 β and LRH upon the two fractions of pituitary follicle-stimulating hormone separated by concanavalin-A chromatography. *Acta Endocrinol.* 110:475.

19. Cameron JL, Chappel SC (1985) Follicle-stimulating hormone within and secreted from anterior pituitaries of female golden hamsters during the estrous cycle and after ovariectomy. *Biol. Reprod.* 33:132.

20. Wide L (1985) Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinol.* 109:181.

21. Wide L (1985) Median charge and charge heterogeneity of pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol.* 109:190.

22. Chappel SC, Bashey HM, Snyder PJ (1986) Similar isoelectric profiles of FSH from gonadotroph cell adenomas and non-adenomatous pituitaries. *Acta Endocrinol.* 113:311.

23. Wide L (1986) The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. *Acta Endocrinol.* 112:336.

24. Wide L, Hobson B (1986) Influence of the assay method used on the selection of the most active forms of FSH from the human pituitary. *Acta Endocrinol.* 113:17.

25. Ulloa-Aguirre A, Mejia J.J, Dominguez R, Guevara-Aguirre J, Diaz-Sanchez V, Larrea F (1986) Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J. Endocrinol.* 110:539.

26. Ulloa-Aguirre A, Espinoza R,

Damian-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Dominguez R (1988) Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 38:70.

27. Wide L, Hobson BM (1983) Qualitative difference in follicle-stimulating hormone activity in pituitaries from young women compared to that of men and elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:371.

28. Blum W, Gupta D (1980) Age and sex-dependent nature of the polymorphic forms of rat pituitary FSH: the role of glycosylation. *Neuroendocrinol. Lett.* 2:357.

29. Bogdanove EM, Campbell GT, Peckham WD (1974) FSH pleomorphism in the rat: regulation by gonadal steroids. *Endocrine Res. Commun.* 1:87.

30. Peckham WD, Knobil E. (1976) The effects of ovariectomy, estrogen replacement and neuraminidase treatment on the properties of the adenohypophysial glycoprotein hormones of the Rhesus monkey. *Endocrinology* 98:1054.

31. Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC (1983) Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J. Endocrinol.* 99:31.

32. Blum W, Gupta D (1985) Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *J. Endocrinol.* 105:29.

33. Blum W, 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.

34. Khan SA, Katzija G, Froyss B, Diczfalusy E. (1984) Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone in Baboon pituitary preparations. *J. Med. Primatol.* 13:295.

35. Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J,

Kelch RP, Beitins IZ (1988) Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67:465, 1988.**

36. Miller C, Ulloa-Aguirre A, Hyland L, Chappel S. (1983) Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: Assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil. Steril.* **40:242.**
37. Beers WH, Strickland S. (1978) A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* **253:3877.**

38. Van Damme MP, Robertson DM, Marana R, Ritzén EM, Diczfalussy E (1979) A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle-stimulating hormone activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* **91:224.**

39. Brown PS (1955) The assay of gonadotrophin from urine of nonpregnant human subjects. *J. Endocrinol.*, **13:59.**

40. Wide L, Wide M (1984) Higher disappearance rate in the mouse for pituitary follicle-stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58:426.**

41. Suttajit M, Reichert L, Winzler RJ (1971) Effect of modification of N-acetylneuraminic acid on the biological activity of human and ovine follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* **246:3405.**

42. Dufau ML, Catt KJ, Tsurahara T (1971) Retention of in vitro biological activities by desialylated human luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44:1022.**

43. Vaitukaitis JL, Ross GT (1971) Altered biologic and immunologic activities of progressively desialylated human urinary FSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33:308.**

44. Nwokoro N, Chen H, Chrambach S (1981) Physical, biological and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotropin components separated by gel electrofocusing.

Endocrinology **108:291.**

45. Liu T, Jackson GL (1978) Modification of luteinizing hormone biosynthesis and release by gonadotropin-releasing hormone, cycloheximide and actinomycin D. *Endocrinology* **103:1253.**

46. Barraclough CA (1966) Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **22:503.**

47. Barraclough CA, Gorski RA (1961) Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* **68:68.**

48. Gorski RA (1968) Influence of age on the response to parantatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* **82:1001.**

49. Fierko B, Mess B, Illiel-Donhoffer A (1969) On the mechanism of androgen sterilization. *Neuroendocrinol.*, **4:164.**

50. Ullenbroek JThJ, Arendsen de Wolff-Exalto E, Blankestijn MA (1976) Serum gonadotrophins and follicular development in immature rats after early androgen administration. *J. Endocrinol.* **68:461.**

51. Yen SCC (1980) The polycystic ovarian disease. *Clin. Endocrinol.*, **112:177.**

52. Welschen R (1973) Amounts of gonadotropins required for normal follicular growth in hypophysectomized adult rats. *Acta Endocrinol.* **72:137.**

53. Soderberg L, Laas T, Low D (1982) Chromatofocusing: A new high resolution method for protein fractionation. *Protides Biol. Fluids* **29:955**

54. Bex FJ, Corbin A (1981) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology*, **108:273.**

55. Dufau M, Tsurahara T, Catt KJ (1972)

Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. **Biochem. Biophys. Acta**, **278:281**.

56. Coutifaris C, Chappel SC (1982) Intraventricular injection of follicle-stimulating hormone (FSH) during proestrus stimulates the rise in serum FSH on estrus in phenobarbital-treated hamsters through a central nervous system-dependent mechanism. **Endocrinology** **110:105**.

57. Scott RJ, Burger HG, Quigg H (1980) A simple and rapid in vitro assay for inhibin. **Endocrinology** **107:1536**.

58. Walker RA, Duncan DB (1972) A Bayes rule for the symmetric multiple comparisons problem. **J. Am. Stat. Assoc.** **67: 253**.

59. Shaikh AA, Shaikh SA (1975) Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. **Endocrinology** **96:37**.

60. Sherwood NM, Chiappa SA, Sarkar DK, Fink G (1980) Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrus rats: effects of

anesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. **Endocrinology** **107:14110**.

61. Anderson CH, Greenwald GS (1969) Autoradiographic analysis of estradiol uptake in the brain and pituitary of the female rat. **Endocrinology** **85:1160**.

62. McGuire JL, Lisk RD (1969) Oestrogen receptors in androgen or oestrogen sterilized female rats. **Nature** **221:1068**.

63. Neill JD (1972) Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. **Endocrinology** **90:1154**.

64. Marrone BL, Feder HH (1977) Characteristics of ^3H -estrogen and ^3H -progesterin uptake and effects of progesterone on ^3H -estrogen uptake in brain, anterior pituitary and peripheral tissues of male and female guinea pigs. **Biol. Reprod.** **17:42**.

65. Vale W, Grant G, Amoss M, Blackwell R, Guillemin R (1972) Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method. **Endocrinology**, **91:562**.

Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat

A. Ulloa-Aguirre*, P. Damián-Matsumura*†, R. Espinoza*, R. Dominguez‡, L. Morales‡ and A. Flores‡

*Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Mexico City, Mexico

†Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

‡Laboratory of Human Biology, Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico

RECEIVED 26 September 1989

ABSTRACT

Anterior pituitary glands were removed from neonatally androgenized (100 µg testosterone propionate) female rats and normal controls at 5, 10, 18, 21, 30, 60 and 90 days of age, and the multiple forms of FSH present within them were separated by chromatofocusing (pH range 7.5–4.0). Additional pituitary glands from intact adult males (90 days old) were also studied for comparative purposes. All animal groups exhibited multiple forms of immunoreactive FSH within a pH range of 7.5–4.0, as well as an additional FSH form obtained after the addition of 1.0 mol NaCl/l to the chromatofocusing column (salt peak). In animals 5–30 days old (controls and androgenized) the majority of FSH applied to the chromatofocusing columns was recovered within the salt peak (45–85% of total FSH immunoreactivity recovered). However, as the animals aged, more FSH immunoreactivity focused within less acidic regions (isoelectric point (pI) 5.9–5.0); pituitaries from animals 60 days old contained the greatest proportion of FSH focused within this pH range (controls, $39.2 \pm 0.6\%$; androgenized, $23.1 \pm 0.9\%$ of total immunoreactivity recovered; $P < 0.03$ vs animals 30 days old for both experimental groups). This shift towards less acidic FSH was attenuated in androgenized animals compared with the controls ($P < 0.01$).

In control adult rats, the chromatofocusing distribution pattern of pituitary FSH varied according to the day of the oestrous cycle. Pituitary extracts from control rats decapitated during the morning of pro-oestrus, oestrus and day 1 of dioestrus exhibited the highest proportion of immunoreactive FSH

(23.2–28.8% of total) focused within a pH range of 5.9–5.0, whilst only 10.4–11.6% of FSH from androgenized rats and those on day 1 of dioestrus was recovered within this pH range ($P < 0.05$). In control animals decapitated during the morning of pro-oestrus and oestrus, 10–26% of FSH focused within the most alkaline region (pI 7.5–6.0); the chromatofocusing pattern of pituitary FSH from the neonatally androgenized animals was characteristic, in that no more than one peak ($1.5 \pm 0.5\%$ of total) was detected in this alkaline region. In the adult male rats, the majority of pituitary FSH eluted from the chromatofocusing columns within a pH of 4.9–4.0 ($52.4 \pm 1.2\%$ of total FSH immunoreactivity) and the salt peak (pH < 4.0) (33.1 ± 2.4 of total). All FSH isoforms obtained after chromatofocusing represented α and β dimers as disclosed by size exclusion chromatography.

The results strongly suggest that a cyclic or 'female' pattern of hypothalamic and gonadal secretion leads the anterior pituitary towards the production of less acidic FSH isoforms, whereas a tonic or 'androgenic' type of secretion, as that present in adult males and females with the androgen-induced anovulatory syndrome, leads more to the production of strongly acidic FSH isoforms. The finding of qualitative and quantitative differences among normally cycling and androgenized animals gives further support for the concept of the existence of a sexual dichotomy in terms of the type of FSH synthesized by the anterior pituitary gland.

Journal of Endocrinology (1990) **126**, 323–332

INTRODUCTION

Follicle-stimulating hormone (FSH) exists in multiple molecular forms or species within the anterior

pituitary gland and serum of several animal species (Chappel, Coutifaris & Jacobs, 1982; Robertson, Foulds & Ellis, 1982; Chappel, Bethea & Spies, 1984; Khan, Katzija, Froysa & Diczfalusy, 1984; Wide,

1985; Keel & Schanbacher, 1987). The number and relative abundance of each FSH species depends upon the specific separation technique utilized, the source of tissue (pituitary or serum), the sex and the endocrine environment present in the donor animal at the time of collection of the tissue or sample (Blum & Gupta, 1980; Robertson *et al.* 1982; Chappel, Ulloa-Aguirre & Ramaley, 1983; Ulloa-Aguirre, Torra, Dominguez *et al.* 1985; Ulloa-Aguirre, Espinoza, Damián-Matsumura *et al.* 1988a). Separation of intrapituitary FSH by isoelectric focusing has disclosed the existence of at least six FSH forms with isoelectric points (pI values) ranging from 6.2 to 3.5 (Chappel *et al.* 1983; Ulloa-Aguirre *et al.* 1988a). Anterior pituitary glands obtained from animals cyclically exposed to an oestrogen-enriched environment exhibit larger proportions of forms with more basic pI values (Galle, Ulloa-Aguirre & Chappel, 1983; Chappel *et al.* 1983, 1984; Ulloa-Aguirre *et al.* 1988a), whilst glands from animals continuously exposed to androgens have more acidic FSH forms (Ulloa-Aguirre & Chappel, 1982; Ulloa-Aguirre, Mejia, Dominguez *et al.* 1986). These findings have led us to suggest the existence of a sexual dichotomy in the type of the FSH molecule synthesized and eventually secreted by the anterior pituitary gland (Ulloa-Aguirre, Espinoza, Damián-Matsumura & Chappel, 1988b).

In the present study we have further explored this concept using, as an experimental model, the neonatally androgenized female rat during the transition from sexual immaturity to adulthood. FSH from androgen-treated rats was fractionated by chromatofocusing, and the distribution of the different FSH components so separated was determined and compared with that of normal controls.

MATERIALS AND METHODS

Pregnant female rats of the CII Z-V strain from our own laboratory (Ulloa-Aguirre *et al.* 1985) were maintained in individual cages under light-controlled conditions (lights on from 05.00 to 19.00 h). Female pups were injected s.c. on day 1 of life (day of birth) with either 100 µg testosterone propionate (TP; Shering Mexicana, Mexico) or vehicle (controls). They were decapitated in groups of at least ten animals at 5, 10, 18, 21, 30, 60 and 90 days of age, and the anterior pituitaries dissected free from the posterior pituitary. In this particular strain of rats, vaginal opening normally occurs at 42 ± 1.5 days of age; regular oestrous cycles can be detected only in those animals older than 70 ± 1 days. Anterior pituitaries from adult control rats (90 days of age) were obtained between 09.00 and 10.00 h on each day of the oestrous cycle; only those

animals which had shown three consecutive 4-day cycles were included. Additional pituitary glands from intact adult males (90 days old) were also obtained for comparative purposes. Glands were individually weighed and homogenized at 4 °C with ten strokes of a Teflon pestle in 100 µl phosphate (0.05 mol/l)-buffered physiological (0.15 mol/l) saline (PBS; pH 7.5) containing the protease inhibitor phenylmethylsulphonyl-fluoride (0.3 mg/ml; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.). The anterior pituitary homogenate was centrifuged at 1000g for 30 min at 4 °C, and the supernatant fraction (anterior pituitary extract) removed, divided into samples in separate vials and stored frozen at -20 °C until the day of chromatofocusing. Ovaries were dissected, weighed, fixed in Bouin's fluid and embedded in paraffin wax. Serial sections (10 µm thick) were stained with haematoxylin and eosin and the follicular volume was recorded according to the method of Welschen (1973).

Chromatofocusing of anterior pituitary extracts

Polybuffer-74 and polybuffer exchange resin (PBE-94) were purchased from Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, U.S.A. A column of PBE-94 was constructed with dimensions of 30 × 1 cm and equilibrated with 15 bed volumes starting buffer (0.025 mol imidazole-HCl/l, pH 7.4). Thereafter, a pool (six to seven individual pituitary extracts per group) of anterior pituitary extracts which had been equilibrated with eluent buffer (1:8 dilution of Polybuffer 74 in deionized water, pH 4.0) by chromatography in Sephadex G-25 (microcolumns of 6.7 × 0.6 cm; Pharmacia Fine Chemicals) was applied on the top of the column. Eluent buffer (5 ml) was run before sample application to avoid exposure of the sample proteins to extremes of pH. Between 110 and 130 fractions (2 ml) were collected at a flow rate of 1 ml/4 min at 4 °C. The pH of each fraction was measured and, when the column eluent reached pH 4.0, the eluent buffer was then changed to a solution of NaCl (1 mol/l) to displace any material which failed to elute within the pH range of 7.5-4.0 (salt peak). Each fraction was stored frozen at -20 °C until the day of radioimmunoassay (RIA) of FSH. A total of three or four anterior pituitary FSH pools per group were chromatofocused separately in duplicate columns. Recoveries of FSH by this method were 76 ± 4% of the total amount originally applied to the column.

Sephadex G-100 chromatography of each anterior pituitary FSH species

After determination of the FSH content of each fraction obtained after chromatofocusing of a pool of pituitary extracts from adult ovariectomized rats

(120 days old, ovariectomized at 90 days of age), fractions containing the greatest concentrations of each FSH form were dialysed against 0.01 mol ammonium carbonate/l (pH 7.5) and freeze-dried. Each FSH form or pool of forms were redissolved in a small volume of 0.05 mol PBS/l containing 1% (w/v) bovine serum albumin (Sigma; PBS-BSA) and then chromatographed across a Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) column (57 × 2.7 cm) which had been previously calibrated with blue dextran (Sigma; M_r 2 000 000), BSA (Sigma; M_r 67 000), ^{125}I -labelled rat FSH-I-6 (NIDDK, Bethesda, MD, U.S.A.; M_r 32 000), ovalbumin (Sigma; M_r 43 000), trypsin inhibitor (Sigma; M_r 21 500) and cytochrome C (Sigma; M_r 13 370). The column eluent was PBS-BSA and the flow rate 7 ml/h at 4 °C. All fractions (1 ml each) were stored frozen until measurement of FSH content by RIA.

RIA of FSH

Purified rat FSH (NIDDK rat FSH-I-6) was iodinated by the lactoperoxidase-glucose oxidase method as described by Bex & Corbin (1981). Following separation of protein-bound and free ^{125}I by Sephadex G-100 column chromatography, ^{125}I -labelled FSH was further purified by Concanavalin A chromatography (Pharmacia Fine Chemicals) as described by Dufau, Tsurahara & Catt (1972). The RIA of FSH was performed using the rat RIA kit provided by the NIDDK as previously reported (Coutifaris & Chappel, 1982); the reference preparation employed to construct the standard curve was either rat FSH-RP-1 or rat FSH-RP-2 (NIDDK). The latter preparation is 45 times more potent than the former. Results are expressed as ng or μg rat FSH-RP-1 standard (NIDDK) unless specified. To avoid interassay variations, all samples from a single column were included in the same batch. Intra-assay variability for this RIA system was 7% and the sensitivity was 4–8 ng/tube.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (for $n > 3$), the Walker-Duncan multiple comparison test (Walker & Duncan, 1972), and the unpaired *t*-test (for $n = 2$) were used (after log transformation of each value to yield normally distributed groups) to analyse differences between groups. Regression analysis and *t*-test were performed to determine the degree of correlation between the amount of FSH recovered within a specific pH range and the age of the donor animal. Student's *t*-test for unpaired samples was used to compare differences among the slopes from the RIA of FSH generated by the FSH standard and the several FSH peaks obtained by chromatofocusing.

RESULTS

All anterior pituitary pools chromatofocused exhibited several distinct peaks of FSH immunoactivity within a pH range of 7.5–4.0 as well as in those fractions recovered after addition of 1.0 mol NaCl/l to the chromatofocusing columns (salt peak) (Fig. 1). All these FSH peaks displaced ^{125}I -labelled FSH from the antibody in a parallel fashion (Fig. 2). The presence and relative abundance of these FSH peaks varied according to the stage of sexual maturation, the specific day of the oestrous cycle, the sex of the donor animal and the experimental manipulations performed. To quantify differences in the chromatofocusing pattern of FSH among the different animal groups, each chromatofocusing profile was divided into four regions (area 1, pI 7.5–6.0; area 2, pI 5.9–5.0; area 3, pI 4.9–4.0; area 4, pI < 4.0 and the salt peak) and the amount of immunoactive FSH present within each was used for statistical comparisons.

Chromatofocusing patterns of anterior pituitary FSH from 5- to 30-day-old control and TP-treated animals

In 5- to 30-day-old control and experimental groups, the majority of FSH applied to the chromatofocusing column eluted within the salt peak (45–85% of total FSH immunoactivity recovered) and within the pH range of 4.9–4.0 (12–39% of total) (Table 1). The relative amount of FSH recovered within the salt peak (pH < 4.0) progressively decreased as the animals aged ($r = -0.729$, $P < 0.01$, for both the control and TP-treated groups combined); meanwhile, the relative amount of FSH recovered within areas 2 (pI 5.9–5.0) and 3 (pI 4.9–4.0) dramatically increased.

Both the control and TP-treated animals aged 18–30 days exhibited similar chromatofocusing patterns of FSH distribution; there were only slight but significant differences in the relative amounts of FSH recovered within areas 1 and 2 (pI values 7.5–6.0 and 5.9–5.0 respectively) between the 18 day-old control and TP-treated groups (Table 1). Even though the patterns of FSH distribution were apparently different among the youngest (5 and 10 days old) control and androgenized animals, they only differed from each other in the amount of FSH recovered within the pH gradient corresponding to area 2 (pI 5.9–5.9) ($P < 0.01$) in animals 10 days old.

Chromatofocusing patterns of anterior pituitary FSH from 60- and 90-day-old female control, TP-treated and male animals

At 60 and 90 days of age, clear and significant qualitative and quantitative differences were found among the chromatofocusing patterns of pituitary

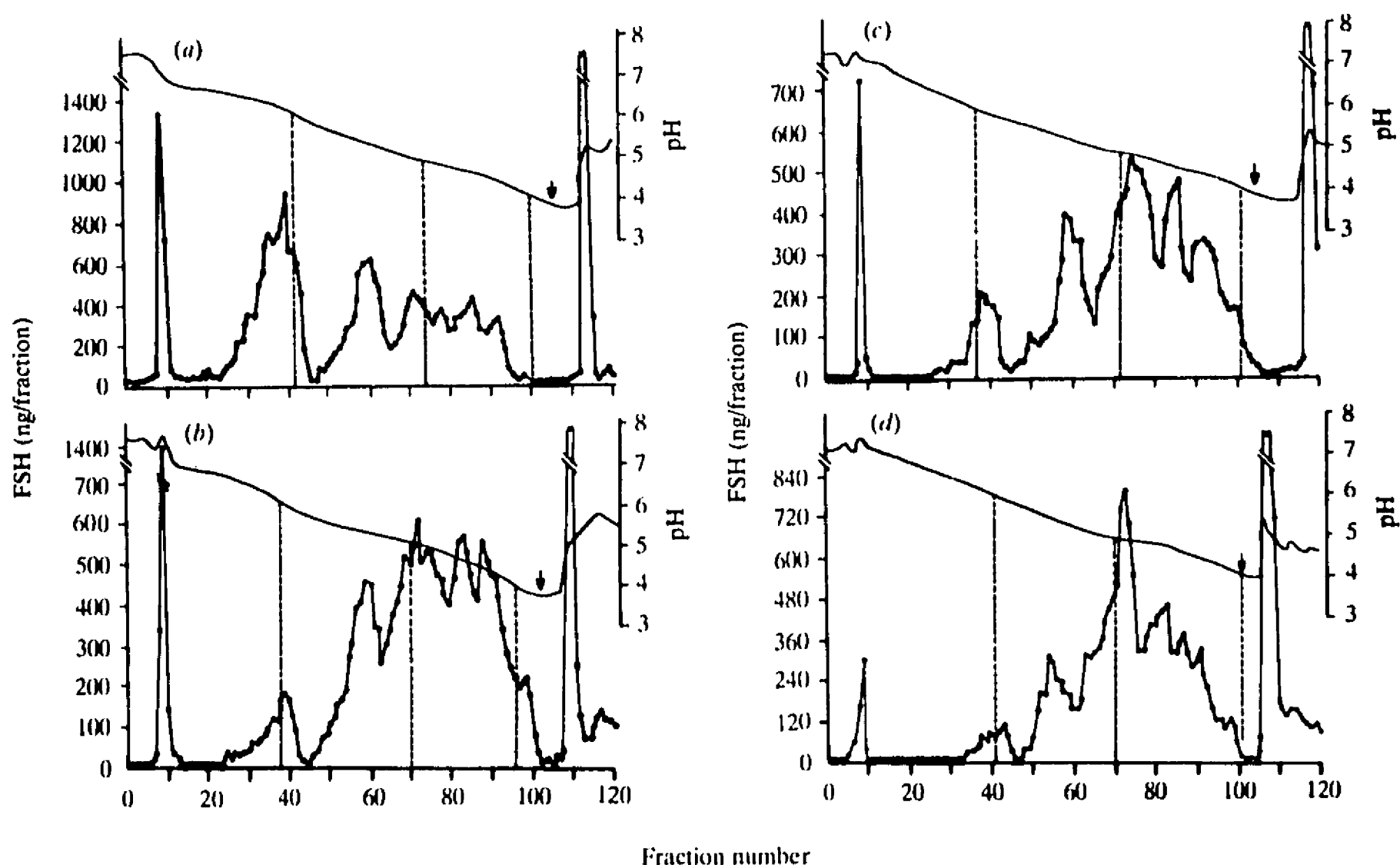


FIGURE 1. Representative profiles of pH distribution of immunoreactive FSH after chromatofocusing of anterior pituitary extracts obtained from 90-day-old control rats decapitated at 09.00–10.00 h on the day of (a) pro-oestrus, (b) oestrus, (c) dioestrus day 1 and (d) dioestrus day 2. Vertical broken lines delineate four pH regions into which each chromatofocusing distribution was divided for comparisons. The arrows indicate the addition of 1 mol NaCl/l to the chromatofocusing column.

FSH from female control and androgenized animals. Both groups exhibited a significant increment in the amount of FSH recovered within the pH range of 5.9–5.0 at 60 days of age; this increase in less acidic FSH was, however, more pronounced in the control group ($P < 0.01$) (Table 1). In contrast, the amount of FSH recovered in the most acidic regions (pH < 4.9) was higher in the TP-treated animals than in controls ($P < 0.01$). In adult animals (90 days of age), the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH varied according to the day of the cycle and the exposure to testosterone during the neonatal period. All female adult, neonatally androgenized animals presented persistent vaginal oestrus at the time of decapitation. As shown in Fig. 1 and Table 2, extracts from control rats decapitated during the morning of the day of pro-oestrus and oestrus and day of dioestrus exhibited higher amounts of FSH within pI values of 5.9–5.0 (area 2) than extracts from animals on day 2 of dioestrus and in TP-treated animals, in which the majority of FSH was recovered in the pI region 4.9–4.0 and the salt peak (>87% of total

FSH recovered). Furthermore, anterior pituitaries obtained at the day of pro-oestrus and oestrus contained the highest proportion of alkaline FSH which focused at pI values 7.5–6.0 (Table 2; Fig. 1); the chromatofocusing pattern of adult TP-treated rats was characteristic in that no more than one peak was detected in this alkaline region. Thus, as the animals developed sexually and became reproductively competent, a higher proportion of anterior pituitary FSH with less acidic pI values was evident. This shift towards more basic FSH forms was partially prevented by testosterone administration during the neonatal period.

Anterior pituitary FSH from adult intact males mainly focused within the pI region of 4.9–4.0 ($52.4 \pm 1.2\%$ of total FSH recovered; mean \pm S.E.M.), whilst only $23.4 \pm 2.2\%$ of total pituitary FSH from adult TP-treated animals was recovered within this pH gradient ($P < 0.01$) (Table 2). However, the amount of FSH recovered within the salt peak was higher in the androgenized females than in intact males ($64.7 \pm 4.0\%$ vs $33.1 \pm 2.4\%$, $P < 0.01$). No significant

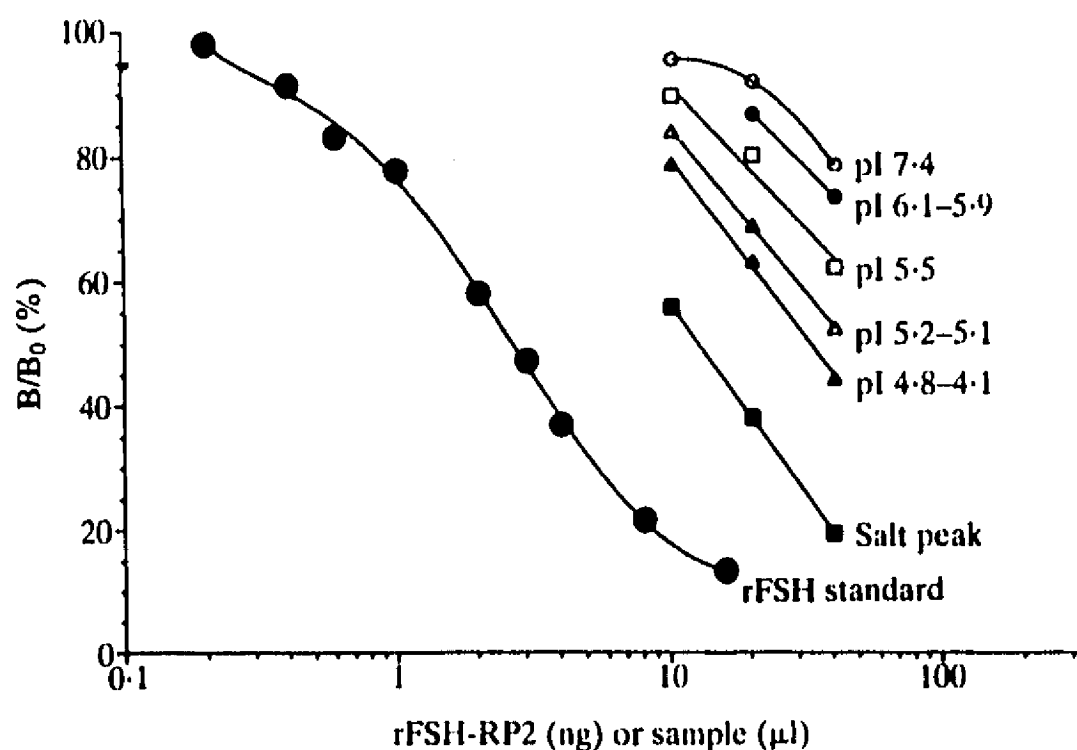


FIGURE 2. The ability of each FSH peak (isoelectric points (pIs) 7.4, 6.1-5.9, 5.5, 5.2-5.1 and 'salt peak') or pool of minor peaks (pI 4.8-4.1) to displace ¹²⁵I-labelled FSH-I-6 in the FSH radioimmunoassay system employed in this study. Peaks of immunoreactive FSH detected after chromatofocusing of pituitary extracts from 90-day-old rats decapitated on the morning of the day of pro-oestrus (see Fig. 1a), were quantitated by radioimmunoassay (RIA) at two to three different dilutions to assess for parallelism with the reference preparation employed in this RIA system. Similar results were obtained when rFSH-RP-1 was used as standard.

TABLE 1. Changes in the distribution of FSH from anterior pituitaries of vehicle- or testosterone propionate (TP)-treated female rats 5-60 days old across a pH gradient. Values are means ± S.E.M. (n = 3 or 4 chromatofocusing columns per group)

Age (days)	FSH per zone (as % of total recovered)							
	pI 7.5-6.0		pI 5.9-5.0		pI 4.9-4.0		pI <4.0	
	Vehicle	TP	Vehicle	TP	Vehicle	TP	Vehicle	TP
5	1.9 ± 1.1 ^{abc}	1.5 ± 0.5 ^{abc}	1.1 ± 0.6 ^a	0.5 ± 0.3 ^a	12.0 ± 1.1 ^a	13.0 ± 1.1 ^a	85.0 ± 2.0 ^a	84.9 ± 2.0 ^a
10	1.2 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.2 ^{ac}	0.07 ± 0.06 ^a	0.9 ± 0.02 ^{a*}	21.0 ± 4.5 ^{ab}	28.5 ± 1.8 ^b	77.7 ± 4.5 ^a	70.0 ± 2.9 ^b
18	3.5 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.1 ^{a*}	22.0 ± 0.9 ^b	14.2 ± 2.0 ^{bb*}	29.7 ± 1.5 ^b	37.0 ± 3.6 ^{cb}	44.8 ± 0.5 ^b	47.1 ± 3.6 ^{cd}
21	0.7 ± 0.1 ^c	0.6 ± 0.2 ^b	15.4 ± 1.5 ^c	10.9 ± 0.3 ^b	35.7 ± 1.4 ^c	38.7 ± 1.4 ^c	48.2 ± 3.0 ^b	49.6 ± 1.4 ^d
30	1.0 ± 0.1 ^{ac}	0.7 ± 0.1 ^b	11.8 ± 1.4 ^c	8.9 ± 1.4 ^b	30.9 ± 0.9 ^b	32.8 ± 0.9 ^b	56.3 ± 1.7 ^c	57.6 ± 2.2 ^c
60	4.1 ± 0.4 ^{bd}	1.1 ± 0.1 ^{c*}	39.2 ± 0.6 ^d	23.1 ± 0.9 ^{c*}	31.0 ± 1.0 ^{bc}	40.0 ± 1.6 ^{c*}	25.7 ± 1.5 ^d	36.0 ± 0.7 ^{e*}

Means identified by different superscript letters in the same column are statistically different ($P < 0.03$) (one-way analysis of variance and Walker-Duncan multiple comparison test); * $P < 0.01$ compared with vehicle in the same pI range (unpaired *t*-test). pI, isoelectric point.

differences were detected among these two groups of animals in the proportion of FSH recovered within less acidic regions (pH 7.5-5.0).

Sephadex G-100 chromatography of FSH species

To investigate whether the FSH species so obtained were α and β dimers, all possible FSH forms present in anterior pituitary extracts from adult ovariectomized

rats (Fig. 3a) were concentrated in seven pools and then chromatographed across Sephadex G-100. As shown in Figs 3b-h, all FSH peaks obtained after chromatofocusing eluted through Sephadex G-100 size exclusion chromatography in close proximity with the FSH standard (apparent M_r 44 000-54 000). In all columns, negligible amounts of FSH were recovered in fractions corresponding to an apparent M_r of 21 500; these small peaks of FSH activity might

TABLE 2. Changes in the distribution of FSH from anterior pituitaries of vehicle- or testosterone propionate (TP)-treated rats 90 days old across a pH gradient. Values are means \pm S.E.M. ($n = 3$ or 4 chromatofocusing columns per group)

Group	FSH per zone (as % of total recovered)			
	pI 7.5-6.0	pI 5.9-5.0	pI 4.9-4.0	pI <4.0
Pro-oestrus	26.5 \pm 1.1 ^a	28.8 \pm 2.0 ^a	17.5 \pm 1.5 ^a	27.1 \pm 1.8 ^a
Oestrus	10.0 \pm 1.5 ^b	25.4 \pm 1.5 ^a	25.2 \pm 1.3 ^b	39.4 \pm 2.6 ^{bd}
Dioestrus day 1	3.3 \pm 0.3 ^c	23.2 \pm 2.6 ^a	24.5 \pm 0.7 ^b	49.0 \pm 2.9 ^b
Dioestrus day 2	1.3 \pm 0.6 ^d	11.6 \pm 0.5 ^b	27.6 \pm 1.1 ^b	59.5 \pm 1.2 ^c
TP	1.5 \pm 0.5 ^{de}	10.4 \pm 2.1 ^b	23.4 \pm 2.2 ^{ab}	64.7 \pm 4.0 ^c
Male	3.0 \pm 0.5 ^{ce}	11.5 \pm 3.2 ^b	52.4 \pm 1.2 ^c	33.1 \pm 2.4 ^{cd}

Means identified by different superscript letters in the same pI range are statistically different ($P < 0.05$) (one-way analysis of variance and Walker-Duncan multiple comparison test). pI, isoelectric point.

correspond to free subunits detected by the FSH RIA system employed. Thus the majority of FSH immunoactivity recovered after chromatofocusing corresponded to dimeric forms of FSH.

Follicular diameter in control and TP-treated rats

Table 3 shows the follicular diameter in 18- to 90-day-old normal control and TP-treated animals. With the exception of the 18-day-old group, there were no significant differences in the proportion of follicles measuring 300–500 μm between the control and androgenized animals aged 18–60 days. At 90 days of age, the percentage of follicles $\geq 500 \mu\text{m}$ was more than twice as high in the androgenized females than in controls (46% vs 19%, $P < 0.05$).

DISCUSSION

The results presented here extend previous FSH fractionation studies using isoelectric focusing in narrow pH gradients (6.0–4.0) as the separation technique (Chappel *et al.* 1983; Ulloa-Aguirre *et al.* 1988a). In these studies, Chappel *et al.* (1983) found that in anterior pituitaries obtained from immature female rats before the day of vaginal opening, the majority of the FSH immunoactivity migrated to the most acidic regions (pI 4.2–3.8) without any change in its pH distribution pattern until the day of vaginal opening, when a significant increase in the percentage of FSH focusing within a pH of 6.0–5.0 occurred; these authors did not detect differences among the isoelectric focusing patterns of FSH from rats decapitated during the day of vaginal opening and the morning (08.00 h) of the day of pro-oestrus. In the present study, employing a wider pH window, we were able to identify significant shifts of pituitary FSH towards less acidic pH regions in both normal and androgenized rats at earlier stages of maturation, e.g.

18 days of age. The finding of a clear-cut increase in the relative amount of FSH recovered within the pI range of 5.9–5.0 in normal mid-postpubertal animals (60 days old) is in agreement with the findings reported by Chappel *et al.* (1983). Even though the occurrence of this shift was not prevented by testosterone administration during the neonatal period, the production of pituitary FSH with less acidic pIs was clearly attenuated in the female androgenized animals compared with the controls.

In normal adult female rats (90 days of age) the chromatofocusing pattern of pituitary FSH was characterized by a marked increase in the relative amounts of FSH focusing at pIs 7.5–5.0, particularly at times when the pituitary gland was exposed to high concentrations of ovarian steroids and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), e.g. the morning of the day of pro-oestrus (Shaikh & Shaikh, 1975; Sherwood, Chiappa, Sarkar & Fink, 1980). This observation is in agreement with the study of Galle *et al.* (1983) who observed significant increments in the proportion of anterior pituitary FSH forms with pIs > 5.2 in ovariectomized hamsters acutely exposed to high concentrations of oestradiol. These authors also found that this shift towards more basic FSH forms could be prevented by phenobarbital administration, thus suggesting that the coupled action of oestrogens and GnRH determines the specific types of FSH produced by the pituitary gland during a specific physiologic time. Our results are also in agreement with those of Chappel *et al.* (1984) who found a steady increase in the relative proportion of the more basic FSH forms in pituitaries from castrated female monkeys exposed to physiological levels of oestradiol and progesterone during periods of 12–36 h.

Adult androgenized animals (intact males and adult females neonatally treated with testosterone) exhibited qualitative and quantitative differences in the chromatofocusing pattern of pituitary FSH

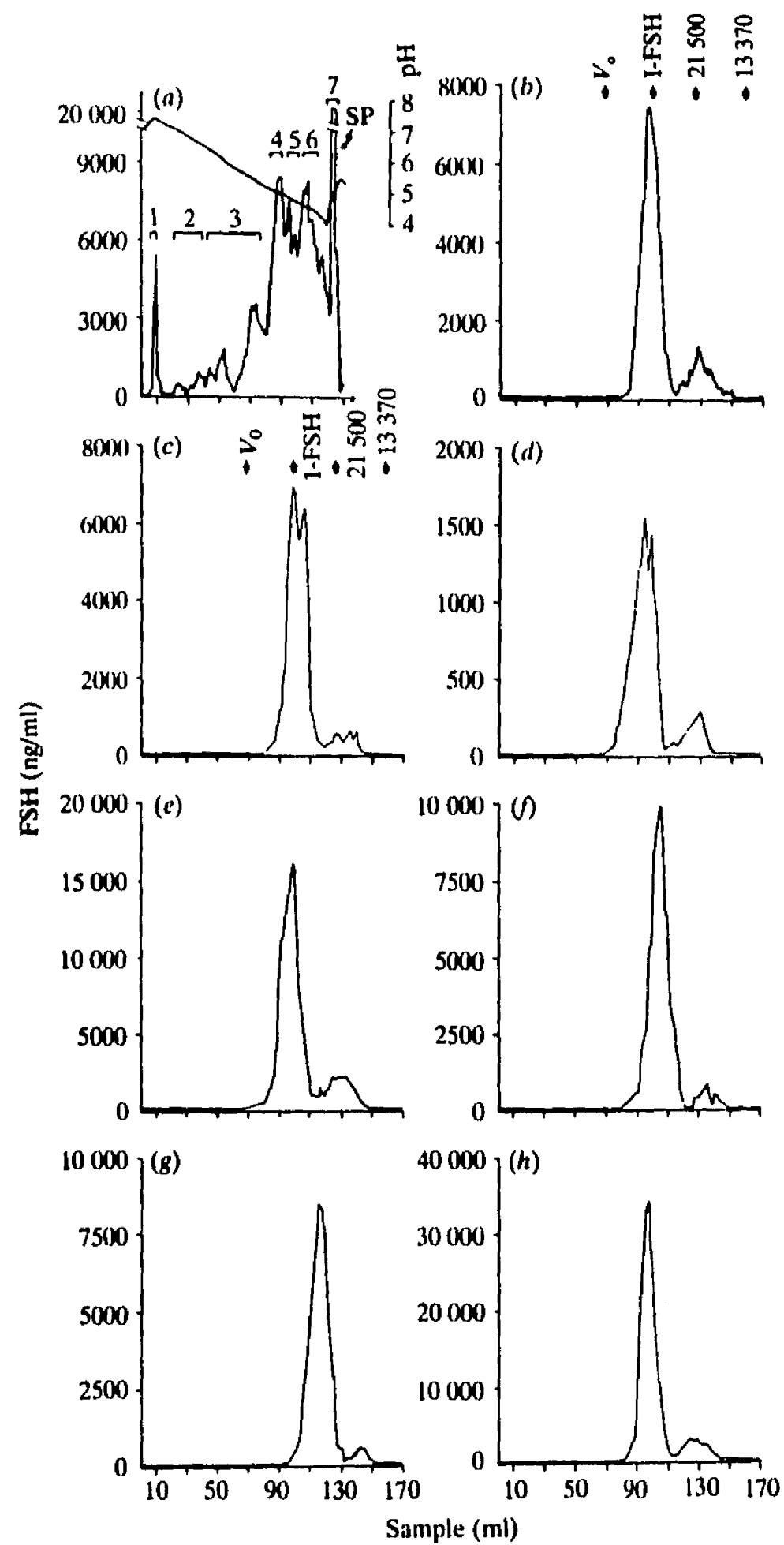


FIGURE 3. Size-exclusion chromatography across Sephadex G-100 of each FSH peak or pool of minor peaks recovered after chromatofocusing of anterior pituitary extracts from adult ovariectomized donors. (a) Chromatofocusing pattern of pituitary FSH from adult ovariectomized rats. Numbers above the brackets indicate the individual peak or pool of peaks concentrated and thereafter chromatographed: 1, isoelectric point (pI) 7.36; 2, pIs 7.0–6.65; 3, pIs 5.90–5.45; 4, pI 5.06; 5, pI 4.86; 6, pI 4.60; 7, salt peak (SP). (b) Exclusion chromatography of peak 1. (c) Exclusion chromatography of pool 2. (d) Exclusion chromatography of pool 3. (e) Exclusion chromatography of peak 4. (f) Exclusion chromatography of peak 5. (g) Exclusion chromatography of peak 6. (h) Exclusion chromatography of peak 7 (salt peak). V_0 void, volume; I-FSH, 125 I-labelled FSH; 21 500 and 13 370 represent M_r values.

TABLE 3. Follicular diameter in control and testosterone propionate (TP)-treated rats of different ages. Values are means \pm S.E.M. ($n=6$) and are expressed as a per cent of total follicular population

	Number of follicles (% of total)				
	300-349 μ m	350-399 μ m	400-449 μ m	450-499 μ m	≥ 500 μ m
Age (days)					
10					
Vehicle	100	—	—	—	—
TP	100	—	—	—	—
18					
Vehicle	60 \pm 2	40 \pm 4	—	—	—
TP	53 \pm 10	19 \pm 6*	17 \pm 6	9 \pm 4	2 \pm 2
21					
Vehicle	52 \pm 8	30 \pm 8	8 \pm 2	8 \pm 2	2 \pm 2
TP	39 \pm 9	25 \pm 5	15 \pm 7	15 \pm 8	5 \pm 3
30					
Vehicle	34 \pm 8	15 \pm 4	17 \pm 5	15 \pm 4	18 \pm 6
TP	22 \pm 2	17 \pm 3	20 \pm 4	17 \pm 4	23 \pm 5
60					
Vehicle	28 \pm 6	29 \pm 9	10 \pm 4	8 \pm 3	25 \pm 5
TP	26 \pm 4	27 \pm 5	10 \pm 4	5 \pm 2	32 \pm 4
90					
Vehicle†	30 \pm 6	19 \pm 3	21 \pm 5	11 \pm 3	19 \pm 5
TP	9 \pm 4*	18 \pm 5	15 \pm 5	12 \pm 5	46 \pm 11*

* $P < 0.05$ compared with vehicle (unpaired t -test).
 †Day of oestrus.

compared with adult cyclic animals. In the former groups, decreased relative amounts of FSH molecules with pIs > 5.0 were found and the majority of intrapituitary FSH was recovered within the most acidic pH range (4.9-4.0) and the salt peak. Since adult rats with the androgen-induced anovulatory syndrome exhibit relatively raised serum titres of oestradiol (Uilenbroek, Arendsen de Wolff-Exalto & Blanckstein, 1976), it might be expected that their pituitaries should exhibit proportionately more basic rather than acidic FSH isoforms as found in normal animals decapitated during the day of pro-oestrus and oestrus. The fact that these animals are continuously rather than cyclically exposed to oestrogens, coupled with the well known relative inability of the adult hypothalamic tissue to concentrate and respond to oestrogens as a consequence of neonatal exposure to androgens (Anderson & Greenwald, 1969; Flerko, Mess & Ille-Donhoffer, 1969; McGuire & Lisk, 1969; Neill, 1972; Marrone & Feder, 1977), might explain this apparent discrepancy. The overall results strongly suggest that a cyclic or 'female' pattern of hypothalamic and gonadal secretion leads to a temporal increase in the production of less acidic and short-lived (Blum & Gupta, 1985) forms of anterior pituitary FSH with high biological potency at the target cell level (Ulloa-Aguirre & Chappel, 1982; Chappel *et al.* 1983; Miller, Ulloa-Aguirre, Hyland & Chappel, 1983; Ulloa-Aguirre, Miller, Hyland & Chappel, 1984). By con-

trast, a tonic or 'androgenic' type of secretion, such as that present in adult males and females with the androgen-induced anovulatory syndrome, switches on the pituitary gland towards the production of strongly acidic molecules whose biological effects are more related to their high sialic acid content and longer plasma half-lives (Ulloa-Aguirre, Miller, Hyland & Chappel, 1984; Blum, Riegelbauer & Gupta, 1985). Interestingly, in adult female androgenized animals, the accumulation of these acidic FSH molecules correlated with a significant increase in the percentage of follicles ≥ 500 μ m in diameter, some of which might be representing a precystic condition. Whether the long-lasting FSH molecules predominantly produced by the pituitary gland of these animals are directly involved in the formation of precystic or cystic follicles (Barraclough & Gorsky, 1961) cannot be ascertained by the present study.

It is noteworthy that in some of the physiological conditions analysed, the majority of the intrapituitary FSH chromatofocused was recovered within the salt peak. This strongly acidic FSH peak detected outside the lower-limiting pH is probably composed of multiple components which are difficult to separate with the chromatofocusing reagents currently available. In fact, Chappel *et al.* (1984) have shown that in samples from female *Cynomolgus* monkeys this peak comprises at least two isoforms as disclosed by ion exchange chromatography, and that its digestion with

neuraminidase produces many of the FSH isoforms (pIs 7.0-5.1) observed in crude pituitary tissue. It is possible that this particular form of FSH may represent a family of precursors for mature stored and readily releasable isoforms of FSH, particularly considering that in the present studies it comprised more than 70% of the total FSH recovered after chromatofocusing of extracts from the most immature animal groups (5 and 10 days old), and less than 30% in samples collected during the morning of the day of pro-oestrus, just before the preovulatory FSH surge.

The present description of the polymorphic patterns of anterior pituitary FSH under different physiological conditions of the donor animal clearly indicate that this gonadotrophin is not structurally represented by a unique molecule, but rather by a continuum of heterogeneous forms whose physicochemical and biological characteristics are modulated by the particular pattern of hypothalamic and gonadal secretion present at a given time.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Rockefeller Foundation, New York, NY, U.S.A. The authors are indebted to the NIDDK for the rat FSH RIA material.

REFERENCES

- Anderson, C. H. & Greenwald, G. S. (1969). Autoradiographic analysis of estradiol uptake in the brain and pituitary of the female rat. *Endocrinology* **85**, 1160-1165.
- Barracough, C. A. & Gorski, R. A. (1961). Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* **68**, 68-79.
- Bex, F. J. & Corbin, A. (1981). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology* **108**, 273-280.
- Blum, W. & Gupta, D. (1980). Age and sex-dependent nature of the polymorphic forms of rat pituitary FSH: the role of glycosylation. *Neuroendocrinology Letters* **2**, 357-365.
- Blum, W. & Gupta, D. (1985). Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released *in vitro* and metabolic clearance rates of its various forms. *Journal of Endocrinology* **105**, 29-37.
- Blum, W., 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. *Journal of Endocrinology* **105**, 17-27.
- 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**, 452-461.
- Chappel, S. C., Coutifaris, C. & Jacobs, S. C. (1982). Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* **110**, 847-854.
- Chappel, S. C., Ulloa-Aguirre, A. & Ramaley, J. (1983). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* **28**, 196-205.
- Coutifaris, C. & Chappel, S. C. (1982). Intraventricular injection of follicle-stimulating hormone (FSH) during proestrus stimulates the rise in serum FSH on estrus in phenobarbital treated hamsters through a central nervous system-dependent mechanism. *Endocrinology* **110**, 105-113.
- Dufau, M. L., Tsurahara, T. & Catt, K. J. (1972). Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta* **278**, 281-292.
- Flerko, B., Mess, B. & Illei-Donhoffer, A. (1969). On the mechanism of androgen sterilization. *Neuroendocrinology* **4**, 164-170.
- 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**, 31-39.
- Keel, B. A. & Schanbacher, B. D. (1987). Charge microheterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in Rams and steroid-treated Wethers. *Biology of Reproduction* **37**, 786-796.
- Khan, S. A., Katzija, G., Froysa, B. & Diczfalusy, E. (1984). Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone in Baboon pituitary preparations. *Journal of Medical Primatology* **13**, 295-304.
- McGuire, J. L. & Lisk, R. D. (1969). Oestrogen receptors in androgen or oestrogen sterilized female rats. *Nature* **221**, 1068-1071.
- Marrone, B. L. & Feder, H. H. (1977). Characteristics of (³H)-estrogen and (³H)-progesterin uptake and effects of progesterone on (³H)-estrogen uptake in brain, anterior pituitary and peripheral tissues of male and female guinea pigs. *Biology of Reproduction* **17**, 42-48.
- 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. *Fertility and Sterility* **40**, 242-247.
- Neill, J. D. (1972). Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* **90**, 1154-1160.
- Robertson, D. M., Foulds, L. M. & Ellis, S. (1982). Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing: differences between sexes and after castration. *Endocrinology* **111**, 385-391.
- Shaikh, A. A. & Shaikh, S. A. (1975). Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocrinology* **96**, 37-44.
- Sherwood, N. M., Chiappa, S. A., Sarkar, D. K. & Fink, G. (1980). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in pituitary stalk blood from proestrus rats: effects of anesthetics and relationship between stored and released GnRH and luteinizing hormone. *Endocrinology* **107**, 1410-1417.
- Uilenbroek, J. Th. J., Arendsen de Wolff-Exalto, E. & Blanckstein, M. A. (1976). Serum gonadotropins and follicular development in immature rats after early androgen administration. *Journal of Endocrinology* **68**, 461-468.
- 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**, 257-266.
- Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damián-Matsumura, P. & Chappel, S. C. (1988b). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Human Reproduction* **3**, 491-501.
- Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damián-Matsumura, P., Larrea, F., Flores, A., Morales, L. & Dominguez, R. (1988a). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* **38**, 70-78.

- Ulloa-Aguirre, A., Mejia, J. J., Dominguez, R., Guevara-Aguirre, J., Diaz-Sanchez, V. & Larrea, F. (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectrofocusing pattern throughout sexual maturation. *Journal of Endocrinology* **110**, 539-549.
- 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**, 382-387.
- Ulloa-Aguirre, A., Torra, E., Dominguez, R., Scherpbier, R. & Larrea, F. (1985). Effects of oestradiol-17 β and LRH upon the two fractions of pituitary follicle-stimulating hormone separated by concanavalin-A chromatography. *Acta Endocrinologica* **110**, 475-482.
- Walker, R. A. & Duncan, D. B. (1972). A Bayes rule for the symmetric multiple comparisons problem. *Journal of the American Statistical Association* **67**, 253-256.
- Welschen, R. (1973). Amounts of gonadotropins required for normal follicular growth in hypophysectomized adult rats. *Acta Endocrinologica* **72**, 137-155.
- Wide, L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinologica* **109**, 181-189.

MICROHETEROGENEITY OF GONADOTROPINS

A. Ulloa-Aguirre, P. Damián-Matsumura*, A. Cravioto & R. Espinoza

Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición
Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México D. F.,

*Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
México D.F. 09340,
México

Pituitary gonadotropins luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) belong to a family of closely related glycoproteins. Each hormone is a heterodimer consisting of an α - and β -subunit (17,21). Within a given animal species, the α -subunits of these glycoproteins arise from a single gene, whereas the β -subunits, which confer hormone specificity, arise from separate genes and differ in amino acid sequence (3,7,17,18,27). The α - and β -subunits of each hormone contain either one or two Asn-linked heterogeneous oligosaccharides with different degrees of sulfation and sialylation (1). This wide spectrum in glycosylation, sialylation and sulfation constitutes the chemical basis for isoform formation (microheterogeneity) and the extensive charge heterogeneity seen with all these gonadotropic hormones.

This paper briefly reviews recent information on rodent (r) and human (h) FSH and LH isoforms separated by their charge properties, since these species represent the most extensively examined models for the characterization of gonadotropin isohormones.

Charge Heterogeneity of FSH

Intracellular FSH from several animal species (including human and non-human primates), exhibits charge heterogeneity and therefore exists as a series of forms or isohormones which can be separated by techniques such as isoelectric focusing (IEF) and chromatofocusing (CF) [these techniques separate the different isoforms by their isoelectric point (pI)]. Using either of these techniques, six to seven dimeric components of FSH with pI values of 7.3 to 3.8 have been identified (2,5,20,30). When chromatofocusing is employed, one additional

component ("salt peak") may be detected by adding 1 M NaCl to the column after elution of isoforms with a pI of 4.0 (4,16). These FSH species differ from each other not only in their pI but also in relative abundance, receptor binding activity and *in vitro* biological potency (Figs. 1 to 3). In general, FSH isoforms with pIs >5.5 are less abundant but exhibit higher *in vitro* biological potencies than the more acidic forms (4,5,15,31) (Figs. 1 and 3).

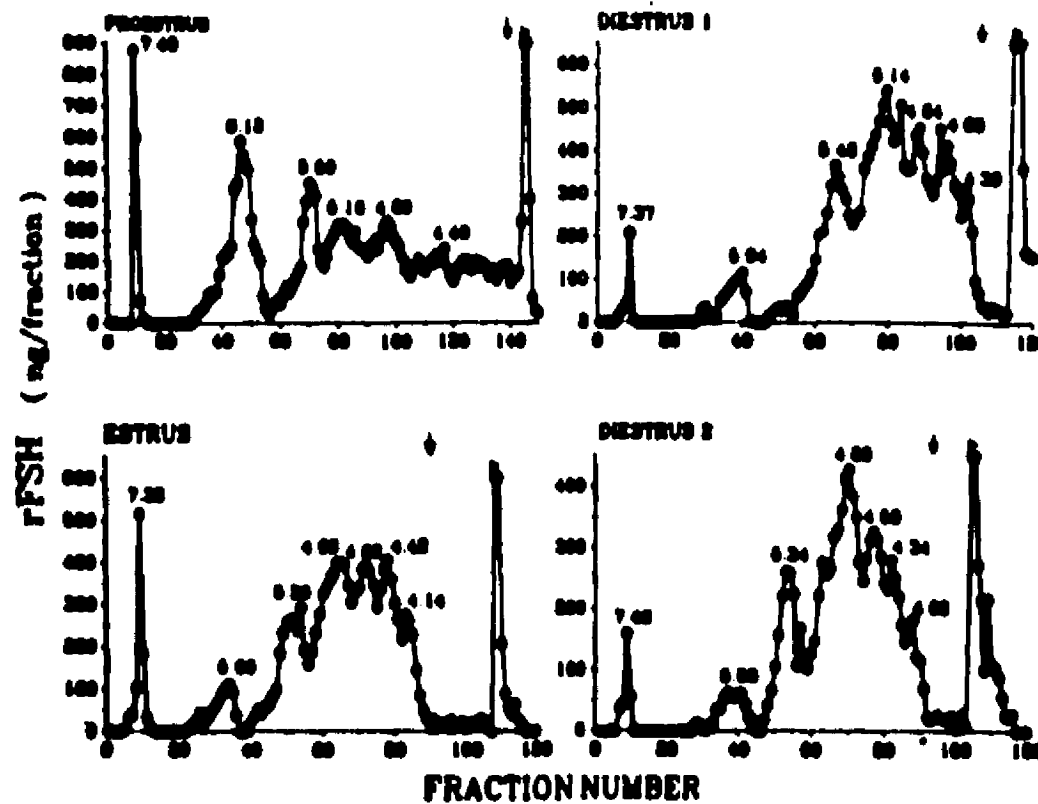


FIG. 1. Representative patterns of pH distribution of FSH after chromatofocusing of pituitary extracts from adult rats decapitated at 09:00-11:00 h. Arrow indicates the addition of 1.0 M NaCl to the column. Numbers above peaks of FSH activity denote the pI of that FSH isoform.

From a physiological point of view, both the presence and relative abundance of these isoforms will depend on the specific endocrine milieu exhibited by the donor at a given time. In the rat, female sexual maturation is accompanied by an enhanced production of isoforms with pIs >5.0 having higher *in vitro* biological activities (Fig. 3) and shorter circulatory half-lives (2,5,15) than the more acidic forms. The opposite situation is seen during male sexual maturation when a shift toward acidity (from pIs of 4.9 to 4.5 to pIs of 4.4-4.0) occurs around the time of appearance of spermiogenesis and balanopreputial separation (31); even though these more negatively charged isoforms present reduced *in vitro* biological activities, their time of survival in the circulation is longer than the less acidic species. In adult donors the pH distribution of the rFSH isoforms varies throughout the estrous cycle (30). Pituitary extracts from rats decapitated during the morning (09:00 h) of proestrus, estrus and diestrus day 1 contain the highest proportion of immunoreactive FSH focused within a pH range of 7.5-5.0 (26.5 to 55.3 % of total FSH recovered; Fig. 1), whilst only 13% of FSH from rats on day 2 of diestrus is recovered within this pH range. Pituitaries from normal adult males and neonatally androgenized adult females contain predominantly acidic forms with pIs < 5.0 (>50% of total; Fig. 4).

The pH distribution profile of intrapituitary rFSH present at a given time may be altered by specific pharmacological manipulations (8). When removed from ovariectomized hamsters at specific times after estradiol (E) administration, anterior pituitary glands contained all forms of FSH identified by CF (8), with the exception of the "salt peak" which was not sought in this particular study. However the relative abundance of the more or less acidic forms changed depending on the time of pituitary exposure to this steroid. Short-term exposure (20 h) was related to the presence of greater proportions of the more acidic FSH forms compared with ovariectomized controls; estradiol exposure for an additional 10 h (at a time when these E-treated animals were about to initiate a surge release of LH and FSH), caused an increase in the relative abundance of the less acidic isohormones. Since this shift to more basic FSH species could be prevented by phenobarbital administration (which prevents the E-induced, neurally mediated discharge of hypothalamic GnRH) it was suggested that the production of FSH isohormones is regulated via a sophisticated regulatory system mediated by gonadal and hypothalamic factors. This hypothesis was further supported by IEF studies performed in our laboratory employing intact female and male rats as well as neonatally androgenized females (29,30).

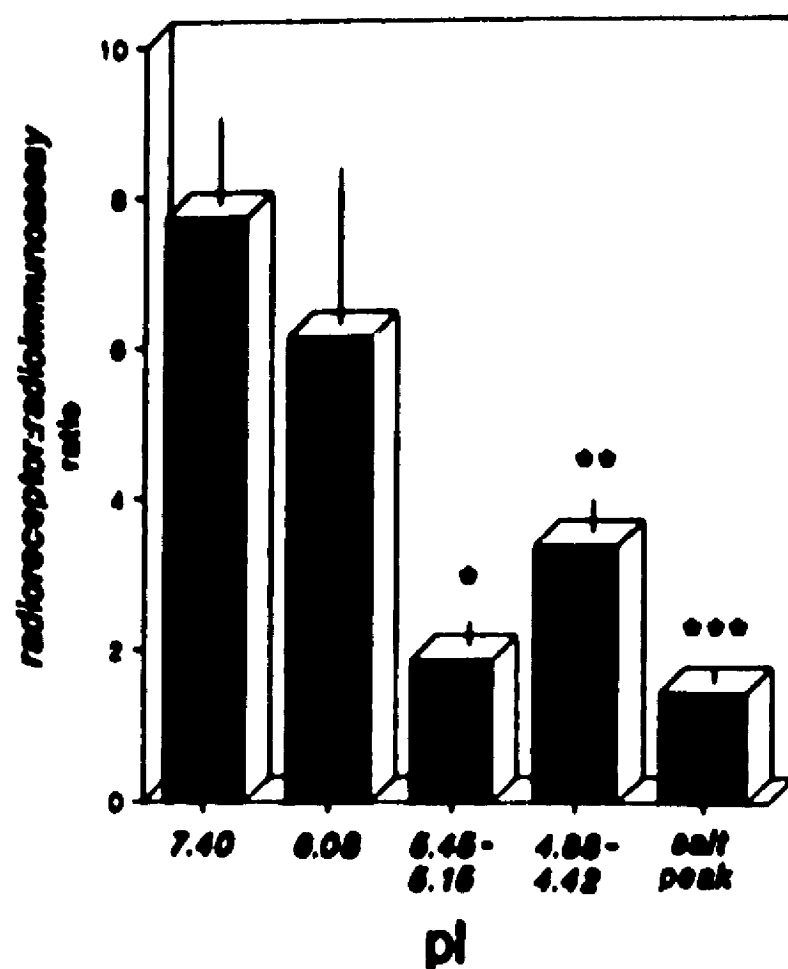


FIG. 2. The RRA:RIA FSH activity ratio of each FSH isohormone or pool of minor forms obtained after chromatofocusing of pituitary extracts from adult female rats decapitated during the morning of proestrus (see FIG.1). *, $p=0.01$ vs pIs 7.40, 6.08 and 4.88-4.42; **, $p=0.01$ vs pIs 7.40, 5.45-5.15 and salt peak; ***, $p=0.01$ vs pIs 7.40, 6.08 and 4.88-4.41.

The overall data strongly suggest that at least in rodents, a cyclic or "female" pattern of hypothalamic and gonadal secretion leads the anterior pituitary towards the production of less acidic follicle-stimulating isohormones, whereas a tonic or "androgenic" type of secretion, as that present in adult males and females with the androgen-induced anovulatory syndrome, leads more to the production of strongly acidic FSH forms. Hence, there is a sexual dichotomy in terms of the type of FSH synthesized by the anterior pituitary gland (Figs. 1 and 4).

Sex- and age-dependent differences in charge heterogeneity of intrapituitary FSH have also been detected in humans (35,37). Acidic isohormones are more prevalent in older individuals (both males and females) and the most acidic forms are found in glands obtained from elderly women (35,37,39). In agreement with the studies performed in rodents, the median charge of FSH is more basic in young women than in young men (35); in males, the median charge of pituitary FSH from ages 0.2-9 years is less acidic than that of men 17-42 years old. Likewise, as found in the rodent, both the *in vitro* biological activity (4,13,40) and plasma disappearance rates (36) of human and monkey intrapituitary FSH isoforms increase as the pI or median charge of the isoform becomes less acidic.

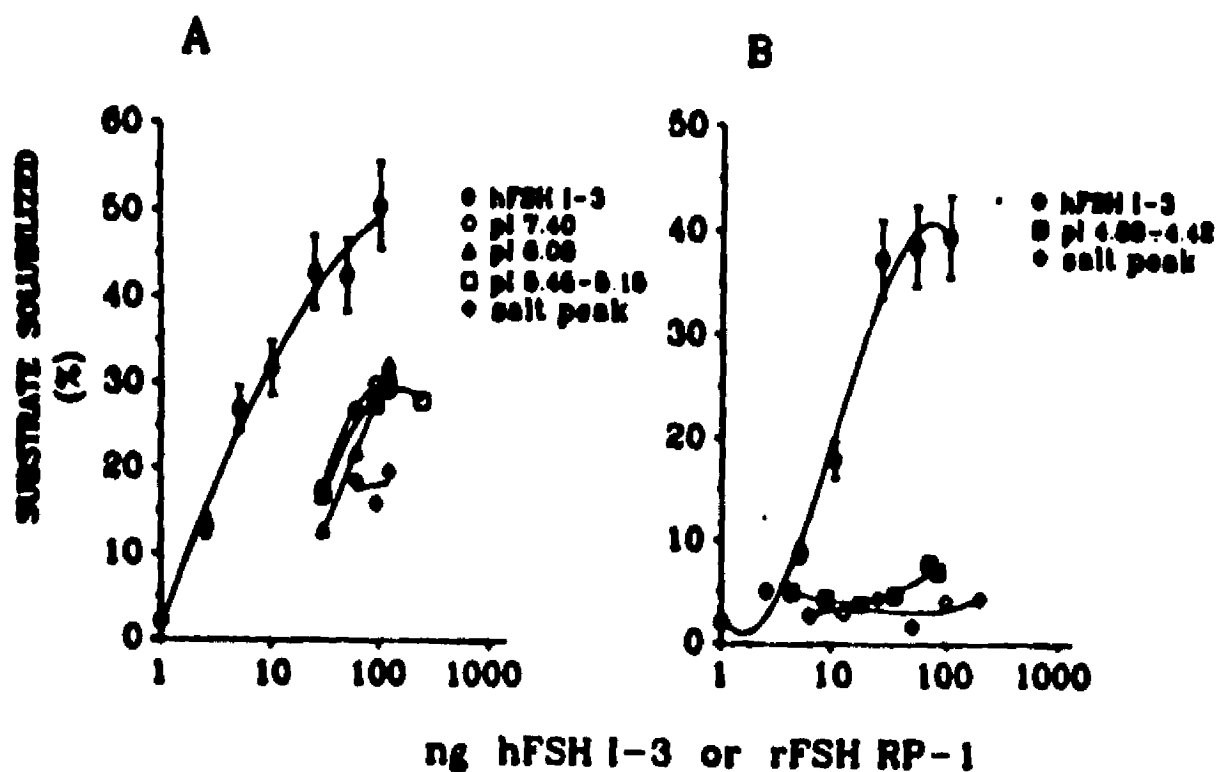


FIG. 3. A: The ability of each FSH peak or pool of peaks to stimulate plasminogen activator production by rat granulosa cells in culture. The activity exhibited by pool with pI 4.88-4.42 was similar to that presented by the salt peak. B: The activity of pool with pI 4.88-4.42 and the salt peak after size exclusion chromatography through Sephadex G-100. The B/I ratios for isohormones with pIs 7.40, 6.08 and 5.45-5.15 were 3.08 ± 0.24 , 2.26 ± 0.14 and 2.30 ± 0.45 , respectively. Values represent the means of triplicate incubations.

Heterogeneity of circulating FSH in humans has been demonstrated by Wide (34) and Padmanabhan et al (16) using zone electrophoresis or chromatofocusing as the separation technique, respectively. Serum FSH from premenopausal women was less acidic than that exhibited by postmenopausal women, normal men,

castrated men and patients with gonadal dysgenesis (34,38). Circulating FSH from all these subject groups is more negatively charged than intrapituitary FSH (35). In a recent study, administration of GnRH to patients with gonadal dysgenesis was followed by the appearance of less negatively charged forms of FSH in serum, with a highly significant correlation between the relative increase in serum levels of FSH after GnRH and the decrease in relative electrophoretic mobility (38). This observation suggests that the prevalence of strongly acidic forms of serum FSH detected in basal conditions may be due to selective survival in the circulation of the different isoforms released by the pituitary. Padmanabhan et al (16) chromatofocused serum from women with normal ovulatory cycles and showed that the pH distribution pattern of FSH changed depending on the specific phase of the cycle. Serum from women during the midcycle phase contained more immunoreactive FSH in the pH range of 6.0-4.81 compared to the luteal and follicular phase samples, in which the majority of FSH forms were detected within the pH range of less than 4.81. Interestingly, administration of the synthetic estrogen diethylstilbestrol to a patient with gonadal dysgenesis, induced a shift of the serum FSH isoforms to the basic pH range (16). Similar qualitative changes in the pH distribution of serum FSH forms were detected by Wide (34) in samples from men with prostatic cancer treated with estrogens. All these observations strongly support the concept of the existence of a sexual dichotomy with regard to the type of FSH produced by the pituitary.

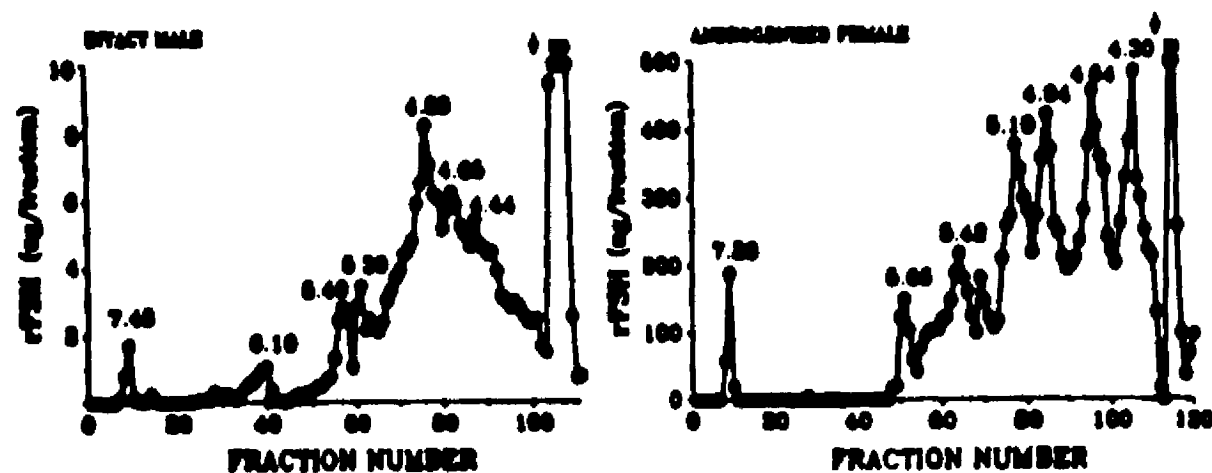


FIG. 4. Representative profiles of pH distribution of pituitary FSH after chromatofocusing of extracts from adult male- and neonatally androgenized female rats. Numbers above peaks denote the pI of that FSH isoform. Arrow indicates the addition of 1 M NaCl to the chromatofocusing column.

Studies from both rodents and primates clearly indicate that sex steroid hormones and GnRH, acting in concert at the hypothalamic and pituitary levels, regulate the physicochemical and biological characteristics of the FSH molecule to be released from the pituitary gland at a given time.

Charge heterogeneity of LH

Charge heterogeneity of intracellular LH has been extensively examined in

several animal species. Six to seven dimeric components of rat and human pituitary LH with isoelectric points ranging from 9.8 to <7.0 have been identified by either IEF or chromatofocusing (9-12,19,22,33). As it has been found for FSH, several studies have shown that these LH isohormones differ from each other in relative abundance (12), receptor binding activity (33) and *in vitro* biological potency (10,12,22). Variations in relative abundance are closely related with the endocrine status of the donor (12,19; see below). In both humans and rodents, it has been demonstrated that the more basic isohormones possess the greatest RRA:RIA (radioreceptor to radioimmunoassay) and B:I (*in vitro* biological to immunological) LH activity ratios, and that these ratios decrease linearly with decreasing pI (12,22,33). In contrast, little is known concerning the circulatory half-lives of the LH isohormones. Survival time experiments done in male rats injected with different human LH isoforms with pIs ranging from 7.4 to 8.8 showed that there were no significant differences in the disappearance rates between the four isohormones tested (9). This observation is what should be expected considering the narrowness among the pIs of the isohormones studied; inclusion of more isohormones with extremes pH (pIs <7.0 and >9.0;12) would probably yield significant differences in half-lives among LH isoforms.

Even though in rodents the sex of the donor and its endocrine status does not change significantly the number of pituitary LH isohormones detected (12), there may be changes in the relative abundance of rLH among the various isoforms. Hattori et al (11), found that the relative amounts of rLH components with pIs 9.3 to 9.8 were higher in glands from intact females (morning of proestrus) than in those from intact male and orchidectomized animals, whilst components with pIs 7.9 to 8.8 (with lower *in vitro* biological potencies) were dominant in orchidectomized donors. Robertson et al (20) found significantly more immune and bioactive rat LH in the pH range of 7.0-9.5 in intact males than in diestrus females; castration increased the proportion of alkaline LH (pI 7.0 to 11.0) from 63 and 60% to 76 and 75% in male and female donors, respectively. Although Keel and Grotjan (12) did not observe significant changes among the pH distribution profiles of intrapituitary male and female LH, they found that the relative amount of the most alkaline LH isoform (apparent pI >9.8) was reduced 2.5- and 3.5 fold whereas that of midalkaline LH (pI 9.06) increased as a result of castration in both sexes. Uchida and Suginami (28) observed cyclic changes in both the bioactive and immunoreactive levels of the most basic isohormone of rat LH (pI 10.3) whereas midalkaline or acidic species remained constant throughout the cycle. This basic isohormone was the most predominant during proestrus, decreased during estrus and then increased during diestrus. Thus, structural modifications of the hormone associated with the midcycle release of LH might result in an alkaline shift in pI and a subsequent increase in biological potency of the LH molecule released at this time. In fact, when serum LH bioactivity is measured in cycling rats, a marked increase in LH B/I ratio may be found after the proestrus-associated LH surge (24).

Age-dependent differences in charge heterogeneity of human pituitary and plasma LH have been explored in detail. Reader et al (19) observed that >34% of the bioactive pituitary LH from postmenopausal women (aged 61 to 75 years) migrated as a major discrete isoelectric focusing peak to an acidic pH region (< 6.0), whilst <6.0% of the LH from premenopausal (19 to 35 years old) was detected in this low bioactivity region. This observation was in agreement with

that of Strollo et al. (25) who found marked differences in pH distribution between bioactive LH from plasma of postmenopausal women compared with normally menstruating women; in the former group, a more acidic molecular species (pH 7.1) was detected. Wide (35) using zone electrophoresis found that acidic LH isohormones were more prevalent in older individuals (both males and females) and that the most acidic forms were found in glands from elderly women; there was a highly significant correlation between the median charge of LH in individual pituitary extracts and age, in both men and women (age ranges studied: 19 to 86 years for men and 14 to 91 for women). The median charge of pituitary LH was similar in young men and women (35), finding which was in agreement with the studies in rodents performed by Keel and Grotjan (12) but not with those of Robertson et al. (20). These discrepancies could be related to differences in the endocrine status of the female donors at the time of sample collection.

The electrofocusing profiles of the two pools of human LH released by the action of exogenous GnRH (where the first pool represents the acute releasable pool of mature stored hormone, and the second one the release of the reserve pool of LH which involves synthesis and/or chemical modification of the hormone) have been examined by Suginami et al (26). In midcycle samples from the first pool, the dominant LH species had pIs ranging from 8.5 to >9.0, whereas early follicular and luteal phase first pool predominantly migrated within the pI range 7.5-8.6. LH from the second pool consistently exhibited an increase in the percentage of acidic LH species (pI <7.0), in which the B/I ratio was significantly depressed. Thus, alkaline LH isohormones might represent the stored, readily releasable pool of LH, whilst acidic isoforms might represent the young generation of LH molecules prior to acquisition of biological potency through modifications in their carbohydrate composition.

The overall data clearly indicate that, as it has been documented for FSH, LH pleomorphism is finely regulated by the concerted action of both gonadal and hypothalamic (GnRH) factors.

Biochemical basis for gonadotropin heterogeneity

Recent evidence indicates that gonadotropin microheterogeneity is the result of variations in oligosaccharide structure. The elegant studies of Baenziger and Green (1) have allowed to elucidate some possible relationships between oligosaccharide heterogeneity and charge heterogeneity. Most oligosaccharide chains in LH and FSH are dibranched structures in which both of them terminate in a negatively charged group (GalNAc-SO₄ or GAL- sialic acid) or one branch in a negatively charge group and the other in a mannose. Dibranched complex-type oligosaccharides with and without a bisecting GlcNAc moiety and tribranched complex-type oligosaccharides of different types but containing all of them terminal sialic acid residues are also found. Since the relative distribution of neutral, sulfated and sulfated/sialylated oligosaccharides on pituitary gonadotropins shows significant between-species variations (1), it is very difficult to generalize on the role of these terminal groups in hormone heterogeneity. Several studies have shown that the sialic acid content of a given gonadotropin is closely correlated with its pI and in vitro biological activity. Graded enzymatic

digestion of rat LH (10), hamster FSH (32) and human FSH (34,35,37) with neuraminidase progressively decreased the acidic isohormones of the hormone, while concomitantly increasing the proportion of basic forms until a single, completely desialylated isoform was detected. This desialylation was accompanied by a progressive increase in *in vitro* biological activity (10,32). Thus, in these particular gonadotropins sialic acid content seems to play a primary role in the observed charge heterogeneity as disclosed by electrofocusing and zone electrophoresis. In contrast, treatment of ovine LH with neuraminidase resulted only in a minimal shift towards the alkaline region, suggesting that at least in this animal species terminal sulfates play a critical role on LH heterogeneity (6). Studies on hLH are controversial. Cole et al (6) observed a marked shift from acidic to basic forms as a result of neuraminidase digestion, whilst Lichtenberg and Urban (14) detected a partial shift which was extended only after further digestion with arylsulfatase. Thus, it seems that in the case of hLH both negatively charged terminal groups account for most of the charge heterogeneity of the hormone. In fact, structural analysis of the oligosaccharides present in hLH have shown the existence of nearly equal proportions of sulfated and sialylated oligosaccharides (sialylated/sulfated oligosaccharides ratio=1.18) (1).

Although the biochemical mechanisms involved in the interaction of these gonadotropic isoforms with their specific receptors at the target cell remain incompletely understood, it appears that in addition to sialic acid incorporation, variations in the structure of the carbohydrate moieties internal to sialic acid or terminal sulfates also play a critical role. More basic rat FSH and human LH isoforms exhibit a higher affinity for the lectin Concanavalin A than the more acidic isohormones (22,32), which suggests that basic isoforms contain more hybrid oligosaccharides (with one branch terminating in a mannose), whereas acidic molecules contain more complex oligosaccharides in which both branches probably terminate in negatively charged groups. If sialic acid residues are enzymatically removed from acidic rat FSH isohormones, the resultant less acidic forms will show a significant increase in their capacity to bind this lectin (32). The observation that such an increment in affinity for Concanavalin A presented by the less negatively charged isoforms parallels their enhancement in receptor-binding activity and *in vitro* biological potency strongly suggests the existence of a close relationship between the particular content and/or spatial arrangement of carbohydrates internal to negatively charged terminal moieties upon the FSH and LH molecules and their behavior at the target cell level. Alternatively, this finding might also indicate the presence of inhibitory effects of negatively charged groups upon either binding of the isohormones to their receptor or activation of the receptor-adenylate cyclase system.

Conclusions

Although the physiological significance of gonadotropin heterogeneity still remains to be clearly defined, the studies described above indicate that the pituitary gland has the capacity to regulate not only the quantity but also the quality of the gonadotropin signal produced and released from the gland at any given time to perform specific actions upon gonadal maturation and function. An interesting level of control appears to exist at the pituitary gland. Depending upon

the endocrine milieu, the pituitary preferentially releases different types of gonadotropins, highly potent but short-lived or long-acting but less biologically active forms. Thus, the existence of gonadotropin heterogeneity represents an exquisite fine-tuning mechanism for controlling gonadal activity. The study of the biochemical basis for gonadotropin heterogeneity and the elucidation of the precise control of isohormone biosynthesis will undoubtedly allow not only a better understanding of the mechanisms controlling the function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis but also the design of new therapeutic strategies to obtain a better control over follicular development, compared with conventional therapy.

Acknowledgements

Studies performed in the laboratory of Dr. A. Ulloa-Aguirre have been supported by grants from the Rockefeller Foundation, New York, NY.

References

1. Baenziger, J. U., and Green, E.D. (1988): *Biochem. Biophys. Acta.*, **947:287-306.**
2. Blum, W., and Gupta, D. (1985): *J. Endocrinol.*, **105:29-37.**
3. Boothby, M., Riddon, R.W., Anderson, C., McWilliams, D., and Bolme, I. (1981): *J. Biol. Chem.*, **256: 5121-5127.**
4. Chappel, S.C., Bethea, C.L., and Spies, H.G. (1984): *Endocrinology*, **115:452-461.**
5. Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A., and Ramaley, J. (1983): *Biol. Reprod.*, **28:196-206.**
6. Cole, L.A., Metsch, L.S., and Grotjan, H.E., Jr. (1987): *Mol. Endocrinol.*, **1:621-627.**
7. Esch, F.S., Mason, A.J., Cooksey, K., Mercado, M., and Shimazaki, S. (1986): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83:6618- 6621.**
8. Galle, P.C., Ulloa-Aguirre, A., and Chappel, S.C. (1983): *J. Endocrinol.*, **99:31-39.**
9. Graesslin, D., Lichtemberg, V., Holtje, F., Schedlinski, G., and Rinne, G., (1984): *Acta Endocrinol.*, **105 (Suppl. 262):69-70.**
10. Hattori, M., Osawa, K., and Wakabayashi, K. (1985): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127:501-508.**
11. Hattori, M., Sakamoto, K., and Wakabayashi, K. (1983): *Endocrinol. Jap.*, **30:289-296.**
12. Keel, B.A., and Grotjan, E.H. (1985): *Endocrinology*, **117:354-360.**
13. Khan, S.A., Ketzija, G., Froyss, B., and Diczfalusy, E. (1984): *J. Med. Primatol.*, **13:295-304.**
14. Lichtenberg, V., and Urban, C. (1983): *Acta Endocrinol.*, **102 (Suppl. 253):101-102.**
15. Miller, C., Ulloa-Aguirre, A., Hyland, L., and Chappel, S. (1983): *Fertil. Steril.*, **40:242-247.**
16. Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstein, J., Kelch, R. P., and Bekins, I.Z., (1988): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67:465- 473.**

17. Pierce, J.G., and Parsons, T.F. (1981): *Annu. Rev. Biochem.*, 50:465-495.
18. Pollicastro, P., Oviatt, C.E., Hoshina, M., Fukuoka, H., Boothby, M.R., and Bolme, I. (1983): *J. Biol. Chem.*, 258: 11492-11499.
19. Reader, S.C.J., Robertson, W.R., and Diczfalusy, E. (1983): *Clin. Endocrinol.*, 19:355-363.
20. Robertson, D.M., Foulds, L.M., and Ellis, S. (1982): *Endocrinology*, 111:385-391.
21. Ryan, A.W., Keutmann, H.T., Charlesworth, M.C., McCormick, D.J., Millus, R.P., Calvo, F.O., and Vutyavanich, T. (1987): *Rec. Prog. Horm. Res.* 43:383-429.
22. Snyder, P.J., Bashey, H.M., Gatewood, C.V., and Karowe, M., (1987): *Mol. Cell. Endocrinol.*, 54:115-121.
23. Snyder, P.J., Bashey, H.M., Montecinos, A., Odell, W.D., and Spitalnik, S.L., (1989): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68:1033-1038.
24. Solano, A.R., Garcia-Vela, A., Catt, K.J., and Dufau, M.L. (1980): *FEBS Lett.*, 122:184-190.
25. Strollo, F., Harlin J., Hernandez-Montes, H., Robertson, D.M., Zaidi, A.A., and Diczfalusy, E. (1981): *Acta Endocrinol.*, 97:166-175.
26. Suginami, H., Yano, M., Hamada, K., Ito, T., Yano, K., and Matsura, S. (1985): *Endocrinol. Jap.*, 32:583-593.
27. Talmadge, K., Boorstein, W.R., and Fiddes, J.C. (1982): *DNA*, 2:279-287.
28. Uchida, H., and Suginami, H. (1984): *Endocrinol. Jpn.*, 31:605-611.
29. Ulloa-Aguirre, A., Damian-Matsumura, P., Espinoza, R., Dominguez, R., Morales, L., and Flores, A. (1990): *J. Endocrinol.*, in press.
30. Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damian-Matsumura, P., Larrea, F., Flores, A., Morales, F., and Dominguez, R. (1988): *Biol. Reprod.*, 38:70-78.
31. Ulloa-Aguirre, A., Mejia, J.J., Dominguez, R., Guevara-Aguirre, J., Diaz-Sanchez, V., and Larrea, F.: *J. Endocrinol.*, 110:539-549.
32. Ulloa-Aguirre, A., Miller, C., Hyland, L., and Chappel, S.C. (1984): *Biol. Reprod.*, 30:382-387.
33. Wakabayashi, K. (1980): In: *Hormones, Adaptation and Evolution*, edited by S. Ishii, pp. 271-279. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.
34. Wide, L., (1982): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55:682-688.
35. Wide, L., (1985): *Acta Endocrinol.*, 109:190-197.
36. Wide, L., (1986): *Acta Endocrinol.*, 112:336-344.
37. Wide, L., (1989): *J. Endocrinol.*, 123:519-529.
38. Wide, L., and Albertsson-Wikland, K., (1990): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70:271-276.
39. Wide, L., and Hobson, B.M., (1983): *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56:371-375.
40. Wide, L., and Hobson, B., (1986): *Acta Endocrinol.*, 113:17-22.

**EFFECTS OF GnRH, RECOMBINANT HUMAN ACTHIN-A AND SEX STEROID HORMONES
UPON THE FOLLICLE-STIMULATING ISOHORMONES SECRETED
BY RAT ANTERIOR PITUITARY CELLS IN CULTURE^{*}**

**Alfredo Ulloa-Aguirre¹, Ralph Schwall², Aideé Cravioto,
Elena Zambrano and Pablo Damián-Matsumura³**

**Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México
D.F., México, ²Department of Developmental Biology, Genentech, Inc. South San Francisco CA
and ³Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma
Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., México.**

¹To whom correspondence should be addressed:

**Department of Reproductive Biology
Instituto Nacional de la Nutrición SZ
Vasco de Quiroga #15, Tlalpan 14000,
México D.F., México**

**^{*}Presented in part during the 73rd Annual Meeting of the
Endocrine Society, Washington D.C., June 19.22, 1991.**

ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone (FSH) is produced and secreted from the anterior pituitary gland of female rats in multiple molecular forms. At times of high GnRH and oestrogen output (e.g. the morning of the pro-oestrous day) the pituitary increases the production of FSH isoforms with isoelectric point (pI) values >5.0, whilst sex steroid deprivation leads to the production of strongly acidic and less in-vitro biologically active FSH molecules. It is not known, however, whether sex steroids modulate the production of specific FSH isoforms by a direct action at the pituitary level or indirectly through altering the rate of synthesis and/or secretion of that hypothalamic decapeptide. In order to get some insight on this issue, we examined the charge heterogeneity of FSH secreted by cultured pituitary cells exposed to different FSH-releasing factors, oestradiol-17 β and progesterone, alone or in different time-sequenced combinations. Anterior pituitary glands from 21-day-old female rats were enzymatically dispersed into a single cell suspension and cultured for 6 days. During days 1 to 3, cells were incubated in the absence of factors or steroid hormones; on days 3 to 4, cells were incubated in the absence (controls) or presence of either oestradiol-17 β (3.67 nmol/l) or oestradiol-17 β plus progesterone (3.67 and 31.8 nmol/l, respectively). Finally, during days 4 to 6, GnRH (10 nmol/l) or recombinant human Activin-A (2 nmol/l) were added to half of all culture wells. Media from each cell group were concentrated and the several forms of secreted FSH were then separated by polyacrylamide gel isoelectric focusing (pH range 4.0 to 6.5) and quantitated. All media concentrates contained several forms of immunoreactive secreted FSH focusing within a pH range of 6.44-4.23. Fifty one to 76% of total FSH recovered focused within an isoelectric point range of 4.9-4.0 (area 3), whilst 20 to 43% and 4 to 8% of total were identified within pI ranges of 5.9-5.0 (area 2) and 6.5-6.0 (area 3), respectively. Addition of GnRH to control or oestradiol-primed cells significantly increased the release of FSH isoforms recovered within area 2 compared with the remaining groups (percent FSH recovered

within area 2 in GnRH and oestradiol plus GnRH cell groups= 39.4 ± 2.5 to $43.2 \pm 2.0\%$ of total; controls, oestradiol-17 β -, oestradiol-17 β plus progesterone- and Activin-A-exposed groups= 20.1 ± 2.2 to $32.1 \pm 1.2\%$ of total, $p < 0.05$). The presence of progesterone in the culture media prevented GnRH-mediated effect. Cells exposed to oestradiol-17 β , oestradiol-17 β plus progesterone and Activin-A (with or without sex steroids) predominantly released FSH forms recovered within the most acidic area of the gel (area 3) (68.1 ± 2.9 to $70.9 \pm 5.9\%$ of total, $p < 0.05$ vs GnRH and oestradiol-17 β plus GnRH, n.s. vs the remaining groups). There were not between-group differences in the amount of FSH recovered within area 1 (pI 6.5-8.0). FSH molecules that focused within area 2 exhibited a higher receptor-binding activity than those recovered from the most acidic region of the gel (radioreceptor assay/radiolimmunoassay FSH activity ratio in area 2= 2.56 ± 0.29 , area 3= 0.83 ± 0.03 , $p < 0.01$).

We conclude that under *in-vitro* conditions GnRH selectively increases the release of less acidic FSH isoforms possessing an enhanced receptor-binding potency. It is suggested that oestradiol modulates the *in-vivo* production and secretion of specific FSH isoforms indirectly through temporal modifications in either the rate of synthesis and/or secretion of GnRH at the hypothalamic level or the pituitary sensitivity to this releasing hormone.

INTRODUCTION

Follicle-stimulating hormone (FSH) is produced and secreted by the anterior pituitary gland in multiple molecular forms (Robertson, Foulds & Ellis, 1982; Miller, Ulloa-Aguirre, Hyland & Chappel, 1983; Khan, Katziga, Froya & Diczfalusy, 1984; Wide, 1985; Ulloa-Aguirre, Espinoza, Damián-Matsumura & Chappel, 1988a). The number of these isoforms and their relative abundance will depend on the endocrine status of the donor at the time of collection of the tissue or sample (Wide, 1982; Chappel, Ulloa-Aguirre & Ramaley, 1983; Padmanabhan, Lang, Sonstein et al, 1988; Ulloa-Aguirre, Espinoza, Damián-Matsumura et al, 1988b; Ulloa-Aguirre, Damián-Matsumura, Espinoza et al, 1990). Since the different isoforms of anterior pituitary FSH have been separated mostly on the basis of their charge, it is thought that they differ from each other in their carbohydrate composition, mainly sialic acid (Chappel, Bethea & Spies, 1984; Blum, Riegelbauer & Gupta, 1985; Wide, 1985).

Separation of FSH from anterior pituitaries of female rats and hamsters by polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAG-IEF) has disclosed the existence of several FSH isoforms with isoelectric point (pI) values ranging from 6.2 to 3.5 (Chappel, Coutifaris & Jacobs, 1982; Ulloa-Aguirre et al, 1988b). Pituitary glands removed from animals exposed to an oestrogen and GnRH enriched environment [eg., during the late morning of the day of pro-oestrous (Ulloa-Aguirre et al, 1988b; Ulloa-Aguirre et al, 1990) or during long term (30 h) exposure of ovariectomized animals to oestradiol (Chappel et al, 1982; Galle, Ulloa-Aguirre & Chappel, 1983)], exhibit larger proportions of isohormones with more basic pIs. These particular isohormones contain less sialic acid residues (Blum et al, 1985; Ulloa-Aguirre, Miller, Hyland & Chappel, 1984), have shorter plasma half-lives (Blum & Gupta, 1985) and exhibit higher in-vitro biological potencies than FSH forms with more

acidic pls (Miller et al, 1983). However, it is still incompletely understood whether the production of specific FSH isoforms in these *in-vivo* conditions is regulated by direct actions of sex steroids at the pituitary level or if they exert this effect indirectly through modifying the synthesis and/or release of GnRH, a factor which has been shown to induce changes in the glycosylation of LH in *in-vitro* conditions (Liu, Jackson & Gorski, 1976; Vogel, Magner, Sherins & Weintraub, 1986; Ramey, Highsmith, Wilfinger & Baldwin, 1987).

To further explore this issue, we analysed the direct effects of sex steroids, GnRH and the potent FSH-releasing factor Activin-A, alone or in different time-sequenced combinations with sex steroids, upon the charge distribution of the FSH molecules produced and secreted by anterior pituitary cells in culture.

MATERIAL AND METHODS

Pituitary cell culture

Anterior pituitary glands from 21-day-old Sprague-Dawley female rats were dispersed into a single-cell suspension according to the method of Vale, Grant, Amoss et al (1972). Dispersed cells were plated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, New York, USA) supplemented with 10 % (vol/vol) fetal calf serum (Gibco), 5 µg/ml insulin, 1 mg/ml bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA), 50 µg/ml gentamicin (Gibco) and 4 mol/l glutamine (Sigma), at a density equivalent of two pituitaries per well in 35-mm Nunclon culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark). Two days later (on culture day 3), the cells were washed twice with fresh medium, and the treatments shown in Table 1 were initiated. On days 3 to 4, cells were incubated in the presence or absence (controls) of either oestradiol-17β (E₂; 3.67 nmol/l) or E₂ plus progesterone (P₄) (Sigma) (at a concentration of 3.67 and 31.8 nmol/l,

respectively) whilst during days 4 to 6, GnRH (10 nmol/l) (Genentech, Inc., San Francisco CA, USA) or recombinant human Activin A (rhAct-A; 2nmol/l) (Genentech) were added to half of the control, E₂- and E₂ plus P₄-containing culture wells. All these incubations were performed in fetal calf serum-free culture medium and in humidified 5% CO₂-95% air at 37°C.

At the end of the incubation period, all media samples and cellular lysates [prepared by adding phosphate (0.05 mol/l)-buffered physiological (0.15 mol/l) saline (PBS), pH 7.4, containing 1% Triton X-100 to the dishes after the medium was collected] were separately dialysed against two changes of 100 volumes of 0.01 mol NH₄HCO₃/l and freeze-dried. Each concentrate was redissolved in 0.01 mol/l PBS and stored frozen at -70° C until the day of PAG-IEF.

Polycrylamide gel isoelectric focusing of media and cellular lysates concentrates:

Samples in duplicate or triplicate (10-20 µl each) from at least three concentrates per incubation group, were applied to polyacrylamide gels (LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden) and focused (pH range 4.0-6.5). At the end of the focusing period (2.5 h) each lane was sliced into 27 3-mm sections and focused proteins were eluted by incubation in 0.05 mol/l PBS, pH 7.4, containing 0.1% gelatin, for 18 h at 4° C. Eluent samples were removed and stored frozen until analysis by FSH radioimmunoassay (RIA). Gradients of pH were determined after incubation of slices from blank lanes (top, middle and bottom) in de-ionized water. Eluents from blank gels treated in the same manner as test gels did not interfere with the specific binding of the RIA at the volumes employed (50-200 µl). Recoveries ranged from 70 to 75%.

RIA of FSH

Purified rat FSH (NIDDK rat FSH-I-6, Bethesda MD, USA) was iodinated by the lactoperoxidase-

glucose oxidase method as described by Bex & Corbin (1981). Following separation of protein-bound and free ^{125}I by Sephadex G-100 column chromatography, ^{125}I -labelled FSH was further purified by Concanavalin A chromatography (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA) as described by Dufau, Tsuruhara & Catt (1972). The RIA of FSH was performed using the rat RIA kit provided by the NIDDK; the reference preparation employed to construct the standard curve was rat FSH-RP-2 (NIDDK); results are expressed as ng of this FSH standard. To avoid interassay variations, all samples from a single PAG-IEF lane were included in the same batch. Intra-assay coefficient of variation for this RIA system was 7% and the sensitivity was 0.25 ng/tube.

Radioreceptor assay (RRA) of FSH

PAG-IEF gel media eluents from fractions with pIs 5.9-5.0 and 4.9-4.0 were separately pooled and then quantitated by RRA at four different dilutions. The RRA of FSH was performed as described previously (Guevara-Aguirre, Schoener, Ulloa-Aguirre, et al, 1986). rat FSH-I-6 (NIADDK) was radiolabelled and purified as described above; specific activity of ^{125}I -labelled FSH was 20-25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ protein. The standard curve was constructed employing rat FSH-RP-2 as standard. Specific binding of ^{125}I -labelled hFSH to the receptor preparation was 20-25% of total radioactivity added; non-specific binding was assessed by adding 1000-fold excess of unlabelled ovine FSH (Sigma) and represented <5.0% of the total FSH bound to the receptor preparation. Each sample was assayed in triplicate incubations. Within and between-assay coefficients of variation were <10 and 15%, respectively. The sensitivity was 0.35 ng rat FSH-RP-2/tube.

Statistical Analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) (for $n > 3$) and the unpaired t-test (for $n = 2$) were used to determine differences between groups. When differences existed by the ANOVA, the Duncan's multiple range test (1980) was used to determine which means were different. A probability < 0.05

was considered statistically significant.

RESULTS

All media from cells incubated in the absence or presence of steroid hormones without FSH-releasing factors, contained modest but clearly detectable amounts of immunoreactive secreted FSH. Exposure of culture anterior pituitary cells to both releasing factors GnRH and rhAct-A, promoted a significant increase in FSH secretion (Figure 1).

PAG-IEF patterns of secreted FSH

Media concentrates obtained from all incubation groups contained several forms of secreted FSH focusing within a pH range of 6.44 to 4.23 (Figures 2 and 3). To quantify differences in the isoelectric focusing pattern of secreted FSH between those groups differently stimulated, each PAG-IEF pattern was divided into three regions (area 1, pI value 6.5-6.0; area 2, pI value 5.9-5.0; area 3, pI value 4.9-4.0) and the amount of FSH present within each was determined. Secreted FSH recovered within each of these regions displaced ¹²⁵I-labelled FSH from the antibody in a parallel fashion (Figure 4A). Fifty one to 70% of total FSH recovered focused within a pI value of 4.9-4.0 (area 3), whilst 20 to 43% and 4 to 8% of total were identified within ranges of 5.9-5.0 (area 2) and 6.5-6.0 (area 1), respectively (Table 2). Addition of GnRH to control and E₂-primed cells significantly increased the release of FSH isoforms identified within area 2 (Figure 2 and Table 2); the presence of P₄ in the culture media prevented this GnRH-mediated effect (Figure 2, lower panel and Table 2). In those cell groups incubated in the presence of rhAct-A (groups VII to IX, Table 1), there were no significant shifts towards the release of less acidic (pI value >4.9) FSH isoforms (Figure 3 lower panel and Table 2).

Even though cells exposed to E₂ and rhAct-A (with or without priming with sex steroids), released lower relative amounts of FSH isoforms with pI values 5.9-5.0 than the controls (Table 2), their concomitant increase within the most acidic area of the gel was not significantly different from that observed in the control group.

To examine the receptor binding capacity of the secreted isoforms, FSH recovered within areas 2 and 3 were quantified by RRA; FSH material recovered from the less acidic pH range (area 1, pI value 6.5-6.0) was insufficient to perform these receptor binding studies. Even though FSH present in these two regions of the gel displaced ¹²⁵I-labelled FSH from the receptor preparation in a dose-dependent manner (Figure 4B), the receptor binding activity varied with the pI value of the particular area tested. Expressed as the RRA/RIA activity ratio, the receptor binding activity of FSH recovered from area 2 (pI value 5.9-5.0) was significantly higher than that exhibited by FSH from the most acidic region [RRA/RIA ratio of FSH from area 2, 2.56±0.29; FSH ratio from area 3, 0.83±0.03 (X±SD), (p<0.01)].

PAG-IEF patterns of intracellular FSH

Intracellular FSH recovered after completion of the incubation period was also present in multiple molecular forms (Figures 3 and 5). In all incubations the majority of intracellular FSH recovered was identified within pIs of 4.9 or less (61 to 91% of total, Table 3); in general, intracellular FSH was found to be more acidic than the hormone released (compare percent FSH recoveries within pH ranges 5.9-5.0 and <4.9 between Tables 2 and 3). In those cells incubated in the absence of GnRH, the amount of immunoreactive intracellular FSH identified within the pH range of 6.5 to 6.0 was minimal (approximately half the amount identified as hormone secreted) and there were not clearly distinguishable peaks of FSH in this area (Table 3). Cells incubated in the presence of GnRH alone and those treated with E₂ plus GnRH exhibited the highest relative amounts of

intracellular FSH recovered within a pI value of 5.9-5.0 [$p < 0.05$ for GnRH alone vs the remaining groups and for E_2 plus GnRH vs E_2 alone and E_2 plus P_4 (Table 3)].

DISCUSSION

It is well known that within a species, the glycoprotein hormones display a high degree of amino acid sequence conservation (Pierce & Parsons, 1981). However, each of these complex hormones is not a uniform molecular structure but rather an array of isoforms that are regulated hormonally (Ulloa-Aguirre et al, 1988a).

We have previously shown that rodent pituitary cells that have been enzymatically dissociated and cultured for at least four days, contain and secrete multiple species of FSH that may be separable by PAG-IEF (Ulloa-Aguirre, Coutifaris & Chappel, 1983). In the present study, rat anterior pituitary cells in culture released several isoforms of FSH, thus confirming and extending that report. However, under the particular conditions of the study, the PAG-IEF patterns of the hormone secreted varied depending on the treatment administered. Only those cell groups incubated in the presence of GnRH alone or in combination with E_2 , released forms of FSH with less acidic pI values and a higher receptor-binding activity, whilst cells treated with the potent FSH releasing factor Activin-A, secreted FSH molecules with pI values similar to those observed in control and steroid-enriched conditions. These findings are in agreement with those of Miller, Ulloa-Aguirre, Hyland & Chappel (1983) who demonstrated that hemipituitary glands from ovariectomized hamsters released a higher proportion of FSH molecules with pI values > 5.2 when incubated during a short period of time (2 h) in the presence of GnRH, but disagree with the observations of Blum & Gupta (1985) who were unable to detect differences between the chromatofocusing patterns of FSH secreted by anterior pituitaries incubated during four hours in the presence or absence of this releasing factor. These discordant results might be attributed to differences in

experimental designs and methods employed, including the addition of fetal calf serum to the media containing GnRH.

Considering that the synthesis and secretion of pituitary gonadotrophins induced by GnRH in static non-pulsatile in-vitro systems are apparently two uncoupled functional processes and that under these conditions the synthesis of gonadotrophins is negligible (Salton, Blum, Jonassen & Clayton, 1988; Shupnik, 1990; Weiss, Jameson, Burrin & Crowley, 1990), it is possible that the secreted isoforms of FSH identified in the present study represented stored and already synthesized fractions of FSH, rather than newly synthesized molecules. Furthermore, the majority of the FSH molecules recovered from the culture media as secreted forms, were probably released during the first hours following the addition of GnRH, since it is known that cells in culture incubated with GnRH for six hours become refractory to further stimulation by the releasing hormone, requiring 2 to 4 days to recover from this refractory condition (Jinnah & Conn, 1985). Likewise, it is also possible that GnRH had increased the release of less acidic FSH molecules through post-translational modifications in the structure of the oligosaccharide chains linked to their protein core, including their sialic acid content. Several lines of evidence support this hypothesis: 1. By indirect methods (neuraminidase treatment of anterior pituitary extracts) Ulloa-Aguirre et al (1984) have previously demonstrated that as the FSH molecules moves closer to the cathode and becomes less acidic, its sialic acid content decreases; 2. We have previously shown that enzymatic desialylation of an acidic FSH isoform with a pI value of 4.8, produced several peaks of immunoreactive FSH, with more basic pI values, that exhibited a higher affinity for Concanavalin A than that presented by the intact untreated molecule (Ulloa-Aguirre 1988b) and 3. Several studies have demonstrated that LH glycosylation may be modified by the addition of GnRH to cultured rat pituitaries, with little or no effect on apoprotein synthesis (Liu et al, 1976, Vogel et al, 1986, Ramey et al, 1987).

In contrast to GnRH, rhAct-A which is able to induce both synthesis and secretion of FSH in static in-vitro systems (Schwall, Nikolics, Szonyi et al, 1988; Attardi & Miklos, 1990), did not induce detectable increases in the pI values of the secreted FSH molecules. This finding strongly suggests that the changes in FSH synthesis and release induced by the static rhAct-A treatment were not coupled to significant and/or specific modifications in the final structure of the carbohydrates linked to the protein core of the FSH molecules to be secreted by the anterior pituitary cells. Even though the pI value of FSH molecules released by the addition of GnRH was unaffected by oestradiol, the presence of progesterone in the culture media prevented the GnRH-induced release of less acidic isoforms of the hormone. The finding that the release of FSH triggered by GnRH was unaffected by progesterone suggests that this steroid selectively influenced the mechanisms by which GnRH might modify FSH glycosylation, without any interference upon those mediating FSH release.

The overall data strongly suggest that in in-vivo conditions, the production and secretion of less acidic (and more biologically active) forms of FSH by the anterior pituitary gland is regulated by GnRH and that oestradiol might modulate this effect indirectly through temporal modifications in either the rate of synthesis and/or secretion of GnRH at the hypothalamic level or the pituitary responsiveness to this releasing hormone. Nevertheless, further studies are still required to clarify the exact mechanisms by which the pituitary gland may respond to an ever-changing endocrine environment by influencing not only the absolute amount but also the potency of the FSH signal to the gonad.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Rockefeller Foundation (New York, USA). The authors are indebted to the NIDDK for the generous gift of the FSH radioimmunoassay material.

REFERENCES

- Attardi, B. & Miklos, J. (1990). Rapid stimulatory effect of activin-A on messenger RNA encoding the follicle-stimulating hormone β -subunit in rat pituitary cell cultures. *Molecular Endocrinology* 4, 721-726.**
- Bex, F.J. & Corbin, A. (1981). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH agonist termination of pregnancy in hypophysectomized rats: extrapituitary site of action. *Endocrinology* 108, 273-280.**
- Blum, W. & Gupta, D. (1985). Heterogeneity of rat FSH by chromatofocusing: studies on serum FSH, hormone released in vitro and metabolic clearance rates of its various forms. *Journal of Endocrinology* 105, 29-37.**
- Blum, W., 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. *Journal of Endocrinology* 105, 17-27.**
- 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, 452-461.**
- Chappel, S.C., Coutifaris, C. & Jacobs, S.C. (1982) Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* 110, 847-854.**

- Chappel, S.C., Ulloa-Aguirre, A. & Ramkaley, J. (1983). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 28, 196-205.**
- Dufau, M.L., Tsurahara, T. & Catt, K.J. (1972). Interaction of glycoprotein hormones with agarose-Concanavalin A. *Biochimica et Biophysica Acta* 278, 281-292.**
- 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, 31-39.**
- Guevara-Aguirre, J., Schoener, G., Ulloa-Aguirre, A., Perez-Palacios, G. & Larrea, F. (1986). Induced hyperprolactinemia does not alter FSH binding or ABP secretion in the rat testis. *International Journal of Andrology* 9, 381-392.**
- Jinnah, H.A. & Conn, P.M. (1985) GnRH-stimulated LH release from rat anterior pituitary cells in culture: refractoriness and recovery. *American Journal of Physiology* 249, E619-625.**
- Khan, S.A., Katzija, G., Froyss, N. & Diczfalusy, E. (1984). Characterization of various molecular species of follicle-stimulating hormone in Baboon pituitary preparations. *Journal of Medical Primatology* 13, 295-304.**
- Liu, T.C., Jackson, G.L. & Gorsky, J. (1976). Effects of synthetic GnRH on incorporation of radioactive glucosamine and amino acids into LH and total protein by rat pituitaries in vitro. *Endocrinology* 98, 151-156.**

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. Fertility and Sterility 40, 242-247.

Padmanabhan, V., Lang, L.L., Sonstein, J., Kelch, R.P. & Beltinz, I.Z. (1988). Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 76, 465-473.

Pierce, J.G. & Parsons, T.F. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. Annual Review of Biochemistry 50, 465-495.

Ramey, J.W., Highsmith, R.F., Wilfinger, W.W. & Baldwin, D.M. (1987). The effects of gonadotropin-releasing hormone and estradiol on luteinizing hormone biosynthesis in cultured rat anterior pituitary cells. Endocrinology 120, 1503-

Robertson, D.M., Foulds, L.M. & Ellis, S. (1982). Heterogeneity of rat pituitary gonadotropins on electrofocusing; differences between sexes and after castration. Endocrinology 111, 385-391.

Salton, S.R., Blum, M., Jonassen J.A. & Clayton, R.N. (1988). Stimulation of pituitary LH secretion by GnRH is not coupled to β -LH gene transcription. Molecular Endocrinology, 2, 1033-1042.

Schwall, R.H., Nikolicz, K., Szonyi, E., Gorman, C. & Mason, A.J. (1988). Recombinant expression and characterization of human Activin-A. Molecular Endocrinology 2, 1237-1242.

Shupnick, M.A. (1990). GnRH effects on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration for LH- β gene stimulation. *Molecular Endocrinology* 4, 1444-1450.

Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics*, ed. 2. New York:McGraw Hill.

Ulloa-Aguirre, A., Coutifaris, C. & Chappel, S.C. (1983). Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured in vitro. *Acta Endocrinologica* 102, 343-350.

Ulloa-Aguirre, A., Damián-Matsumura, P., Espinoza, R., Dominguez, R., Morales, L. & Flores, A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *Journal of Endocrinology* 126, 323-332.

Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damián-Matsumura, P. & Chappel, S.C. (1988a). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Human Reproduction* 3, 491-501.

Ulloa-Aguirre, A., Espinoza, R., Damián-Matsumura, P., Larrea, F., Flores, A., Morales, L. & Domínguez, R. (1988b). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 38, 70-78.

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, 382-387.

- Vale, W., Grant, G., Amoss, M., Blackwell, R. & Guillemin, R. (1972). Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method. *Endocrinology* 91, 562-572.**
- Vogel, D.L., Magner, J.A., Sherins, R.J. & Weintraub, B.D. (1986). Biosynthesis, glycosylation, and secretion of rat α - and β -subunits: differential effects of orchectomy and GnRH. *Endocrinology* 119, 202-207.**
- Weiss, J., Jameson, J.L., Burrin, J.M. & Crowley, Jr. W.F. (1990). Divergent responses of gonadotropin subunits mRNAs to continuous vs. pulsatile GnRH in vitro. *Molecular Endocrinology* 4, 557-561.**
- Wide, L. (1982). Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 55, 682-688.**
- Wide, L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH. I. Zone electrophoresis in agarose suspension. *Acta Endocrinologica* 109, 181-189.**

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Immunoactive concentrations of FSH secreted from anterior pituitary cells in culture during exposure to GnRH, recombinant human Activin-A, oestradiol-17 β (E₂) and progesterone (P₄) alone or in different time-sequenced combinations (See Table 1). Bars identified by different letters are statistically different (p<0.05).

Figure 2. Representative patterns of pH distribution of immunoactive FSH secreted from pituitary cells in culture not-exposed (control) and exposed to oestradiol-17 β (E₂), oestradiol plus progesterone (P₄) or GnRH, alone or in different time-sequenced combinations (see Table 1). Numbers above each peak of immunoactivity indicate the isoelectric point of that isoform.

Figure 3. Representative patterns of pH distribution of intracellular FSH recovered after exposure to sex steroids or GnRH, alone or in different combinations. Numbers above each peak of FSH immunoactivity indicate the isoelectric point of that isoform.

Figure 4. A: The ability of secreted FSH molecules separated by PAG-IEF to displace ¹²⁵I-labelled FSH from the antibody in the FSH RIA system employed in this study. **B:** The ability of secreted FSH molecules with pI values 5.9-5.0 and 4.9-4.0 to displace ¹²⁵I-labelled FSH from the receptor preparation in the FSH RRA system.

Figure 5. Representative patterns of pH distribution of intracellular (upper graphs) and secreted (lower graphs) FSH recovered after exposure to rhAct-A (Activin-A), oestradiol-17 β (E₂) plus rhAct-A and oestradiol-17 β plus progesterone (P₄) plus rhAct-A. Numbers above each peak of FSH immunoactivity indicate the isoelectric point of that isoform.

TABLE 1**Summary of the Experimental Design**

Group	Treatment	days 1-3¹	days 3-4²	days 4-6²
I	Preincubation	None	None	None
II	Preincubation	None	Oestradiol³	Oestradiol
III	Preincubation	None	Oestradiol plus progesterone⁴	Oestradiol plus progesterone
IV	Preincubation	None	None	GnRH⁵
V	Preincubation	None	Oestradiol	Oestradiol plus GnRH
VI	Preincubation	None	Oestradiol plus progesterone	Oestradiol plus progesterone plus GnRH
VII	Preincubation	None	None	Activin-A⁶
VIII	Preincubation	None	Oestradiol	Oestradiol plus Activin-A
IX	Preincubation	None	Oestradiol plus progesterone	Oestradiol plus progesterone plus Activin-A

¹ No steroids or factors added; preincubation in the presence of 10% fetal calf serum

² Incubations in the absence of fetal calf serum

³ Oestradiol concentration, 3.67 nmol/l

⁴ Progesterone concentration, 31.8 nmol/l

⁵ GnRH concentration, 10 nmol/l

⁶ Activin-A concentration, 2 nmol/l

T A B L E 2

Changes in the pH distribution of secreted FSH from anterior pituitary cells in culture incubated in the presence or absence (controls) of sex steroids, FSH-releasing factors and FSH-releasing factors plus sex steroids. Values are means \pm S.D. (n= 3 to 5 IEF runs per group).

<u>Treatment</u>	<u>FSH per zone (as % of total recovered)</u>		
	<u>pl 6.5 - 6.0</u>	<u>pl 5.9 - 5.0</u>	<u>pl 4.9 - 4.0</u>
Control	5.3 \pm 1.8 ^a	32.1 \pm 1.2 ^a	65.6 \pm 1.0 ^{ab}
Oestradiol	5.5 \pm 2.8 ^a	21.7 \pm 1.9 ^b	72.9 \pm 4.5 ^b
Oestradiol+progesterone	3.6 \pm 1.4 ^a	19.7 \pm 5.0 ^{ab}	76.6 \pm 8.6 ^b
GnRH	5.8 \pm 0.9 ^a	43.2 \pm 2.0 ^c	51.1 \pm 1.4 ^c
Oestradiol+GnRH	7.3 \pm 1.6 ^a	39.4 \pm 2.5 ^c	53.3 \pm 3.6 ^c
Oestradiol+progesterone+GnRH	8.5 \pm 2.8 ^a	29.5 \pm 2.9 ^{ab}	61.5 \pm 3.8 ^{abc}
Activin-A	7.6 \pm 2.9 ^a	21.5 \pm 4.0 ^{db}	70.9 \pm 5.9 ^b
Oestradiol+Activin-A	6.8 \pm 1.0 ^a	25.1 \pm 1.9 ^{db}	68.1 \pm 2.9 ^b
Oestradiol+progesterone+Activin-A	6.5 \pm 4.1 ^a	20.1 \pm 2.2 ^{db}	73.4 \pm 6.3 ^b

Means identified by different superscript letters in the same column are statistically different ($p < 0.05$) (one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test).

T A B L E 3

Changes in the pH distribution of FSH recovered within anterior pituitary cells in culture incubated in the presence or absence (controls) of sex steroids, FSH-releasing factors and FSH-releasing factors plus sex steroids. Values are means \pm S.D. (n= 3 IEF runs per group).

<u>Treatment</u>	<u>FSH per zone (as % of total recovered)</u>		
	<u>pl 6.5 - 6.0</u>	<u>pl 5.9 - 5.0</u>	<u>pl \leq 4.9</u>
Control	2.4 \pm 0.6 ^{ad}	14.8 \pm 1.8 ^{ae}	82.8 \pm 1.3 ^{abf}
Oestradiol	1.8 \pm 0.4 ^a	6.4 \pm 1.0 ^{ab}	91.7 \pm 1.2 ^a
Oestradiol+progesterone	2.7 \pm 1.1 ^{ab}	10.7 \pm 1.0 ^{ab}	83.8 \pm 0.8 ^{ab}
GnRH	8.6 \pm 2.3 ^c	29.7 \pm 7.5 ^c	61.6 \pm 6.1 ^c
Oestradiol+GnRH	6.6 \pm 3.4 ^{cbd}	20.5 \pm 3.2 ^{de}	72.9 \pm 6.1 ^{df}
Oestradiol+progesterone+GnRH	7.9 \pm 0.9 ^c	14.8 \pm 0.7 ^{be}	77.3 \pm 1.3 ^{bde}
Activin-A	2.0 \pm 0.2 ^{ab}	14.9 \pm 1.0 ^{ae}	83.0 \pm 1.2 ^{ae}
Oestradiol+Activin-A	3.1 \pm 1.3 ^a	10.9 \pm 1.5 ^{ae}	85.9 \pm 2.9 ^{ae}
Oestradiol+progesterone+Activin-A	4.2 \pm 1.3 ^{ac}	11.2 \pm 3.4 ^{ae}	84.6 \pm 4.7 ^{ae}

Means identified by different superscript letters in the same column are statistically different ($p < 0.05$) (one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test).

**EXPERIMENTAL
CONDITION**

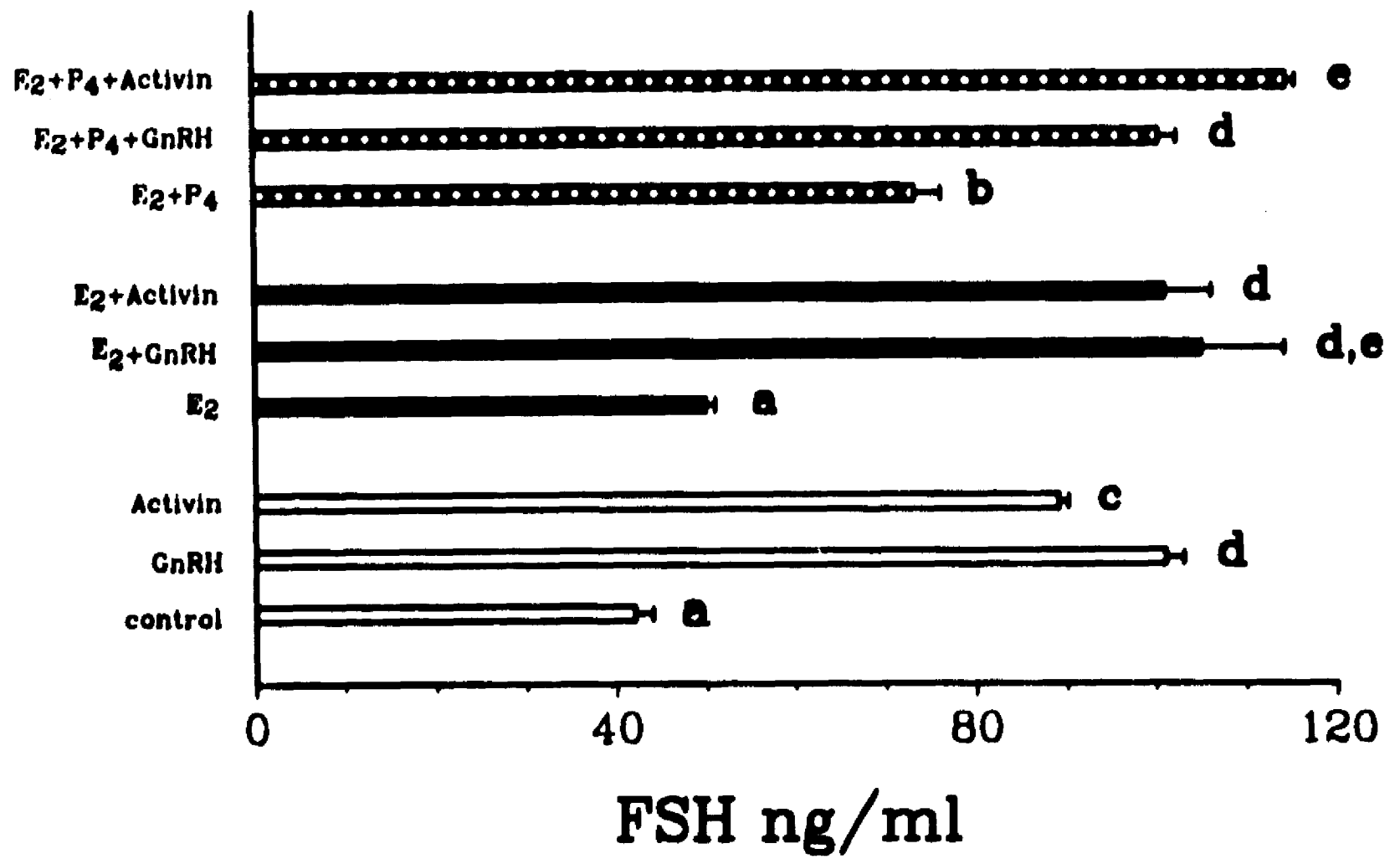


Figure 1

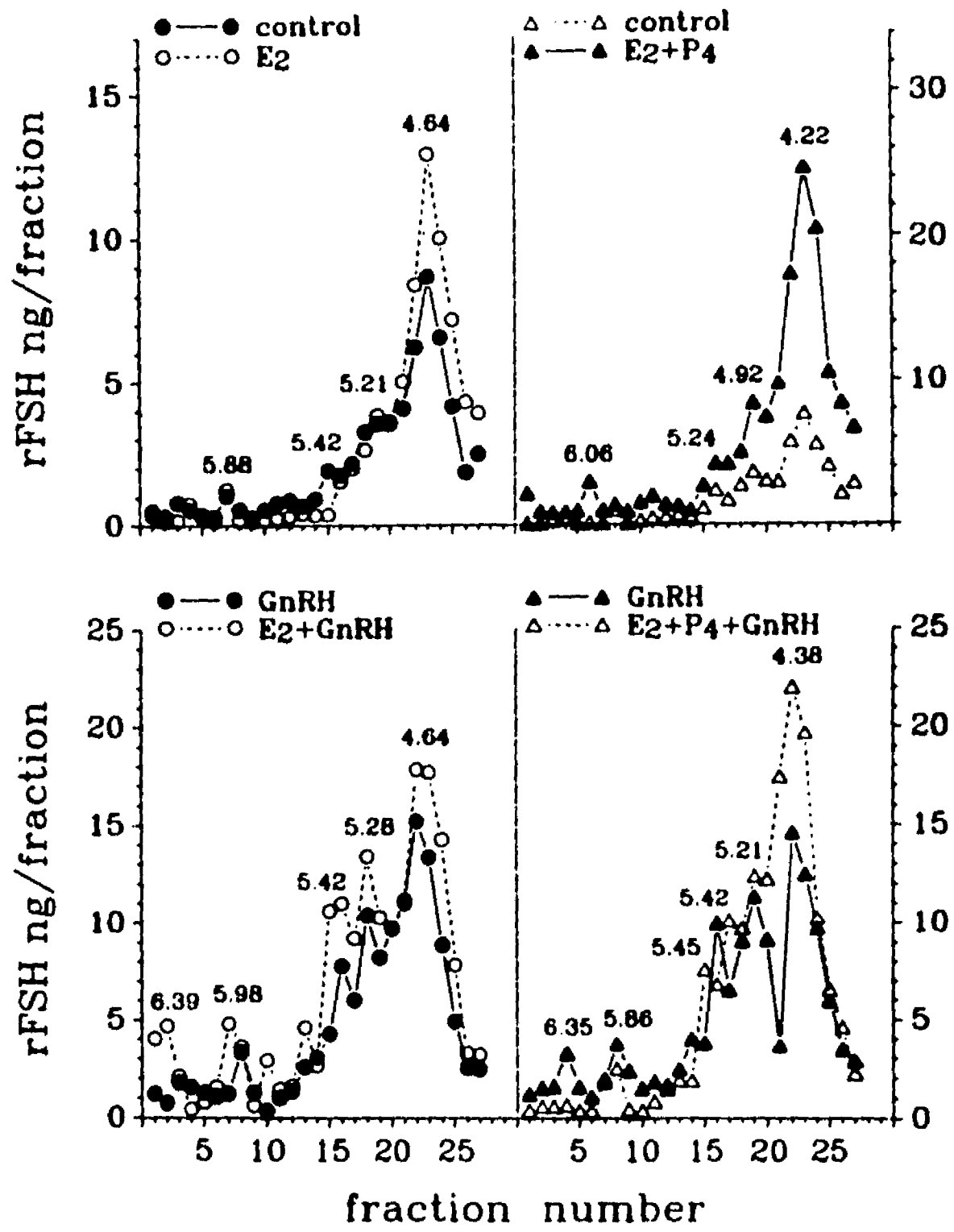


Figure 2

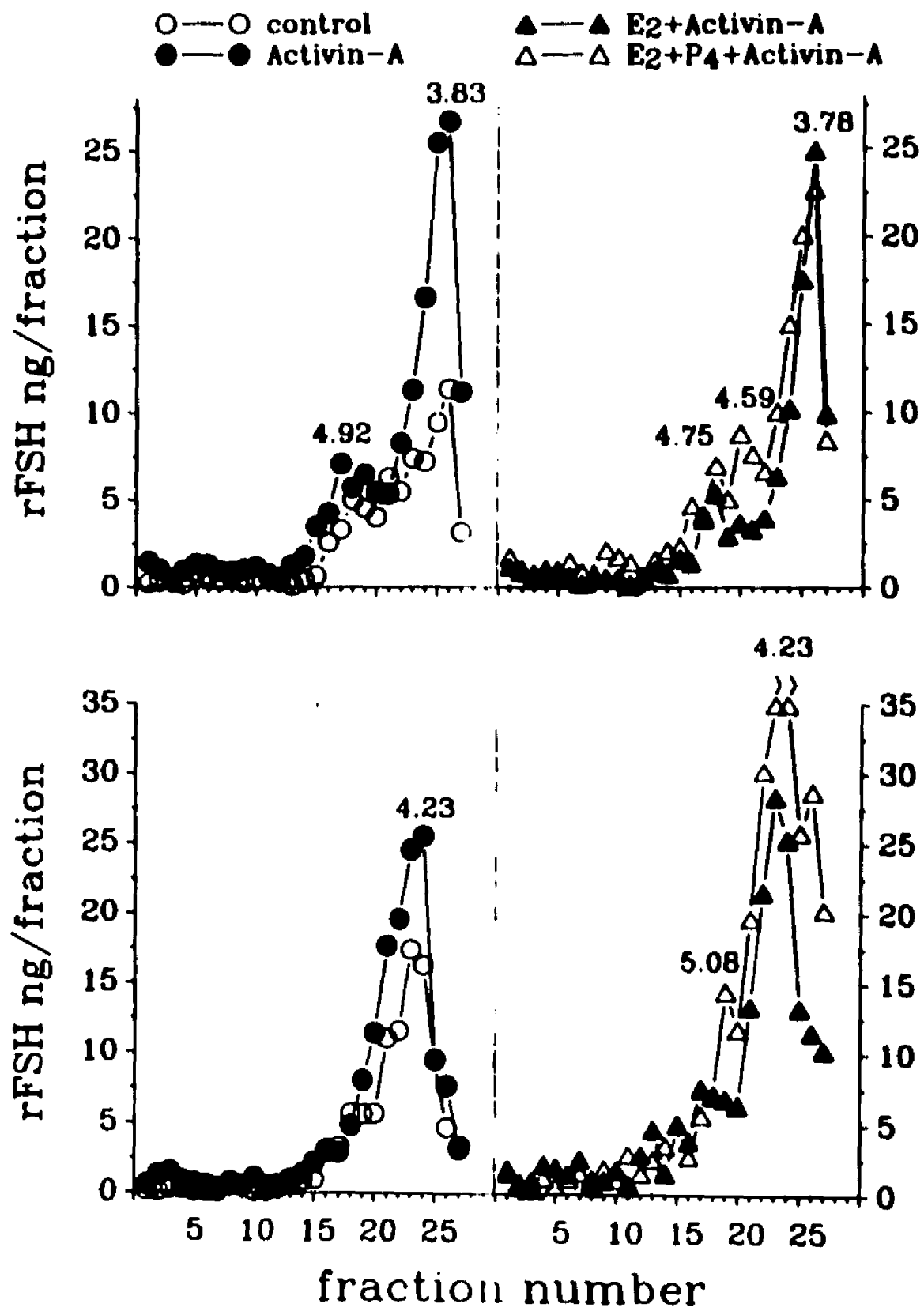


Figure 3

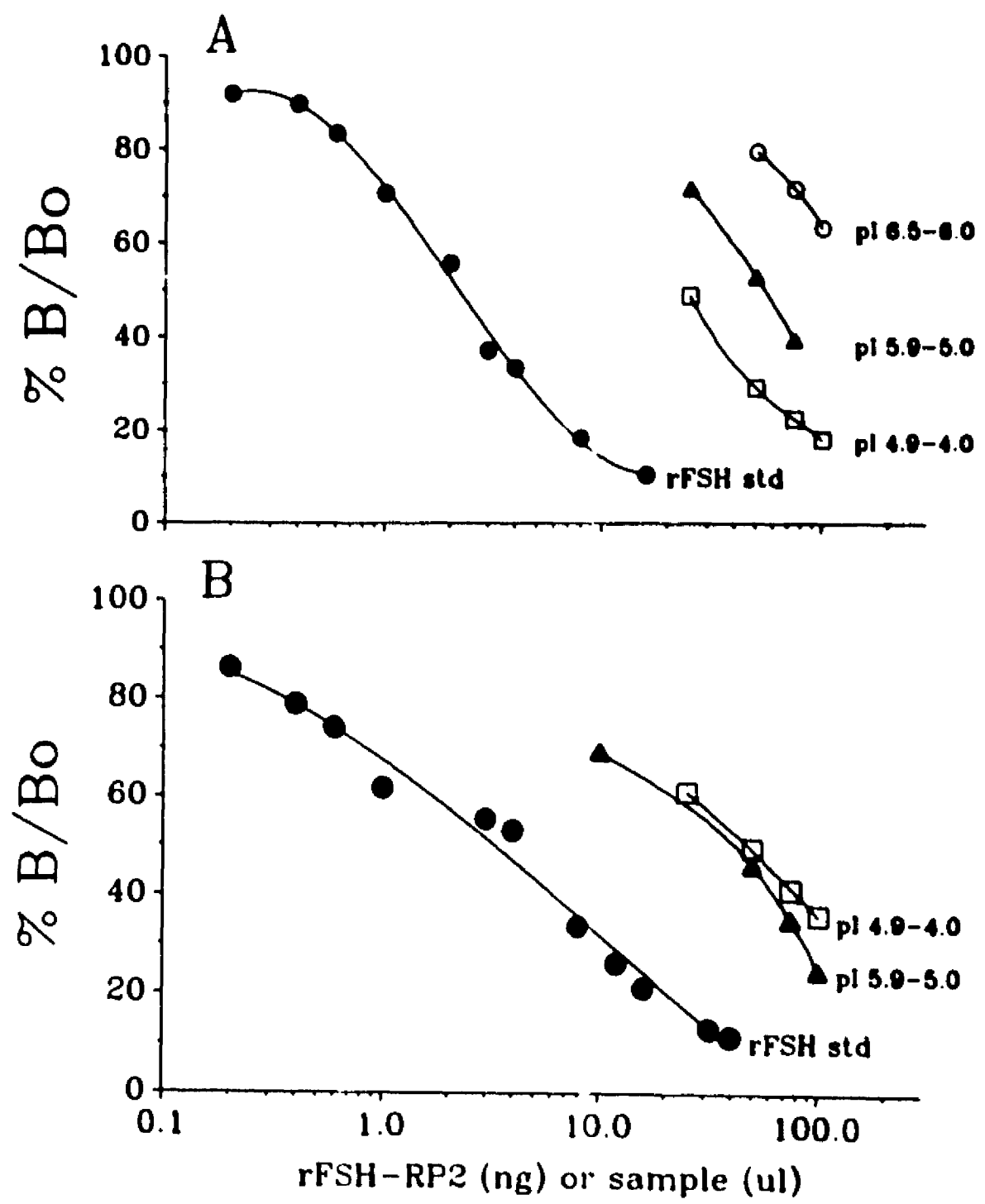


Figure 4

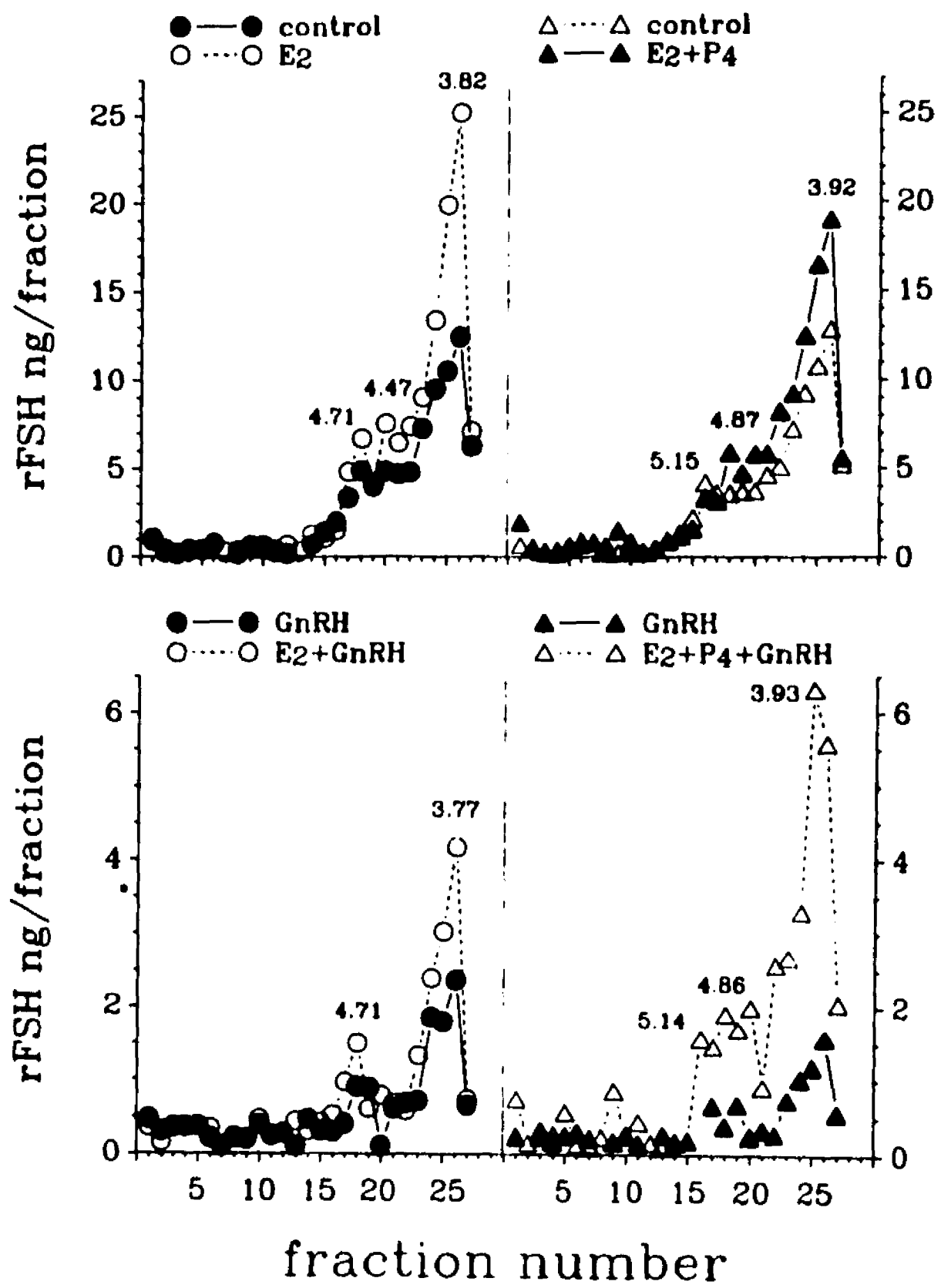


Figure 5