

0038/
13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA
alfa-2,3-SIALILTRANSFERASA Y SU RELACIÓN CON
LA HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA
HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLÍCULO EN LA
RATA HEMBRA

T E S I S

Que para obtener el título de
Doctor en Ciencias
(BIOLOGÍA)



Presenta:

Pablo G. Damián-Matzumura

Director de Tesis:

Dr. Alfredo Ulloa-Aguirre

TUTORES:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

México D.F. Mayo 2000



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 esta 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.

PREFACIO

Y di mi corazón a inquirir y a **buscar con sabiduría** sobre todo lo que se hace debajo del cielo; este penoso trabajo dio **DIOS** a los hijos de los hombres, para que se ocupen en él. Miré todas las obras que se hacen debajo del sol (...y nada hay nuevo debajo del sol); he aquí todo ello es vanidad y aflicción de espíritu. Lo torcido no se puede enderezar y lo incompleto no puede contarse.

Y dediqué mi corazón a **conocer la sabiduría**, y también a entender las locuras y los desvaríos; conocí que aun esto era aflicción de espíritu. Porque en la mucha sabiduría hay mucha molestia; y quien añade ciencia, añade dolor.

Buena es la ciencia con herencia, y provechosa para los que ven el sol. Porque escudo es la ciencia y escudo es el dinero; **mas la sabiduría excede**, en que da vida a sus poseedores. Mira la obra de Dios; porque
¿quién podrá enderezar lo que él torció?

Fragmento del Libro Eclesiastés, de La Santa Biblia
(Ecl 1:13-15, 17-18, 7:11-13)

Versión Reina-Valera, Revisión 1960.

DEDICATORIAS

A **DIOS**, por el grande gozo de SER,

A mis **padres Pablo y Eloína**, a mi **hermano Arturo**,
cuyo apoyo me ha permitido llegar a cumplir mis metas,

A mi **esposa Estela** y mi **hijo David**, por su infinita
paciencia, comprensión y amor,

A todos mis **alumnos** pasados, presentes y futuros, como
tributo a lo mucho que he aprendido de ellos.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que participaron en el desarrollo del presente trabajo de investigación, pero en especial a mis alumnas que realizaron una contribución importante en los experimentos realizados, las Biólogas Experimentales María del Carmen, Verónica y Angélica Maldonado.

Al Doctor Alfredo Ulloa Aguirre, mi director de tesis, a los Doctores Roberto Domínguez Casalá y Marco A. Cerbón Cervantes, mis asesores de tesis, y mis sinodales los doctores Fernando Larrea Gallo, Felipe Vadillo Ortega, Esther Cruz Beltrán, Leticia Morales Lezama e Ignacio Camacho Arrollo.

A la gente del Instituto Nacional de la Nutrición, en especial el apoyo recibido por parte del Dr. Fernando Larrea y la maestra Ana Elena Lemus, a mis compañeros y amigos de los diferentes laboratorios Angélica, René, Ruth, Sarita, Jorgelina, Aleida, Tere, Carlos, Lau, Elena, Ceci, Isabel, Lore, la Sra. Queta, Sumi, Mary, Roberto, Lulú, Gerardo, el Dr. Díaz, Mario, Martha, Conchita, Felipe, Silvia, Bety y Lupita. A mi buen amigo Ricardo Espinoza.

Un agradecimiento especial al MVZ Octavio Villanueva y la gente del bioterio del INNSZ, de quienes recibí apoyo incondicional e invaluable con los animales de laboratorio empleados.

A mis amigos de la UAM, en especial al Jefe del departamento de Biología de la Reproducción el Dr. Javier Velázquez, así como a Minerva, Arturo, José Luis, Carlos, Elizabeth, Ángeles, Rosalía, Diana y Susi.

A mis amigos de la FES Zaragoza, el Dr. Domínguez, Pati, Leti, Teté, Judith, Rebe, Male, Angi, Alex, las Lorenas y Caro

A la gente de la División de Estudios de Posgrado de la FES Zaragoza, en particular al Dr. Xavier Chiappa, al Lic. Eduardo Contreras y la Dra. Carmen.

A todas aquellas personas que, aunque injustamente no menciono por sus nombres, hicieron que esta tesis se hiciera realidad.

El presente trabajo fue apoyado económicamente por una beca de PADEP-Tesis Doctoral-UNAM número 500303 y por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud-UAM para el bienio 1999-2000 en su sesión 5.99.

ÍNDICE

	PÁGINA
PREFACIO	i
DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
1) ABSTRACT	1
2) RESUMEN	2
3) INTRODUCCIÓN	3
4) ANTECEDENTES	4
5) HIPÓTESIS	23
6) OBJETIVOS	24
7) METODOLOGÍA	25
A) Modelos experimentales	25
B) Síntesis de la sonda de ST3N	27
C) Análisis de la expresión del ARNm-ST3N	29
D) Separación de las isoformas de la FSH	32
E) Radioinmunoensayos	33
F) Análisis de datos	33
8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
A) Síntesis del ARNm-ST3N	35
B) Expresión del ARNm-ST3N	37
C) Isoformas de la FSH de rata	52
D) Concentraciones hormonales	59
9) CONCLUSIONES	64
10) BIBLIOGRAFÍA	69

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA
 α 2,3-SIALILTRANSFERASA Y SU RELACIÓN CON LA
HETEROGENEIDAD POR CARGA DE LA HORMONA ESTIMULANTE
DE LOS FOLÍCULOS (FSH) EN LA RATA HEMBRA**

1.- ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone is synthesized by the anterior pituitary gland in multiple molecular forms. Increased acidic/sialylated FSH charge isoforms are associated with conditions characterized by a low estrogen output. In the present study, I analysed the dynamics of the changes in mRNA levels of the enzyme Gal β 1,3[4]GlcNAc α 2,3-sialyltransferase (ST3N) (one of the enzymes that incorporate sialic acid residues into the FSH molecule) in intact, ovariectomized and anti-estrogen and estrogen-treated rats. The anterior pituitaries of 4-day regularly cycling adult female Wistar rats were obtained at 1000 h on the days of proestrus (P), estrus (E), diestrus 1 (D1) and diestrus 2 (D2), at 0200 h, 1400 h, 1800 h and 2200 h on D1, at 1800 h of E and at 1000 h after 7, 14, 21, 28 and 45 days of oophorectomy performed on the morning of P. Total RNA was isolated from each gland and the ST3N-mRNA levels were measured by Northern blot hybridization analysis employing a 346-base pair cDNA probe encoding for a non-conserved aminoacid sequence of the catalytic domain of the enzyme. Maximal levels of the enzyme mRNA were detected at 1000 h of D1; thereafter, they progressively decreased by 60% during the ensuing 24 h, reaching the lowest concentration values (26% of maximally observed at D1) at 1000 h of P and remaining unchanged during the morning of E. Administration of the potent estradiol-receptor antagonist ICI 182,780 at 1000 h of D1 completely reverted the time-dependent decrease in ST3N-mRNA levels observed during the afternoon of D1, whereas estradiol benzoate administered at 1000 h of E significantly reduced the enzyme mRNA levels (to 21% of the levels detected in vehicle treated controls). In ovariectomized rats, the ST3N-mRNA progressively increased from day 21 to day 45 postcastration. Administration of estradiol benzoate on day 28 after oophorectomy significantly reduced the ST3N-mRNA levels (to 36% of the levels detected in vehicle-injected controls). The pure anti-estrogen ICI 182,780 partially counteracted this estradiol-mediated effect both in intact and castrated rats. The dynamics of this changes in ST3N-mRNA levels partially correlated with changes in the relative abundance of the FSH charge isoforms separated by preparative chromatofocusing of anterior pituitary extracts, particularly in glands obtained during the morning of P and E. These data demonstrate for the first time that pituitary ST3N is a hormonally-regulated enzyme and that the changes in transcription and/or stability of its mRNA may be involved, in part, in the post-translational processing of the FSH molecule during certain physiological conditions.

2.- RESUMEN

En la presente tesis se analizó la dinámica de los cambios en las concentraciones del mensajero del ácido ribonucleico (ARNm) que codifica para la enzima Gal β 1.3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferasa (ST3N) en la adenohipófisis de la rata hembra durante el ciclo estral, después de la castración y en animales tratados con compuestos con actividad estrogénica y antiestrogénica. Esta enzima incorpora residuos de ácido siálico en la hormona estimulante de los folículos (FSH), lo cual modifica el grado de sialización de la misma, dando lugar a múltiples isohormonas por carga que son secretadas a la circulación.

Para llevar a cabo los estudios, se obtuvo la adenohipófisis de ratas hembra de la cepa Wistar, con ciclos regulares de 4 días, a diferentes horas en los días del proestro, estro, metaestro y diestro, así como a los 7, 14, 21, 28 y 45 días después de la remoción de los ovarios y después de tratamientos con compuestos con actividad estrogénica y anti-estrogénica. Se aisló el ARN total de cada hipófisis y se cuantificó la concentración del ARNm de la enzima por medio de estudios de hibridación (Northern blot), usando una sonda de 346 pares de bases de ADN complementario que codifica para la región altamente específica de la región catalítica de la enzima. La máxima concentración del ARNm-ST3N se detectó a las 10:00 h del día de metaestro, así como en las hipófisis de animales sacrificados después de 28 días de castración. La administración de benzoato de estradiol (BE) en la mañana del estro y en el día 28 post-ovariectomía indujo una reducción significativa en las concentraciones del ARNm-ST3N a las 24 h, en comparación con los animales tratados con vehículo. La administración del antiestrógeno inhibió el efecto del incremento estrogénico endógeno, así como el del BE, observándose un incremento en las concentraciones del ARNm-ST3N. La dinámica observada de los cambios del ARNm de esta enzima se correlacionaron con un incremento en la abundancia relativa de las isoformas menos ácidas/sializadas de la FSH intrahipofisaria. Estos resultados demuestran por primera vez que la enzima ST3N intrahipofisaria de rata se encuentra regulada hormonalmente y que los cambios en la regulación de su transcripción, en la estabilidad de su ARNm, o en ambos, son responsables, al menos en parte, de las variaciones en la distribución por carga de las isoformas de la FSH observadas durante el ciclo estral de la rata.

3.- INTRODUCCIÓN

El lóbulo anterior de la hipófisis de los mamíferos secreta ocho hormonas peptídicas, entre las que se encuentran 1) la hormona adrenocorticotrópica (ACTH o corticotropina), 2) la hormona del crecimiento (GH, somatotropina o STH), 3) la prolactina (PRL, hormona lactógena, mamotropina, hormona luteotrópica, LTH o luteotropina), 4) la hormona estimulante de los melanocitos gamma (γ -MSH), 5) la β -lipotropina (β -LPH), 6) la hormona estimulante de la tiroides (TSH o tirotropina), 7) la hormona luteinizante (LH, luteotropina, hormona estimulante de células intersticiales o ICSH) y 8) la hormona folículo-estimulante (FSH, estimulante de los folículos o folitropina) (Ganong, 1987).

Las cinco primeras son proteínas de cadena simple, mientras que las tres últimas son parte de una familia de proteínas heterodiméricas glicosiladas (Pierce y Parsons, 1981; Ward y cols., 1991; Bousfield y cols., 1994). Estas glicoproteínas experimentan un proceso de maduración por la incorporación de carbohidratos en el retículo endoplasmático (RE) inmediatamente después de su síntesis y la modificación posterior de los mismos por la adición y remoción de carbohidratos en el aparato de Golgi (AG), con lo cual se completa su maduración para ser enviadas a sus gránulos secretorios correspondientes (Baenziger y Green, 1988).

La FSH es producida por los gonadotropos adenohipofisarios y secretada a la circulación en múltiples formas moleculares debido a que, como última modificación post-traducciona se le adicionan grandes cantidades de residuos de ácido siálico, que es un monosacárido con carga eléctrica negativa. La formación de isoformas moleculares de la FSH le confiere propiedades características a cada subpoblación, tales como la modificación de su vida media plasmática, de su capacidad de interaccionar con su receptor y de sus potencias biológicas *in vitro* e *in vivo* (Wilson y cols., 1990; Ulloa-Aguirre y cols., 1995). La adición de ácido siálico a los carbohidratos terminales de la molécula de FSH se realiza en la región "trans" del AG en el gonadotropo por un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, denominadas sialiltransferasas (Hirschberg y Snider, 1987).

La importancia del estudio de la regulación hormonal de la enzima que le adiciona residuos de ácido siálico a la molécula de FSH, la Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferasa (ST3N), está sustentada por informes recientes que demuestran que la actividad de diferentes glicosiltransferasas, que modifican a otras hormonas glicoproteicas son reguladas hormonalmente, como en el caso de las glicosiltransferasas que adicionan grupos sulfatos a la LH (Dharmesh y Baenziger, 1993), las galactosiltransferasas, las manosidasas y otras sialiltransferasas que modifican los carbohidratos de la TSH (Franc y cols., 1984; Helton y Magner, 1994b; Helton y Magner, 1994a) así como de otras glicosiltransferasas que modifican a la prolactina (Manzella y cols., 1997). Se ha propuesto que la sialización confiere importantes propiedades biológicas a la FSH y con el estudio de la regulación de la ST3N se pretende explicar, por lo menos en forma parcial, el mecanismo molecular por el cual se genera la microheterogeneidad por carga de esta hormona, la cual ha sido ampliamente estudiada por el grupo de investigación al que pertenezco.

4.- ANTECEDENTES

Propiedades biológicas de la FSH

La FSH pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas constituida por la LH, la TSH y la gonadotropina coriónica (hCG) placentaria. Estas hormonas están formadas por dos cadenas polipeptídicas denominadas subunidad alfa (α) y subunidad beta (β). Las subunidades α de todas las glicohormonas son idénticas entre sí, mientras que el monómero β es específico para cada hormona confiriéndole a cada una su especificidad inmunológica y biológica (Pierce y Parsons, 1981).

Las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH son sintetizadas en los gonadotropos de la hipófisis anterior y son captadas selectivamente por las gónadas, donde se unen a sus respectivos receptores, interviniendo principalmente en la esteroidogénesis y en la gametogénesis. En la rata, la vida media plasmática de la FSH es de aproximadamente 110 minutos y la de la LH de ~20 minutos (Gharib y cols., 1990).

Estas hormonas tienen un papel fundamental en los procesos reproductivos de los mamíferos; sus principales acciones son las de estimular y mantener la función de las gónadas. En el humano, la FSH mantiene el epitelio espermático en el varón y es responsable del crecimiento y el desarrollo de los folículos ováricos en la mujer, así como de estimular la producción de estrógenos por los folículos en maduración. Por otro lado, la LH estimula la síntesis de testosterona y es trófica para las células de Leydig en el varón; en la mujer induce la maduración final de los folículos ováricos, indirectamente estimula la síntesis de estrógenos, induce luteinización y la formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona y, en conjunto con la FSH, regula la ovulación (Ganong, 1987)(Ganong, 1987; Beitins y Padmanabhan, 1991).

La síntesis y liberación cíclica de la FSH es controlada mediante sistemas de retroalimentación positiva (estimulación) y negativa (inhibición) por la acción de diferentes factores entre los que se encuentran los esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos), el péptido hipotalámico denominado hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y los péptidos gonadales inhibinas, activinas y folistatina (Gharib y cols., 1990) (Figura 1). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la síntesis y secreción de la FSH y la LH se lleva a cabo en los mismos tipos celulares de la adenohipófisis, los gonadotropos, donde son almacenadas en diferentes gránulos secretores; su secreción se encuentra regulada de forma independiente pero estrechamente coordinada (Chappel y cols., 1983a; Haisenleder y cols., 1994).

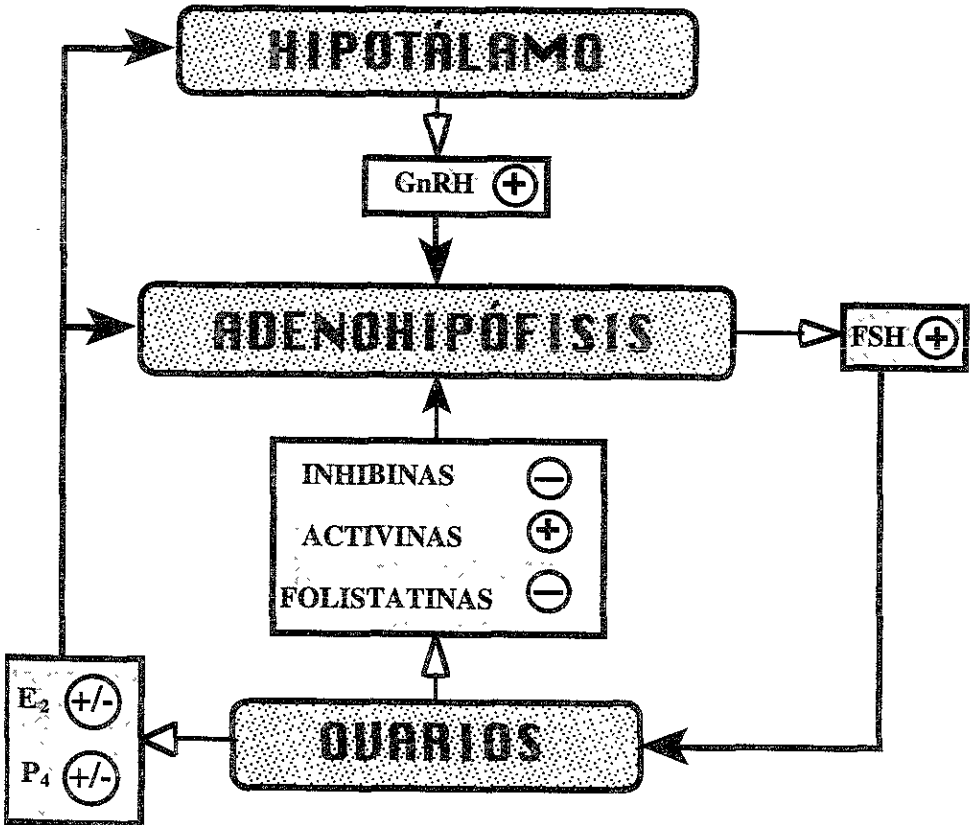


Fig. 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La regulación de la síntesis y secreción de la FSH en los gonadotropos está controlada por diferentes factores, entre los que se encuentran el péptido hipotalámico GnRH, los esteroides gonadales estradiol (E₂) y progesterona (P₄), así como los péptidos gonadales: inhibinas, activinas y follistatina. Las flechas en blanco indican secreción hormonal, las flechas en negro indican que la hormona tiene efecto sobre un tejido, el signo positivo es para estimulación y el negativo para inhibición (modificado de Gharib y cols., 1990).

La FSH estimula específicamente la activación del sistema de enzimas que catalizan la conversión de la testosterona en estrógenos, las aromatasas y también estimula la producción de las enzimas relacionadas con la activación del plasminógeno, enzima clave en el rompimiento folicular durante la ovulación (Galway y cols., 1990b). Se pensaba que la LH era la única responsable de iniciar los procesos ovulatorios, sin embargo se ha observado que la FSH puede inducir por sí misma el desarrollo folicular y la ovulación (Galway y cols., 1990 a,b; Beitins & Padmanabhan, 1991).

Características bioquímicas de la FSH

La FSH tiene un peso molecular aproximado de 30,000 daltones y está formada por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas que son codificadas por dos genes diferentes (Bousfield y cols., 1994). Estas cadenas están unidas por enlaces no covalentes que estabilizan la estructura terciaria de la molécula; además cada subunidad contiene dos cadenas de oligosacáridos del tipo complejo o ramificado, cada una ligada covalentemente al grupo amino de la cadena lateral de la asparagina (Asn).

La subunidad α (α -FSH) de la rata está constituida por 96 aminoácidos, mientras que la subunidad β (β -FSH) de 111. Ambas presentan dos sitios de N-glicosilación, la subunidad α en los residuos 56 y 82 (Asn⁵⁶ y Asn⁸²) y la β -FSH en Asn⁷ y en Asn²⁴. Al igual que la humana, los oligosacáridos de la FSH de rata terminan en su mayoría en ácido siálico, mientras que la FSH ovina y la bovina tienen terminaciones mixtas de ácido siálico y de sulfatos (Rathman y Saxena, 1984; Green y Baenziger, 1988a; Green y Baenziger, 1988b).

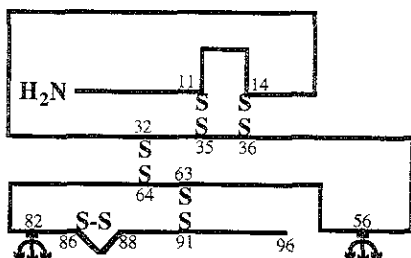
La FSH ha sido la glicoproteína más difícil de aislar en forma pura, sin contaminantes de LH, debido a su alta inestabilidad y la concentración relativamente baja encontrada en la hipófisis anterior; a pesar de ello ya ha sido determinada su secuencia y sintetizada con metodología recombinante (Galway y cols., 1990a). Tanto en la adenohipófisis como en el plasma se han encontrado múltiples formas de la FSH, siendo atribuida esta microheterogeneidad principalmente a variaciones en las cargas negativas terminales (Chappel y cols., 1982; Ulloa-Aguirre y cols., 1995).

Subunidades de la FSH

La subunidad α se transcribe a partir de un mismo gen en diferentes tipos celulares y el péptido es idéntico para las cuatro hormonas glicoproteicas (α -FSH/LH/TSH/hCG), siendo específico para cada especie. Por otro lado, la subunidad β es específica para cada hormona (β -FSH, β -LH, β -TSH, β -CG) y también varía de especie a especie. Esta propiedad le confiere a cada hormona características inmunológicas y biológicas únicas en su células blanco. En la figura 2 se esquematizan las estructuras de ambas subunidades (Reichert, 1971a; Thotakura y Blithe, 1995).

Como muchas otras proteínas de secreción, las subunidades α -FSH y β -FSH son transcritas a partir de diferentes genes y traducidas en los ribosomas que se encuentran asociados a la membrana del retículo endoplasmático, lugar donde se ensamblan las subunidades y se inicia el proceso de maduración post-traducciona por glicosilación. Posteriormente, en el aparato de Golgi se realiza la modificación final mediante la adición y remoción de los carbohidratos necesaria para ser clasificadas como proteína de secreción, liberada y así enviada a su destino final (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Hirschberg y Snider, 1987; Gharib y cols., 1990).

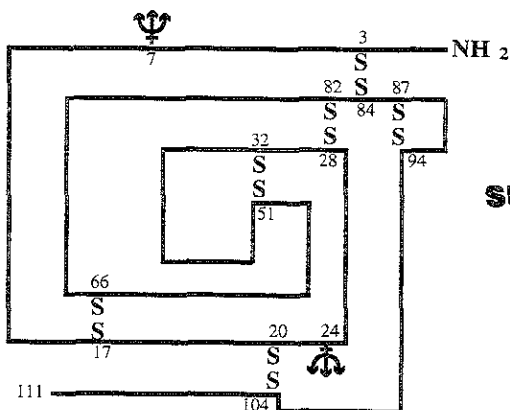
A)



**SUBUNIDAD
ALFA**

(α)

B)



**SUBUNIDAD
BETA
(β -FSH)**

Fig. 2 Representación esquemática de las subunidades de la FSH de rata. A) Subunidad alfa (α) común para las glicohormonas hipofisiarias; B) β -FSH. Los números señalan las posiciones de los aminoácidos donde se encuentran las cisteínas, que se indican por el enlace disulfuro de la cistina (S-S) y la de las asparaginas a las que se les adicionan oligosacáridos (Ψ).

Subunidad alfa (α)

Mediante técnicas de biología molecular se han determinado las estructuras de las subunidades α en el bovino (Goodwin y cols., 1983), el ratón (Chin y cols., 1981), el humano (Fiddes y Goodman, 1979), la rata (Godine y cols., 1982; Burnside y cols., 1988) y en líneas celulares tumorales humanas (Boothby y cols., 1981).

En el caso de la α -FSH de rata se ha descrito la presencia de una secuencia líder de 24 aminoácidos, además de la estructura de 96 aminoácidos que conforman al péptido maduro. La secuencia de esta subunidad presenta un total de 10 residuos de cisteínas (C) en las posiciones 11, 14, 32, 35, 36, 63, 64, 86, 88, 91 que dan lugar a la formación de 5 cistinas por la formación de puentes disulfuro (S-S) entre los grupos tiol de las cisteínas en las posiciones: 11-35, 14-36, 32-64, 63-91 y 86-88, lo cual le confiere rigidez relativa a su estructura terciaria (Godine y cols., 1982) (Fig. 2A).

En la figura 3 se muestra la secuencia consenso de aminoácidos que componen a la subunidad alfa de las gonadotropinas de la rata, incluyendo la secuencia líder. Se ha sugerido que este péptido señal sirve como identificación para que la proteína recién formada (pre-FSH) pueda ser dirigida hacia el receptor membranal específico, lo que le permite cruzar a través de un canal proteico; así mismo se postula que el péptido señal es removido por una peptidasa durante su paso por este receptor membranal (Jackson y Blobel, 1980).

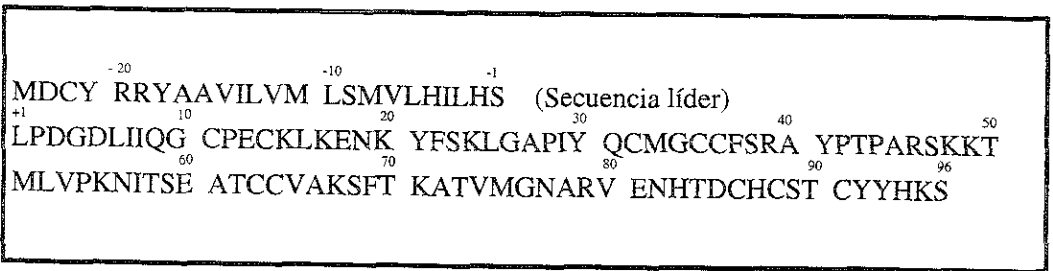


Fig. 3. Secuencia de aminoácidos de la subunidad α de rata, donde: A=alanina; B=asparagina ó ácido aspártico indistintamente; C=cisteína; D=ácido aspártico; E=ácido glutámico; F=fenilalanina; G=glicina; H=histidina; I=isoleucina; K=lisina; L=leucina; M=metionina; N=asparagina; P=prolina; Q=glutamina; R=arginina; S=serina; T=treonina; V=valina; W=triptofano; Y=tirosina; Z=glutamina ó ácido glutámico indistintamente.

La subunidad α es codificada por un solo gen formado por 4 exones y 3 intrones que se expresa en tirotropos, trofoblastos y en gonadotropos. El tamaño del gen que codifica a la subunidad α varía según la especie (humano 6.4 Kb, bovino 13.0 Kb, ratón 10 Kb, rata 5.4 Kb) dependiendo del tamaño del primer intrón (Chin y cols., 1983). Aunque el tamaño de los intrones es variable, sus posiciones en el gen son constantes y se conserva entre las diferentes especies ya que comparando las secuencias nucleotídicas de este gen, presentan un grado de homología del 70% (Nilson y cols., 1983). El ARNm de la subunidad alfa está constituido por 730-800 nucleótidos, los cuales codifican para el péptido líder y la proteína madura (Chin y cols., 1983).

Subunidad beta (β)

La estructura de la subunidad β-FSH de rata está codificada por un gen constituido por 3 exones y 2 intrones. En la región 3' de este gen existe una zona de aproximadamente 1-1.5 Kb que es transcrita pero no traducida; a esta región se le han atribuido papeles de protección y estabilidad para el ARNm maduro, el cual mide ~1.3 Kb. Las secuencias de los nucleótidos del gen y de los aminoácidos de la FSH están altamente conservadas entre las diferentes especies (Gharib y cols., 1987; Gharib y cols., 1989).

La secuencia de la β-FSH de rata posee una secuencia líder de 19 aminoácidos y 111 residuos para el péptido completo (Fig. 3); contiene 12 cisteínas en las posiciones: 3, 17, 20, 28, 32, 51, 66, 82, 84, 87, 94, 104, las que forman 6 puentes disulfuro entre las cisteínas que se encuentran en 3-84, 17-66, 20-104, 28-82, 32-51, 87-94, siendo este último determinante para la estabilidad de la conformación terciaria del péptido (Maurer y Beck, 1986; Gharib y cols., 1989) (Fig. 2B). La posición de las cisteínas permanece constante entre las subunidades β-FSH de las diferentes especies estudiadas: rata (Maurer, 1987), ratón, humano (Shome y cols., 1988), bovino, ovino (Maurer y Beck, 1986) y porcino (Sugino y cols., 1989).

En la figura 4 se muestra la secuencia consenso de aminoácidos que componen a la subunidad β-FSH de la rata, incluyendo su secuencia líder (Haisenleder y cols., 1994).

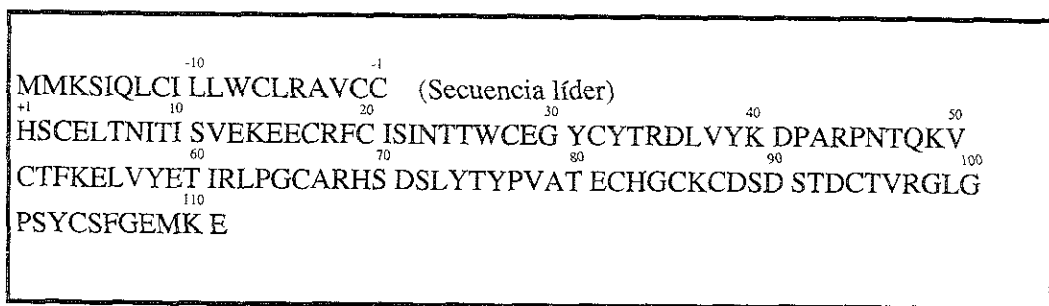


Fig. 4. Secuencia de aminoácidos de la subunidad β-FSH de rata. Las abreviaturas de los aminoácidos son las mismas que en la figura 3.

Glicosilación

A pesar de que la LH y la FSH presentan una subunidad α común y de que sus subunidades β tienen un cierto grado de homología, sus oligosacáridos difieren en sus carbohidratos terminales. Mientras que la LH tiene terminaciones sulfatadas con la secuencia: $\text{SO}_4\text{-4-GalNAc } \beta\text{-1,4 GlcNAc } \beta\text{-1,2 Man}\alpha$, la FSH presenta terminaciones sializadas con la secuencia: $\text{AS-}\alpha\text{-Gal}\beta\text{-1,4 GlcNAc}\beta\text{-1,2 Man}\alpha$ (donde: GalNAc=N-acetilgalactosamina; GlcNAc=N-acetilglucosamina; Man=manosa y AS=ácido siálico) en estructuras bi-, tri- y tetra-antenarias, principalmente biantenarias (Baenziger y Green, 1988; Green y Baenziger, 1988a). La gama de estructuras de carbohidratos presentes en la FSH y LH indican que la síntesis de oligosacáridos sulfatados y sializados está regulada y que podría tener importancia funcional (Smith y cols., 1990). Para la β -FSH, los carbohidratos son necesarios para la conformación de la hormona plegada que faciliten el apareamiento adecuado de los puentes disulfuro (Suttajit y cols., 1971; Stockell Hartree y Renwick, 1992), para la determinación de su vida media plasmática y la correcta interacción con su receptor (Bishop y cols., 1994).

Debido a que el contenido de carbohidratos de cada hormona glicoproteica es diferente entre sí, existe gran variedad de residuos de carbohidratos diferentes que pueden conformar a cada glicoproteína. La presencia de cantidades variables de residuos terminales de carbohidratos con carga eléctrica negativa en las gonadotropinas les confiere características aún más especiales ya que una misma glicohormona puede presentar diversas formas moleculares (Ulloa-Aguirre y cols., 1988a; Chappel, 1995). Esta característica ha sido empleada para poder separar isoformas de FSH con base a su carga (Ulloa-Aguirre y cols., 1988b, 1995). Los oligosacáridos que se unen a las glicoproteínas en el retículo endoplásmico rugoso (RER) están unidos, en su mayoría, al grupo amino ($-\text{NH}_2$) de la cadena lateral del residuo de Asn de la proteína y son denominados N-ligados, en comparación a los O-ligados que se unen a los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) de la cadena lateral de los residuos de serina (Ser), treonina (Thr) o hidroxilisina (OH-Lys) (Kornfeld y Kornfeld, 1985); la FSH de todas las especies presenta solamente oligosacáridos N-ligados. La glicosilación se inicia en el lumen del RE y es selectiva sólo para la secuencia: $\text{H}_2\text{N-Asn-[X]-(Ser/Thr)-COOH}$, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, lo que le confiere alta especificidad a este proceso (Hirschberg y Snider, 1987; Becker y cols., 1996).

Como se observa en la figura 5, la traducción de las subunidades α y β de la FSH se lleva a cabo en el RER al mismo tiempo que su glicosilación en los residuos de Asn, así como su asociación no covalente para formar el heterodímero α - β . El "núcleo" del oligosacárido que se le adiciona a la proteína naciente es sintetizado en el lumen del RER antes de ser transferido a la proteína y es activado por un enlace pirofosfato de alta energía que lo une al lípido membranal dolicol, la molécula donadora, que lo ancla fuertemente a la superficie luminal.

Sialiltransferasas

Las sialiltransferasas son una familia de, por lo menos, 15 diferentes enzimas que se encuentran relacionadas entre sí por su función común de transferir ácido siálico a las posiciones terminales de los oligosacáridos (principalmente a los residuos de galactosa) de las glicoproteínas y los glicolípidos, usando como sustrato donador al ácido neuroamín-citosín-monofosfato (CMP-NeuAc) y generando un enlace de alta especificidad (Kitagawa y Paulson, 1994b; Tsuji y cols., 1996).

Recientemente se ha definido la topología de las sialiltransferasas en la membrana de la cisterna trans del AG, describiéndose como proteínas transmembranales del tipo II que consisten de una región en el extremo amino terminal de 9 aminoácidos hacia el citoplasma (dominio citoplasmático), un dominio de anclaje transmembranal de 17 aminoácidos, un "tallo" de 35 aminoácidos sensible a proteólisis y un dominio catalítico de longitud variable que se proyecta hacia el lumen del AG (Figura 6) (Kleene y Berger, 1993). Las regiones del amino terminal y del tallo pueden ayudar a la enzima a tomar su lugar dentro de la membrana (Colley y cols., 1992); no son esenciales para su actividad ya que la pérdida de este anclaje convierte a la enzima en soluble, pero conservando su actividad (Dahdal y Colley, 1993; Colley y cols. 1989).

Todas las sialiltransferasas contienen una región altamente conservada de 48-49 aminoácidos en el centro del dominio catalítico denominada sitio de sialización ("sialilmotif"), la cual participa en la unión del CMP-NeuAc a la cadena de oligosacáridos aceptora (Datta y Paulson, 1995). La secuencia de esta región ha sido empleada en la caracterización y el análisis del funcionamiento de otros miembros de esta familia de enzimas (Livingston y Paulson, 1993). Se han descrito en algunas sialiltransferasas dos regiones de homología, denominando a la previamente descrita "L-sialilmotif" y a esta última "S-sialilmotif", la cual participa en la interacción tanto con el donador como del aceptor, lo cual ha generado subgrupos de esta familia de enzimas aislados en diversas especies y tejidos (Datta y cols., 1998).

Cada enzima es altamente específica en el reconocimiento de la secuencia del oligosacárido aceptor y en la formación del enlace anomérico formado entre el ácido siálico y el azúcar al cual es adherido, el cual puede ser α o β , lo cual da nombre a cada miembro de esta familia de sialiltransferasas (Baenziger, 1994).

Hasta 1987 solamente se tenía información del ADNc (ADN complementario al ARNm) de la Gal β 1,4 GlcNAc α 2,6-sialiltransferasa (ST6N), la cual se aisló y purificó por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos cebadores cuyas secuencias de bases se sintetizaron a partir de su secuencia de aminoácidos (Weinstein y cols., 1987).

En 1992 se logró clonar y expresar el ADNc de una segunda sialiltransferasa, la Gal β 1,3 GalNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3O) (Gillespie y cols., 1992), que es responsable de la síntesis de la secuencia: ácido siálico- α 2,3 Gal β 1,3 GalNAc-encontrada en oligosacáridos O-ligados, así como también de la secuencia terminal de ciertos gangliósidos. Se observó que esta enzima presenta dos formas formadas por un procesamiento postranscripcional alternativo, una de 47-49 KDa y otra de 45 KDa. Ambas isoenzimas encontradas en el hígado de la rata presentan una región de homología de 45 aminoácidos con 65% de identidad (Wen y cols., 1992b).

Posteriormente, se aisló en hígado de rata el ADNc de otra sialiltransferasa, la Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3N) (Wen y cols., 1992a), misma que también fue aislada de placenta humana (ST3N, HP-1) (Kitagawa y Paulson, 1993), encontrándose un 91% de homología de nucleótidos y un 97% de aminoácidos entre ambas especies; sin embargo, se informó que la enzima de placenta humana prefiere cadenas aceptoras Gal β 1,4 GalNAc (Tipo 2), mientras que la ST3N de hígado de rata tiene mayor afinidad tanto por cadenas aceptoras Gal β 1,3 GlcNAc (Tipo 1) como para cadenas Gal β 1,3 GalNAc (Tipo 3) (Kitagawa y Paulson, 1994a; Kitagawa y cols., 1996). Estudios de análisis de ARNm por la técnica de hibridación por Northern blot reveló que el gen se expresa en bajas concentraciones en la placenta humana, pero mantiene expresión abundante en el músculo esquelético y otros tejidos fetales humanos (Kitagawa y Paulson, 1994b).

En el caso de la FSH, se piensa que la sialización la realiza específicamente la Gal β 1.3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3N) por el tipo de unión que presentan los residuos de ácido siálico terminales con las galactosas de sus oligosacáridos, donde se forman las secuencias **ÁCIDO SIÁLICO- α 2,3 Gal β 1,3 GlcNAc** y **ÁCIDO SIÁLICO- α 2,3 Gal β 1,4 GlcNAc** encontradas en los complejos terminales de las cadenas de oligosacáridos N-ligados de la FSH (Fig. 6) (Baenziger y Green, 1988).

A finales de 1992 se encontró actividad de la Gal β 1,4 GlcNAc-R α 2,3-sialiltransferasa (ST3N) y de la Gal β 1,4 GlcNAc-R α -2,6-sialiltransferasa (ST6N) en el hígado y la placenta humana, detectando como actividad predominante en el hígado la de la ST3N, mientras que en la placenta la mayor actividad la presentó la ST6N (Nemansky y cols., 1992).

Posteriormente se logró clonar el gen de la sialiltransferasa que identifica la secuencia Gal β 1,4 Glc(Gal)NAc, mediante la síntesis de cebadores basados en las secuencias nucleotídicas previamente reportadas para la región de "L-sialilmotif" en cerebro de rata recién nacida, describiéndose que el gen para esta enzima presenta un patrón de regulación muy específico, puesto que solamente se expresa en el cerebro y al momento del nacimiento, a pesar de que no se ha podido explicar satisfactoriamente el motivo de esta actividad exclusiva (Livingston y Paulson, 1993).

CITOPLASMA

APARATO DE GOLGI (lumen)

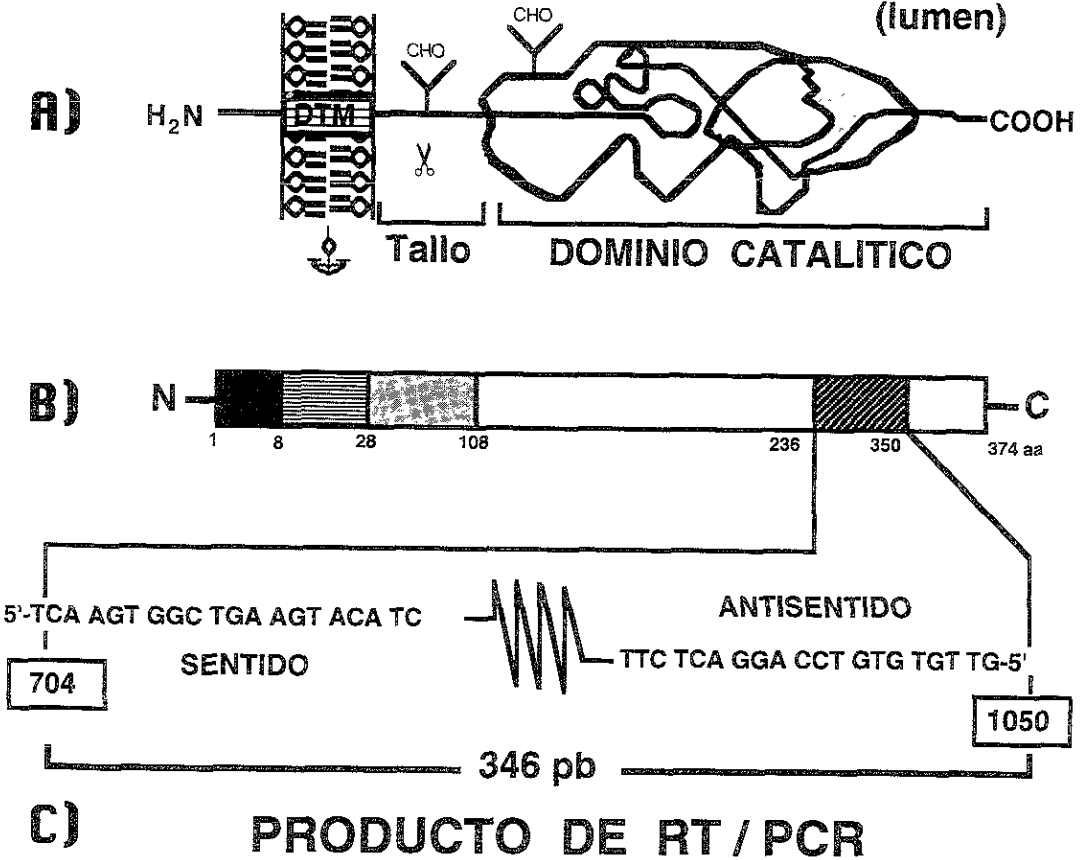


Fig. 6 Representación esquemática de la enzima α 2,3-sialiltransferasa [ST3N]. A) Dominios estructurales de la enzima y su probable distribución topológica con respecto a la membrana del Aparato de Golgi (AG): el dominio transmembranal (DTM, que le sirve como anclaje) está unido al dominio catalítico por un "tallo" que puede ser cortado enzimáticamente; Y=sitios de N-glicosilación, CHO=oligosacáridos. B) Diagrama de la enzima con las regiones de los dominios correspondientes: la región de 8 aa en el amino terminal se encuentra en la porción citoplasmática, mientras que el resto de la molécula (~370 aa) se encuentra en la parte del lumen del AG. C) Secuencias de los 2 oligonucleótidos empleados para sintetizar un producto por RT-PCR de 346 pb que sirvió como sonda en el análisis de hibridación por "Northern Blot". Los números debajo de la primera base de cada oligonucleótido representan su ubicación con respecto a la secuencia del ADNc reportada previamente (Wen y cols., 1992a).

Regulación Hormonal de las Sialiltransferasas

Desde el punto de vista de regulación de la expresión de las sialiltransferasas, se ha informado que la tiroxina puede regular diferencialmente la expresión de la enzima ST6N sin afectar la síntesis de la ST3N en cultivo celular de tirocitos (Grollman y cols., 1993), mientras que en condiciones patológicas (hipertiroidismo) se ha observado un incremento de los ARNm de la ST3N asociado con el desarrollo patológico de los timocitos, encontrándose variaciones notables de esta enzima durante la maduración del tejido y entre las regiones medular y cortical (Helton y Magner, 1994a; Helton y Magner, 1995), así como de otras dos glicosiltransferasas, (la β 1,4-galactosiltransferasa y la α -manosidasa II) en forma diferencial (Helton y Magner, 1994b). Además, se ha descrito la asociación entre el proceso de sialización de la TSH y sus efectos sobre la actividad hormonal en tumores hipofisarios (Magner y cols., 1992).

Se ha informado que los glucocorticoides pueden inducir la síntesis de diferentes miembros de la familia de las sialiltransferasas de manera específica para diferentes tejidos *in vivo* (Coughlan y cols., 1996; Hamr y cols., 1997), en líneas celulares (Coughlan y Breen, 1998), durante el desarrollo (Kolinska y cols., 1988) y en la sialización de proteínas séricas (Maguire y cols., 1998).

Otras hormonas que tienen actividad reguladora sobre las sialiltransferasas son la insulina (Cohen-Forster y cols., 1990), los estrógenos (Dharmesh y Baenziger, 1993) y posiblemente otras hormonas ováricas (Nelson y cols., 1975; Nelson y cols., 1977), las cuales pueden regular a las sialiltransferasas en forma directa por medio de la modificación de factores de transcripción específicos de las sialiltransferasas (Svensson y cols., 1990; Svensson y cols., 1992) o indirectamente. El análisis en otros tejidos en desarrollo, como la retina de rata, ha revelado cambios en la distribución del ARNm de la ST6N durante el proceso de desarrollo postnatal de este tejido (Uehara y cols., 1993).

Debido a que se han observado mecanismos de regulación no hormonal y hormonal de diferentes sialiltransferasas que transfieren ácido siálico terminal a la TSH, en la presente tesis se postula que la adición de ácido siálico a la molécula de FSH se encuentra finamente regulado por estímulos hormonales de origen ovárico o hipotalámico.

Estructuras de los carbohidratos de la FSH

Han sido descritas las secuencias de los oligosacáridos N-ligados de la LH, TSH y FSH de bovino, ovino y humano, siendo una característica común para estas especies la presencia de oligosacáridos terminales en su mayoría sulfatados para la LH ovina y bovina (Baenziger y cols., 1992), mientras que los carbohidratos terminales de la TSH (Grollman y cols., 1993), la tiroglobulina (Monaco y cols., 1975) y la FSH (Rafferty y cols., 1995) son casi exclusivamente estructuras sializadas.

La sulfatación y la sialización de los oligosacáridos regulan características importantes como la vida media plasmática y la tasa de depuración de la hormona (Manzella y cols., 1995) y en menor grado, la capacidad de unión al receptor (Baenziger y cols., 1992) y la transducción de señales (Cerpa-Poljak y cols., 1993; Bishop y cols., 1994; Suttajit y cols., 1971; Thotakura y cols., 1994; Hoffmann y cols., 1993). Los oligosacáridos de la molécula de FSH presentan gran diversidad de estructuras; sin embargo, todas se encuentran unidas a la proteína mediante el enlace N-glicosídico y comparten el oligosacárido central (núcleo) formado de varios residuos de GlcNAc y Man, variando en los demás azúcares. En la rata, el ratón y el humano la gran mayoría el azúcar terminal es el ácido siálico, (figuras 7 y 8) y en mucho menor proporción azúcares terminales sulfatados (SO₄⁼), como se muestra en la figura 9. También se han encontrado oligosacáridos neutros, pero su abundancia es baja, por lo que ha sido difícil su caracterización (Green y Baenziger, 1988a).

A continuación se esquematizan los oligosacáridos más abundantes encontrados en la molécula de FSH con sus estructuras bi- (Fig. 7) y tri-antenarias (Fig. 8), conteniendo solamente residuos de ácido siálico terminal, así como estructuras bi-ramificadas con terminaciones mixtas sulfatadas y con ácido siálico (Fig. 9).

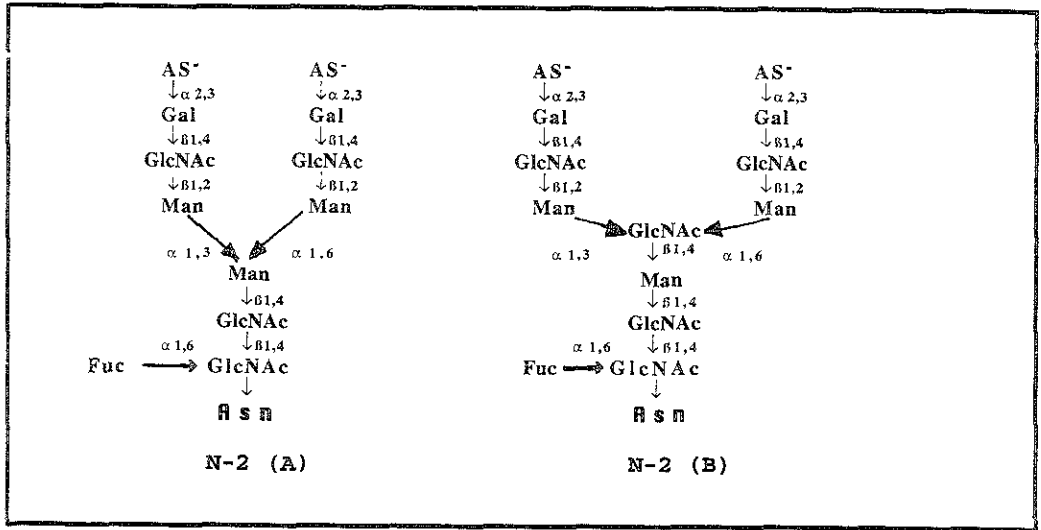


Fig. 7 Estructura de los oligosacáridos N-glicosilados con terminaciones sializadas bi-ramificadas presentes en la FSH de rata y humano principalmente. La nomenclatura sobre las flechas indica el tipo de interacción entre dos azúcares, es decir, si presenta el enlace α , indica que el grupo hidroxilo del carbono anomérico del monosacárido más cercano a la proteína se encuentra en posición α ; de igual manera sucede con la posición B. Asn=asparagina, GlcNAc=N-acetil glucosamina, Fuc=fucosa, Man=Manosa, Gal=galactosa. AS=ácido siálico.

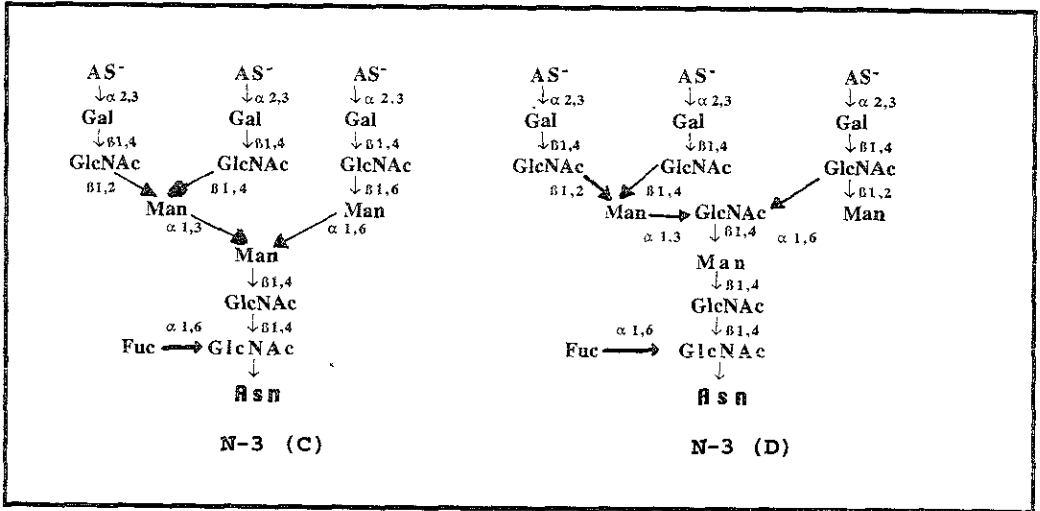


Fig. 8 Estructura de los oligosacáridos N-glicosilados con terminaciones sializadas tri-ramificadas presentes en la molécula de FSH. Las claves son las mismas que en la figura 7.

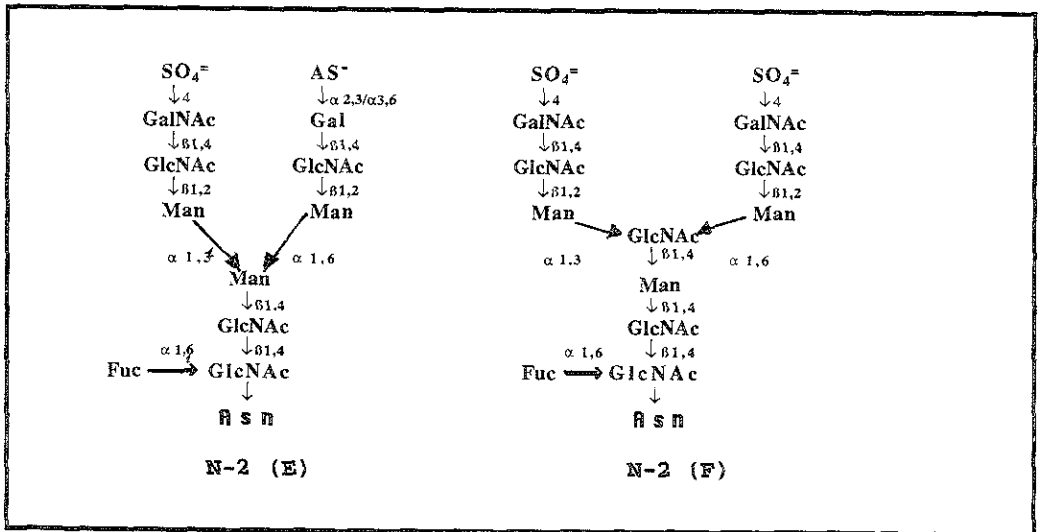


Fig. 9 Estructura de los oligosacáridos N-glicosilados con terminaciones bi-ramificadas mixtas sializadas (AS^-) y sulfatadas ($SO_4^{=}$) presentes en la FSH. Las claves son las mismas que en la figura 7.

Papel biológico de la sialización de la FSH

La importancia biológica de la glicosilación de la FSH ha sido estudiada bajo diferentes condiciones y se ha demostrado que la remoción del ácido siálico disminuye específicamente la capacidad de interacción con su receptor, pero sin abatirla totalmente (Ryan y cols., 1987; Stanton y cols., 1996); sin embargo, su bioactividad se afecta notablemente por la presencia de mayor o menor cantidad de ácido siálico en las posiciones terminales (Ronin, 1992; Flack y cols., 1994b; Simoni y cols., 1994).

Por esta razón se considera que la modificación post-traduccionaI más importante en la molécula de FSH es la que lleva a cabo la **ST3N**, tema de esta tesis, (Fig. 6), la cual le confiere variaciones en su estructura molecular y, por tanto, la formación de múltiples isohormonas con propiedades fisiológicas características para cada una, tales como la vida media plasmática, la capacidad de unión al receptor y su actividad biológica *in vitro* e *in vivo* (Dahl y Stone, 1992; Ulloa-Aguirre y cols., 1995; Lambert y cols., 1998).

Actividad Biológica de las Isoformas de la FSH

Cuando la molécula de FSH presenta menor cantidad de residuos de ácido siálico, se generan isoformas menos ácidas, con mayor afinidad por su receptor y por tanto mayor respuesta hormono-específica (p. ej. producción de AMP cíclico). Por otro lado, la vida media plasmática de las isoformas con mayor contenido de ácido siálico (ácidas) aumenta notablemente, por lo que se ha establecido una relación inversamente proporcional entre la vida media circulante y la bioactividad de la hormona con el grado de sialización de la misma (Ulloa-Aguirre y cols., 1995)

A pesar de que las variantes menos ácidas son eliminadas más rápidamente de la circulación. éstas presentan afinidad de unión al receptor tres veces mayor que las formas más ácidas (Flack y cols., 1994a); sin embargo, el efecto neto *in vivo* de las diferentes isoformas de FSH en términos de biopotencia es poco claro ya que ésta es una combinación de diferentes factores que incluyen la vida media plasmática, la afinidad de unión al receptor y la capacidad de transducción de señal entre otros (Padmanabhan y cols., 1991; Ronin, 1992; Valove y cols., 1994).

Diferentes metodologías han sido empleadas en la separación de las distintas formas moleculares de la FSH, como son el isoelectroenfoque (Reichert, 1971b) y el cromatoenfoque (Ulloa-Aguirre y cols., 1990), las cuales se basan en la capacidad de separar las diferentes variantes de la misma molécula de acuerdo a sus puntos isoelectrónicos (pI). Así las isohormonas con más ácido siálico tendrán un pI más ácido (denominadas **ÁCIDAS** o **MÁS ÁCIDAS**) y las que tengan menos estructuras sializadas presentarán un pI menos ácido (llamadas **BÁSICAS** o **MENOS ÁCIDAS**).

Con la finalidad de demostrar que las isoformas de la FSH varían en función de la cantidad de ácido siálico presente en las posiciones terminales de la molécula, se realizaron experimentos *in vitro* en los cuales se obtuvieron isoformas básicas mediante digestiones a diferentes tiempos con la enzima neuraminidasa, por la remoción selectiva del ácido siálico, a partir de una preparación con alto contenido en formas ácidas (Ulloa-Aguirre y cols., 1984).

Regulación de la Síntesis de las Isoformas de la FSH

Se postula que el polimorfismo de la FSH se encuentra regulado hormonalmente de acuerdo a las características fisiológicas propias de cada etapa del ciclo reproductivo en los mamíferos (Chappel, 1995); esto ha sido ampliamente demostrado en roedores (Chappel y cols., 1983b; Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982), en primates no humanos (Chappel y cols., 1984), en bovinos (Cooke y cols., 1997), en ovinos (Phillips y cols., 1996) y en humanos (Wide, 1982).

Se han realizado estudios con respecto al patrón de distribución por carga de las isoformas de la FSH circulante, determinándose que éste varía en el humano dependiendo del sexo (Wide, 1982), la edad (Wide, 1989), el desarrollo gonadal normal y patológico en varones (Harsch y cols., 1993; Phillips y Wide, 1994; Phillips y cols., 1997), la fase del ciclo menstrual (folicular, periovulatoria y lútea) (Wide y Bakos, 1993; Wide y cols., 1995; Anobile y cols., 1998), así como antes y después de la menopausia en mujeres con remplazo estrogénico (Wide y Naessen, 1994; Wide y cols., 1995).

Las conclusiones obtenidas de estos estudios indican que 1) en general, la hipófisis de la mujer secreta más isoformas básicas de la FSH (más potentes) que el varón; 2) en adultos jóvenes la FSH adenohipofisaria es más ácida que en individuos prepúberes, 3) se secretan isoformas básicas a la circulación en mayor número durante la etapa reproductiva del humano, mientras que la producción de variantes de FSH más ácidas se incrementa a medida que aumenta la edad reproductiva del individuo y en la menopausia; 4) en la mujer, las isoformas básicas son predominantes en la etapa periovulatoria, mientras que las ácidas se incrementan durante las etapas folicular y lútea.

El hecho de que se han encontrado mayor proporción de isoformas de FSH menos ácidas después de la inyección de altas dosis de testosterona en hombres sanos y que pacientes con deficiencia androgénica presentan isoformas circulantes menos ácidas, apoyan la idea de que los andrógenos juegan un papel importante en la inducción de cambios cualitativos en la FSH (Harsch y cols., 1993). Dichas modificaciones pueden ser, al igual que las inducidas por los estrógenos, mediadas indirectamente por la GnRH.

Sin embargo, otras observaciones apoyan la idea contraria ya que el tratamiento con testosterona a ratas bloqueadas con fenobarbital (que inhibe la liberación de GnRH inducida por estradiol) provocan cambios en el patrón de distribución de carga de la FSH hipofisiaria, aumentando la proporción relativa de las formas más ácidas con el concomitante decremento de las formas básicas, mientras que el tratamiento con GnRH restablece este decremento (Galle y cols., 1983). Así mismo, en cultivos de células hipofisarias suplementadas con testosterona se incrementó la proporción relativa de isoformas más ácidas.

En otras especies, la regulación endócrina del pleomorfismo de la FSH también depende del estado endócrino del animal, para lo cual se han realizado estudios durante los ciclos reproductivos en bovinos (Kojima y cols., 1995), ovinos (Suttajit y cols., 1971) y en la rata. Se informó que en ratas hembra cíclicas, el contenido de isoformas de FSH menos ácidas y de vida media corta, se incrementa selectivamente durante el medio día e inicio de la tarde del proestro, previo a la ovulación (Chappel y cols., 1983b; Ulloa-Aguirre y cols., 1988b).

Esta observación es apoyada por la manipulación quirúrgica y/o farmacológica de hembras de roedores, lo que ha permitido determinar que las formas moleculares de la FSH son más ácidas en ausencia de estrógenos endógenos (ovariectomía) (Chappel y cols., 1982), mientras que el estradiol (E_2) y la testosterona (Ulloa-Aguirre y cols., 1990) revierten el efecto de la ovariectomía. En roedores y primates, el aumento en la concentración plasmática de E_2 eleva la proporción relativa de las formas menos ácidas de FSH, mientras que en ovinos y bovinos el efecto de E_2 es diametralmente opuesto o no tiene ningún efecto. Por otro lado, en cultivos de células de hipófisis de rata, en condiciones basales o estimulados con GnRH, el patrón de distribución de las isoformas de FSH no se alteró por la adición de E_2 , lo que permite sugerir que la modulación de la heterogeneidad de la FSH por E_2 puede ser mediada por cambios en la secreción de GnRH hipotalámica (Ulloa-Aguirre y cols., 1992c).

Evidencias indirectas en roedores y humanos permiten sugerir que los andrógenos también afectan la heterogeneidad de la FSH (Simoni y cols., 1992; Rulli y cols., 1996). Se ha observado que en ratas machos, la FSH intrahipofisiaria es invariablemente más ácida que en hembras (Ulloa-Aguirre y cols., 1988b). Además, ratas macho castrados presentan isoformas de FSH hipofisarias menos ácidas (Simoni y cols., 1992), mientras que en hámsters machos se presenta un efecto contrario (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982).

La GnRH tiene un papel importante en la regulación de la heterogeneidad de la FSH. Estudios realizados en ratas hembra prepúberes, donde se piensa que la secreción de GnRH se incrementa, mostraron que el patrón de distribución de las isoformas de FSH cambia (Chappel y cols., 1983b). Empleando cultivos celulares de hipófisis de rata suplementados con GnRH se observó que contenían y secretaban mayores cantidades de las isoformas de FSH menos ácida, con respecto a las células control, mientras que el estradiol no modificó dicho patrón de distribución (Ulloa-Aguirre y cols., 1992c). Estos resultados son contradictorios con otras especies, especialmente en ovinos, donde el fenómeno es inverso (Padmanabhan y cols., 1997).

Ciclo Ovárico de la rata

El ciclo estral se divide en 4 etapas principales:

1) Proestro, (pro, antes de) período en el cual el animal inicia la entrada al celo o "calor", dura de 12 a 14 horas y se caracteriza por predominancia de células epiteliales nucleadas en la citología vaginal.

2) Estro (del latín oistros, deseo vehemente) período en el que la hembra es receptiva sexualmente a la cópula con el macho y además si ésta sucede se puede llevar a cabo la concepción, dura de 25 a 27 horas y en el frotis vaginal predominan las células epiteliales escamosas cornificadas, de forma irregular, núcleo no visible y con citoplasma granular.

3) Metaestro (o Diestro 1), etapa posterior al estro, en caso de que no haya fecundación, donde la hembra entra en un período corto de remodelación del tracto reproductivo (6 a 8 horas), caracterizada por la infiltración de leucocitos observados en el frotis vaginal.

4) Diestro (o Diestro 2), etapa en la cual el tracto reproductivo se prepara nuevamente para recibir el óvulo fertilizado en el siguiente ciclo, dura de 55 a 57 horas, en el frotis vaginal predominan los leucocitos, que tienden a desaparecer hacia el final de esta etapa y aparecen células epiteliales nucleadas que se hacen más numerosas conforme se aproxima nuevamente la etapa del proestro (Freeman, 1994).

El patrón de secreción de la FSH durante el ciclo estral es similar al de la LH (Fig. 10; Smith y cols. 1975 y Freeman 1994) y los mecanismos que regulan su síntesis y secreción actúan en forma coordinada. Iniciando la noche del estro, todo el día del metaestro, del diestro y hasta el mediodía del proestro, las concentraciones de FSH plasmática se observan relativamente bajas (<150 ng/ml). Desde el inicio de la tarde del proestro comienza un incremento en la secreción de FSH en forma simultánea a la LH; hacia las 14:00-15:00 h del proestro, la concentración de FSH se incrementa rápidamente hasta alcanzar la concentración máxima entre las 17:00 y las 19:00 h para después disminuir. Durante la madrugada del estro se observa otro incremento en las concentraciones de FSH que decrece hacia la tarde del estro (Daane y Parlow, 1971). La fase inicial de la secreción de FSH presenta un mecanismo de regulación diferente a la del segundo incremento (Freeman, 1994).

Las concentraciones hipofisarias del ARNm que codifican para la subunidad α común para las glicohormonas hipofisarias se incrementan cerca de las 0800 h del diestro hasta alcanzar valores máximos a las 2000 h y disminuir abruptamente hacia la media noche, permaneciendo bajas durante el proestro, el estro y el metaestro.

Por otro lado, las concentraciones hipofisarias del ARNm de la subunidad β de la FSH aumentan desde las 20:00 h del proestro hasta alcanzar su concentración máxima hacia las 02:00 h del estro, regresando a concentraciones basales hacia las 10:00 h y permaneciendo bajos hasta las 20:00 h del estro. Otro incremento menor inicia hacia las 23:00 h del estro que se mantiene durante la tarde del metaestro para finalmente regresar a concentraciones basales durante la noche del metaestro, todo el día del diestro y la mayor parte del día del proestro (Freeman, 1994).

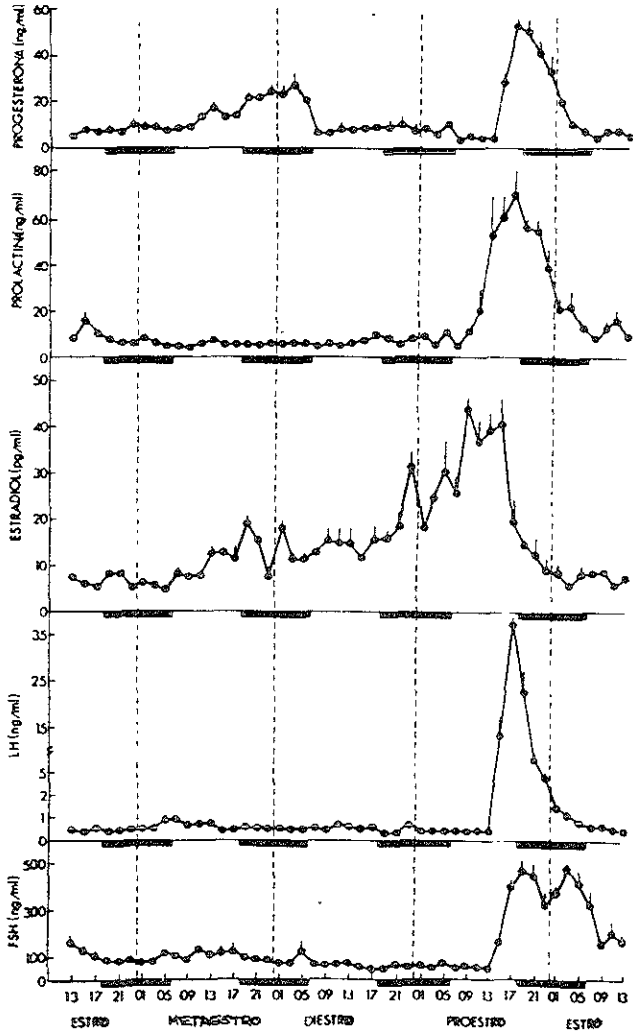


Fig. 10 Concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma obtenido a intervalos de 2 horas a través de cada día del ciclo estral de ratas con ciclos de 4 días. Cada punto representa la concentración hormonal promedio (+ SE) de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad y las líneas punteadas la separación entre cada día del ciclo. (Smith y cols., 1975; Freeman, 1994).

5.-HIPÓTESIS

Si la adición de ácido siálico a la molécula de FSH en la adenohipófisis de la rata hembra está regulada por los estrógenos, entonces las variaciones fisiológicas y experimentales en la concentración de éstos repercutirán en la expresión del ARNm de la enzima que lleva a cabo la sialización, la ST3N y por lo tanto habrá correlación entre la expresión de éste y los patrones de distribución por carga de la FSH.

6.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel que juegan los estrógenos en la expresión del ARNm que codifica a la enzima α 2.3-sialiltransferasa (ARNm-ST3N) intrahipofisiaria y correlacionar su expresión con los cambios en la formación de isoformas moleculares de la FSH durante el ciclo estral de la rata, después de la ovariectomía y empleando remplazo hormonal estrogénico y antiestrogénico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Sintetizar un fragmento del ADNc-ST3N, mediante las técnicas de retrotranscripción y de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que servirá como sonda en los estudios de análisis de la expresión del ARNm-ST3N.
- 2.- Analizar los cambios en la concentración del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas en diferentes estadios del ciclo estral, después de la ovariectomía, con remplazo hormonal estrogénico y antiestrogénico, mediante la técnica de hibridación por "Northern Blot".
- 3.- Separar las isoformas de la FSH de hipófisis de ratas sacrificadas en los diferentes estadios del ciclo estral y a diferentes tiempos después de la remoción de los ovarios, mediante la técnica del cromatofoque.
- 4.- Determinar si existe un patrón de correlación entre la distribución por carga de la FSH, las concentraciones séricas de estradiol y la expresión del ARNm-ST3N.

7) METODOLOGÍA

A) MODELOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas hembra adultas cíclicas de más de 60 días de edad (250-300 g) de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*, bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, México D. F.), mantenidas bajo condiciones de luz controlada con 12 h luz y 12 h oscuridad (luz de 07:00 a 19:00 h). Se alimentaron ad libitum con comida para ratas de laboratorio (Purina Lab Chow, Purina, México) y agua potable hasta el momento de ser sacrificadas. Para todos los experimentos se utilizaron solamente las ratas que presentaron al menos 3 ciclos estrales regulares continuos de 4 días cada uno, los cuales fueron determinados por frotis vaginales diarios. Para cada uno los siguientes protocolos se hicieron grupos al azar de 5-12 ratas y se mantuvieron 4-5 animales por caja.

EXPERIMENTO I. Ciclo Estral

Grupos de ratas que presentaron ciclos estrales regulares fueron sacrificados por decapitación cervical en los diferentes estadios, a las 10:00 h del estro (E), metaestro (M), diestro (D) y proestro(P), así como a las 18:00 h del E, a las 0200 h del M y a intervalos de cuatro horas durante el día del M (10:00, 14:00, 18:00 y 22:00 h). Se obtuvieron las hipófisis de cada rata y fueron almacenadas en forma individual en tubos de polipropileno estériles y con tapa a -70°C hasta el momento de ser homogeneizados para la obtención del ARN total o del extracto proteico. La sangre se colectó en tubos cónicos, se centrifugó a 3000 r.p.m. a 4°C y se separó el suero de cada muestra y se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de estradiol, FSH y LH por medio de sus respectivos radioinmunoensayos (RIA).

EXPERIMENTO 2: Ratas ovariectomizadas (OVX)

Grupos de 6 o 12 ratas cada uno fueron ooforectomizadas bilateralmente por incisión abdominal bajo anestesia de Ketamina/Rompun (Ketalín®, Laboratorios Galén, México y Rompun, Bayer de México; 50 y 6.7 mg/Kg de peso corporal respectivamente) entre las 09:00 y las 10:00 h del día del proestro, de acuerdo a lo informado (Tapper y cols., 1972). Se mantuvieron en el bioterio hasta el día del sacrificio a los 7, 14, 21, 28 y 45 días postcastración. Con la finalidad de determinar el efecto de la castración sobre la expresión del ARNm-ST3N, se hicieron experimentos con animales con operación simulada bajo las mismas condiciones de anestesia (grupos sham) y se sacrificaron 7, 21 y 45 días después de la operación. Para determinar el día del ciclo estral en que se encontraban al momento del sacrificio, se observó la citología vaginal de cada animal y se correlacionó con la morfología del útero. Las hipófisis fueron removidas y almacenadas a -70°C en tubos individuales, los sueros de cada animal se almacenaron individualmente para la determinación de estradiol, FSH y LH por RIA.

EXPERIMENTO 3: Ratas intactas con benzoato de estradiol (BE)

Dos grupos de animales intactos fueron inyectados ya sea con 10 µg de benzoato de estradiol (BE; Sigma Co.), en 100 µl de aceite de maíz comercial (Mazola®) a las 10:00 h del día del E en dosis única, o con 100 µl del vehículo. Los animales fueron sacrificados 24 h después de la inyección. Se obtuvieron las hipófisis y se almacenaron los sueros para la determinación de hormonas por RIA.

EXPERIMENTO 4: Ratas OVX + BE

Animales ovariectomizados en el día del P fueron inyectados con 10 µg de BE en dosis única a las 10:00 h del día 28 después de la ovariectomía y fueron sacrificados 24 y 48 h después; los grupos control recibieron solamente el vehículo y se sacrificaron a los mismos tiempos. Se removieron las hipófisis y se almacenaron los sueros para la determinación de hormonas por RIA.

EXPERIMENTO 5: Ratas intactas + ICI

Se utilizaron grupos de 5 animales con ciclos regulares que fueron inyectados con 2 mg/Kg de peso corporal del antiestrógeno puro ICI 182.780 (ICI; donado por Zeneca Farma, México) en 100 µl de propilén glicol a las 10:00 h del día del M, los controles recibieron 100 µl del vehículo. Los animales fueron sacrificados 8 y 24 h después de la administración del compuesto y se obtuvieron las hipófisis para la determinación del ARNm-ST3N.

EXPERIMENTO 6: Ratas OVX + BE + ICI

Un grupo de animales ovariectomizados en el día del P fue inyectado con 10 µg de BE en dosis única a las 10:00 h del día 28 post-OVX y otro grupo de ratas, además de recibir BE, fue inyectado con 2 mg/Kg de peso corporal de ICI en 100 µl de propilén glicol a la misma hora. Los grupos controles recibieron uno (aceite de maíz) o ambos vehículos. Los animales fueron sacrificados 24 y 48 h después, se removieron las hipófisis para la determinación del ARNm-ST3N.

B) SÍNTESIS DE LA SONDA DE ST3N

EL ADNc de la enzima $\alpha 2,3$ -sialiltransferasa (ADNc-ST3N), usado como sonda, se sintetizó con base en la estructura primaria del ADNc informado previamente (Wen y cols., 1992a). Para tal efecto se mandaron sintetizar dos oligonucleótidos de 20 bases cada uno (Gibco BRL, MD), cuyas secuencias fueron seleccionadas mediante el programa computacional 'Oligos' versión 4.0 de Wojciech Richlik, donde se tomó en cuenta la temperatura de hibridación óptima, la adecuada relación de bases GC/AT y se evitó que formaran enlaces inter e intracatenarios. Las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes (ver figura 6 y en la siguiente hoja la ficha técnica del ADNc de la enzima):

5' -TCA AGT GGC TGA AGT ACA TC-3'

(oligonucleótido superior o sentido) posiciones 704 al 723 y

5' -GTT GTG TGT CCA GGA CTC TT-3'

(oligonucleótido inferior o antisentido) posiciones 1054 al 1035.

La síntesis y amplificación del ADNc-ST3N se realizó mediante las técnicas de retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir del ARNm obtenido de la región anterior de la corteza cerebral de rata hembra. Se empleó el estuche de amplificación "GeneAmp® RNA PCR Kit" (Perkin Elmer, CA) con ligeras modificaciones a las instrucciones del fabricante.

En la retrotranscripción se empleó 1 μ g de ARN total, extraído de cerebro de rata hembra y se incubó con los reactivos del estuche el cual contiene 1 mM de cada uno de los dNTP's [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], 5mM MgCl₂, 2.5 μ M de Oligo d(T)₁₆, 1U del inhibidor de RNasas, 2.5 U de la retrotranscriptasa MuLV y 2 μ l de 10X PCR buffer II, hasta un volumen final de 20 μ l. Las temperaturas de la RT fueron de 60 minutos a temperatura ambiente, 20 minutos a 42°C, 5 minutos a 99°C y 5 minutos a 5°C, empleándose un termociclador Perkin Elmer, modelo 9600.

Inmediatamente después se realizó la PCR, adicionando 80 μ l de la mezcla que contenía 2.5U de AmpliTaq® DNA polimerasa, 15 mM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 2 mM MgCl₂ y 8 μ l de la solución amortiguadora 10X PCR-II. Las muestras se calentaron a 95°C por 105 segundos y la amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: 35 ciclos de 2 temperaturas (95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos) y un segmento final de elongación de 7 minutos a 72°C. El fragmento de ADN de 346-pb fue separado por electroforesis en geles de agarosa y purificado mediante columnas de exclusión molecular y por precipitación etanólica (Glenn y Glenn, 1994).

Con la finalidad de demostrar que las muestras usadas en la hibridación por Northern blot contienen la misma cantidad de ARN o en su caso hacer el ajuste de la concentración correspondiente, se sintetizó el ADNc de ciclofilina de rata (Cyc; sonda de normalización) por el método de RT-PCR, empleando el mismo ARN de cerebro de rata hembra (Danielson y cols., 1988).

Las secuencias de los ADNc-ST3N y del ADNc-Cyc fueron determinadas empleando el estuche de secuenciación "AmpliTaq® Sequencing Kit" (Perkin Elmer, CA) que emplea el método enzimático (Sanger y cols., 1977).

http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/irx/cgi-bin/birx_doc?genbank+37537

LOCUS RATSIAL 1207 bp mRNA **ROD** 26-FEB-1993
DEFINICIÓN: CMP-N-acetylneuraminato-β-galactosido alfa-2-3-sialiltransferasa ARNm. (ST3N)
ACCESO: M97754 y M98462 **NID:** g206930 **VERSION:** M97754.1 GI:206930
MEDLINE: 93016017

FUENTE: Hígado de rata (ADNc a ARNm).

ORGANISMO: *Rattus norvegicus*, Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Euthera; Rodentia; Sciurognathi; Myomorpha; Muridae; Murinae; Rattus.

AUTORES: Wen DX, Livingston BD, Medzihradzky KF, Kelm S, Burlingame AL y Paulson JC.

TÍTULO: Primary structure of Gal beta-1,3(4) GlcNAc alpha-2,3 sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning: Evidence for a protein motif in the sialyltransferase gene family

REVISTA: J. Biol. Chem. 267, 21011-21019 (1992)

TRADUCCIÓN= 374 aminoácidos

1	MGLLVFVRNL	LLALCLFLVL	GFLYYSAWKL	HLLQWEDSNS	LILSLDSAGQ
51	TLGTEYDRLG	FLLKLDKSLP	AELATKYANF	SEGACKPGYA	SAMMTAIFPR
101	FSKPAPMFLD	DSFRKWARIR	EFVPPPGIKG	QDNLIKAILS	VTKEYRLTPA
151	LDSLHCRRCI	IVGGGVLAN	KSLGSRIDDY	DIVIRLNSAP	VKGFEKDVGS
201	KTTLRITYPE	GAMORPEQYE	RDSLFLVLAGF	KWQDFKWLKY	IVYKERSVAS
251	DGFWKSVAIR	VPKEPPEIRI	LNPYFIQEA	FLLIGLFPNN	GLMGRNIPT
301	LGSVAVTMAL	DGDEVAVAG	FGYDMNTPNA	PLHYETVRM	AAIKESWTHN
351	IQREKEFLRK	LVKARVITDL	SSGI		

CONTEO DE BASES: 281 A 342 C 308 G 276 T

REFERENCIA: (bases 1 a 1207): No Codificantes: -82 a -1; Codificantes: 1 a 1125

-82	T GCC TTT CCC GGG GCC AGA TCC TCT TCG GAG CGA CCG GGT CAG TTT GTC	
-50	AAA GTC ATG TAG GAA AAT GTG GGT CAT GTG AAG	
1	ATG GGA CTC TTG GTA TTT GTA CGC AAC CTG CTG CTA GCC CTC TGC CTC TTT	
52	CTG GTC CTG GGA TTT TTG TAT TAT TCT GCC TGG AAG CTA CAC TTA CTC CAA	
103	TGG GAA GAC TCC AAT TCA CTG ATT CTT TCC CTT GAC TCC GCT GGA CAA ACC	
154	CTA GGC ACA GAG TAT GAT AGG CTG GGT TTC CTC CTG AAG CTG GAC TCT AAA	
205	CTG CCT GCA GAG CTG GCC ACC AAG TAC GCT AAC TTT TCC GAG GGA GCC TGC	
256	AAA CCC GGC TAC GCT TCA GCC ATG ATG ACT GCC ATC TTC CCC AGG TTC TCC	
307	AAG CCA GCA CCC ATG TTC CTG GAT GAC TCC TTT CGC AAA TGG GCT AGG ATT	
358	CGG GAG TTT GTG CCA CCC TTT GGG ATC AAA GGT CAA GAC AAT CTG ATC AAA	
409	GCC ATC TTG TCA CTC ACC AAA GAA TAC CGC CTG ACC CCT GCC TTG GAC AGC	
460	CTC CAC TGC CGC GTC TGC ATC ATC GTA GGC AAT GGA GGG GTC CTC GCC AAC	
511	AAG TCT CTG GGG TCA CGA AIT GAC GAC TAT GAC ATT GTG ATC AGA TTG AAC	(sialilmotif)
562	TCA GCA CCT GTG AAG GGC TTT GAG AAG GAC GTG GGC AGC AAG ACC ACC CTG	
613	CGC ATC ACC TAC CCT GAA GGT GCC ATG CAG CGG CCT GAG CAA TAT GAA CGA	
664	GAC TCT CTC TTT GTA CTA GCT GGC TTC AAG TGG CAG GAC <u>TTC AAG TGG CTG</u>	▼ 5'
715	<u>AAG TAC ATC GTC TAC AAG GAG AGA GTG AGC GCA TCC GAT GCC TTC TGG AAG</u>	
766	<u>TCC GTG ACC ACC CGA GTG CCC AAG GAG CCC CCT GAG ATC CGC ATC CTC AAC</u>	
817	<u>CCG TAC TTC ATC CAG GAG GCT GCC TTC ACG CTC ATC GGA CTG CCC TTC AAC</u>	
868	<u>AAT GGC CTC ATG GAT GCA GGG AAC ATC CCA ACC CTT GGC AGT GTG GCA GTG</u>	
919	<u>ACC ATG AAC CTC GAT GGC TGT GAT GAA GTG GCA GTC GCG GGC TTT GGC TAT</u>	
970	<u>GAC ATG AAC ACA CCC AAC GCC CCC CTG CAG TAC TAT GAA ACT GTG CGC ATG</u>	
1021	<u>GCA GCC ATC AAA GAG TCC TGG ACA CAC AAC</u> ATC CAG CGA GAG AAA GAG	▲ 3'
1069	TTT CTG CGG AAG CTA GTG AAA GCA CGC GTC ATC ACT GAC TTA AGC AGT GGT	
1120	ATC TGA	

En la hoja anterior se describe la ficha técnica del ADNc de la enzima Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3N) obtenida del banco genético "Gene Bank", así como sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos. La secuencia de aminoácidos que se resalta en negro corresponde al segmento de aminoácidos de la enzima que sirve de anclaje a la membrana del Aparato de Golgi. En la secuencia de nucleótidos se subraya la región del ADNc usado como sonda (bases 704 al 1050), se resalta en negro y doble subrayado las secuencias utilizadas para la síntesis de los oligonucleótidos empleada en el RT-PCR (puntas de flecha en el margen derecho) y se subraya con puntos la secuencia del "sialil motif" que comprende las bases 466 al 630.

C) ANALISIS DE LA EXPRESION DEL ARNm-ST3N (Hibridación por "NORTHERN BLOT")

Extracción del ARN

El ARN total fue extraído de hipófisis individuales usando el reactivo de TRIZol® (Gibco BRL, MD) según el método de aislamiento de ARN en un solo paso (Chomczynski y Sacchi, 1987) empleando 0.5 ml del reactivo por hipófisis. Las hipófisis fueron homogeneizadas, en los mismos tubos en que fueron guardadas, usando un agitador de laboratorio (STIR-PAK, Cole-Parmer, Chicago IL) a máxima velocidad por 20 segundos sobre hielo. El homogenado se resuspendió en 20 μ l de H₂O-DEPC y se cuantificó la concentración del ARN de cada muestra por espectrofotometría a 260 nm y determinando la presencia de contaminantes proteicos por la relación 260/280, la cual debe ser entre 1.8 y 2.0. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de la electroforesis, o a -86°C si se almacenaron por un tiempo mayor.

Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes

Los ARN's se separaron según su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0% (Gibco BRL, MD; grado Biología Molecular) conteniendo la solución amortiguadora de MOPS 1X y formaldehído al 6% como desnaturalizante.

Para la preparación de las muestras se alicuotaron 15 μ g de ARN total de cada una, ajustando los volúmenes con ddH₂O-DEPC a un volumen final de 10 μ l en un tubo Eppendorff de 0.5 ml. Se le adicionaron 20 μ l de la solución desnaturalizante FMF (50% formamida, 1X MOPS, 6.5% formaldehído) a cada muestra, se calentaron a 75°C en un baño de aceite (Boekel Industries Inc., USA) por 5 minutos, se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron brevemente.

Después de desnaturalizar, a cada muestra se les adicionaron 3.0 μ l de la solución de carga para ARN (30% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% xilen cianol) y 0.5 μ l de la solución de bromuro de etidio 10 μ g/ml. Una vez depositadas las muestras en los pozos del gel, éste se cubrió totalmente con 1X MOPS y se llevó a cabo el corrimiento electroforético a 150 V por 2.5 horas.

Transferencia por capilaridad (Blotting)

Transcurrido el tiempo de la electroforesis (cuando el colorante de bajo peso molecular alcanzó las 2/3 partes de la longitud total del gel), se observó el gel en el transiluminador, se cortó el marcador de peso molecular y se montó el dispositivo para la transferencia a la membrana de nylon Z-Probe GT® (Bio Rad, CA) del tamaño del gel. Se dejó transfiriendo por capilaridad toda la noche con 10X SSC en los contenedores laterales.

Al día siguiente se desmontó con cuidado el sistema y se marcaron los carriles sobre la membrana. Posteriormente se fijó el ARN a la membrana por entrecruzamiento con luz ultravioleta usando el programa del aparato "UV-crosslinker" (Stratagene, CA). Se guardó la membrana a temperatura ambiente en bolsa de plástico sellada con calor para ser hibridada posteriormente con la sonda de ADNc correspondiente.

Prehibridación de la membrana de Nylon

Se empleó el protocolo estándar descrito por el fabricante de la membrana Z-Probe® GT que se detalla a continuación:

Para cubrir completamente y en forma homogénea la superficie de la membrana y de la bolsa, bloqueando las uniones inespecíficas, se empleó la solución de prehibridación (1 mM EDTA, 0.25 M Na₂HPO₄, pH 7.2 y 7 % SDS) utilizando 150 µl de solución por cm² de membrana. La incubación se llevó a cabo por lo menos durante 3 horas a 65°C en agitación constante (140 r.p.m.).

Marcaje de las sondas de ADNc (ST3N y Cyc)

Se empleó el protocolo de marcaje al azar "RadPrime DNA Labeling System®" (Gibco BRL, MD), el cual se detalla a continuación:

En un tubo cónico tipo Eppendorf de 0.5 ml se desnaturalizaron 50 ng del ADNc en un volumen máximo de 20 µl de TE en el baño de aceite a 95°C por 5 minutos, e inmediatamente se pasó a hielo.

Por otro lado se mezclaron los siguientes componentes:

- 1 µl 0.5M dATP (en 3 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 mM EDTA).
- 1 µl 0.5M dGTP (en 3 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 mM EDTA).
- 1 µl 0.5M dTTP (en 3 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 mM EDTA).
- 20 µl de 2.5X Random Primers Solution [125 mM Tris-acetato, pH 6.8, 2.5 mM Acetato de magnesio, 25 mM 2-mercaptoetanol, 50 µg/ml cebadores oligodesoxirribonucleótidos (octámeros al azar)].
- 5 µl de [³²P]-dCTP.
- ddH₂O hasta un volumen de 49 µl (incluyendo el ADNc).

Esta mezcla se adicionó al ADN desnaturizado y se le agregó 1 μ l de la enzima DNA polimerasa (fragmento de Klenow 4 U/ μ l).

La mezcla de reacción se incubó a 37°C por lo menos 2 horas. Al finalizar el periodo de incubación se agregaron 5 μ l del buffer de detención (Stop buffer; 0.2 M EDTA, pH 7.5). Las sondas marcadas se purificaron en columnas conteniendo Sephadex G-50 superfino (Pharmacia, NJ).

Purificación de la sonda de ADN marcada

Se preparo la columna con Sephadex® G-50 (Pharmacia LKB Biotechnology) en una jeringa para insulina (sin émbolo), empaquetada con fibra de vidrio siliconizada. Se puso en un tubo de recolección y se centrifugo a 1100 x g por 2 minutos. Desechando el eluido. Se depositó la muestra en el centro de la cama de Sephadex, se le colocó un tubo de recolección nuevo y estéril y se centrifugó a 1100 x g por 4 minutos. El eluido contiene la muestra purificada, por lo que se mantuvo en hielo.

Hibridación de la membrana de Nylon con la sonda marcada

Se corto una esquina de la bolsa que contenía la membrana para desechar la solución de prehibridación y adicionar el resto de la solución (150 μ l de solución de hibridación/cm² de membrana). Se desnaturizó la sonda en el baño de aceite a 95°C por 5 minutos y se puso inmediatamente en hielo. Posteriormente la sonda se depositó en la bolsa, se selló y se incubó a 65°C en agitación constante durante toda la noche. Se lavó la membrana (350 μ l de solución de lavado/cm² de membrana) a 65°C por 30 minutos con la solución de lavado: 1 mM EDTA, 40 mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 5 % SDS.

Después de los lavados, se secó suavemente el exceso de agua de la membrana con papel higiénico, se colocó en bolsa de hibridación y se selló (no se debe permitir que seque totalmente si se volverá a hibridar). Se puso en un cassette para autorradiografía junto con una o dos placas de autorradiografía el tiempo necesario (5 a 96 h en función de la intensidad de la señal) y se revelaron las placas a diferentes tiempos.

D) SEPARACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA rFSH POR CROMATOENFOQUE.

Las formas moleculares de FSH de los extractos hipofisarios de las ratas fueron separadas con base en sus puntos isoeléctricos (pI) por medio de columnas de cromatoenfoque según la técnica previamente descrita (Ulloa-Aguirre y cols., 1990). Se prepararon las siguientes soluciones amortiguadoras: de inicio ("Start buffer", solución de imidazol-HCl 0.25M, pH 7.4; Sigma Chemicals, MO), de elución ("Limit buffer", solución poliamortiguadora "Polibuffer PB 74", ajustado a pH 4; Pharmacia, NJ), la resina de intercambio iónico ("Gel PBE 94"; rango útil de pH: 9 a 4; Pharmacia, NJ) y solución 1M de NaCl.

Se empacaron las columnas cromatográficas de 30 x 1 cm (Bio-Rad, CA) con la resina de intercambio iónico y se equilibraron con 15 volúmenes del amortiguador de inicio.

Previamente se eluyó la proteína citocromo-C de origen bovino, sustancia colorida y fuertemente básica con un pI 10.5 por lo que es repelida del gel (Sigma Chemicals, MO) en volumen igual al de la muestra, esto con el fin de verificar que la columna estuviera bien empacada. Se ajustó el colector de fracciones para que cada fracción fuera de aproximadamente 2 ml. Posteriormente se lavó la columna con 5 ml del amortiguador de elución, para no exponer a la muestra a un pH extremo.

Al mismo tiempo, la muestra se preparó de la siguiente manera: Se homogeneizaron 4 hipófisis de ratas con el mismo tratamiento o estado fisiológico en 500 ml del amortiguador de elución conteniendo 50 mg/ml de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro; Sigma Chemicals, MO) verificando que no quedaran restos muy grandes de tejido; el homogenado se centrifugó a 3000 r.p.m. / 10 min, se recuperó el sobrenadante y se depositó en la columna agregándose un poco más de solución de elución. Se tapó la columna y se dejó eluir toda la noche.

Cuando el pH de las fracciones llegó a 4.0 o ligeramente menor (a 25°C) se cambió el amortiguador eluyente por la solución 1M NaCl con el fin de desplazar (por fuerza iónica) las moléculas de FSH que no eluyeron dentro del rango de pH 7.8 - 4.0 a las cuales se denominaron "pico de sal" y se colectaron de 10 a 15 fracciones más. Se determinó el pH a todas las fracciones y se guardaron a -20°C hasta el día de su determinación por radioinmunoensayo (RIA).

E) RADIOINMUNOENSAYOS

Los RIA's se realizaron con los estuches proporcionados por el Programa Nacional de la Pituitaria de los Institutos Nacionales de Salud, E.U.A. (National Pituitary Program, NIADDK, Bethesda MD), según lo descrito (Ulloa-Aguirre y cols., 1988b). Para la FSH se empleó el extracto purificado de FSH de rata (rFSH-I-7), el cual fue radiomarcado con I^{125} -Na por el método de la Cloramina T; se utilizó el rFSH-RP-2 para construir las curvas estándar, expresándose los resultados en términos de ng/ml de FSH-RP-2; y el anti suero policlonal anti-rFSH (conejo vs. rata; NIDDK-A-RAT FSH S-11) fue utilizado en la dilución de trabajo 1:30,000. Para evitar variaciones interensayo, se analizaron todas las muestras de cada cromatoenfoco en un mismo ensayo.

Para la LH se trabajó de la misma manera, se radiomarcó la preparación LH-I-6 para ser usado como ligando marcado, la preparación de referencia empleada fue rLH-RP2 para la elaboración de la curva estándar y el antisuero policlonal anti-rLH (conejo vs. rata; NIADDK-A-RAT LHS-8) a la dilución final de trabajo de 1:40.000. La determinación hormonal de FSH y LH de rata se realizó en alícuotas de 100 ml de cada una de las fracciones obtenidas en el cromatoenfoco por duplicado, o en volúmenes menores (diluciones) si las concentraciones de las hormonas eran altas.

El RIA de 17β -estradiol fue realizado utilizando el estuche preparado en el Laboratorio de Hormonas Esteroides, Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, México.

F) ANÁLISIS DE DATOS

Las autorradiografías obtenidas de la cuantificación de los ARNm para ST3N y Cyc fueron sometidas a un análisis densitométrico semicuantitativo en un sistema de análisis de imágenes "Eagle Eye II" (Stratagene, La Jolla, CA); los resultados se expresan en píxeles contenidos en el área analizada y se ajustó la intensidad del fondo a un mismo valor arbitrario. La densidad óptica relativa representa la relación entre el valor obtenido para cada muestra hibridada con ST3N, con respecto al valor de la misma muestra normalizada con Cyc. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de varianza de una vía y la prueba de "t" de Student no pareada para determinar diferencias entre grupos.

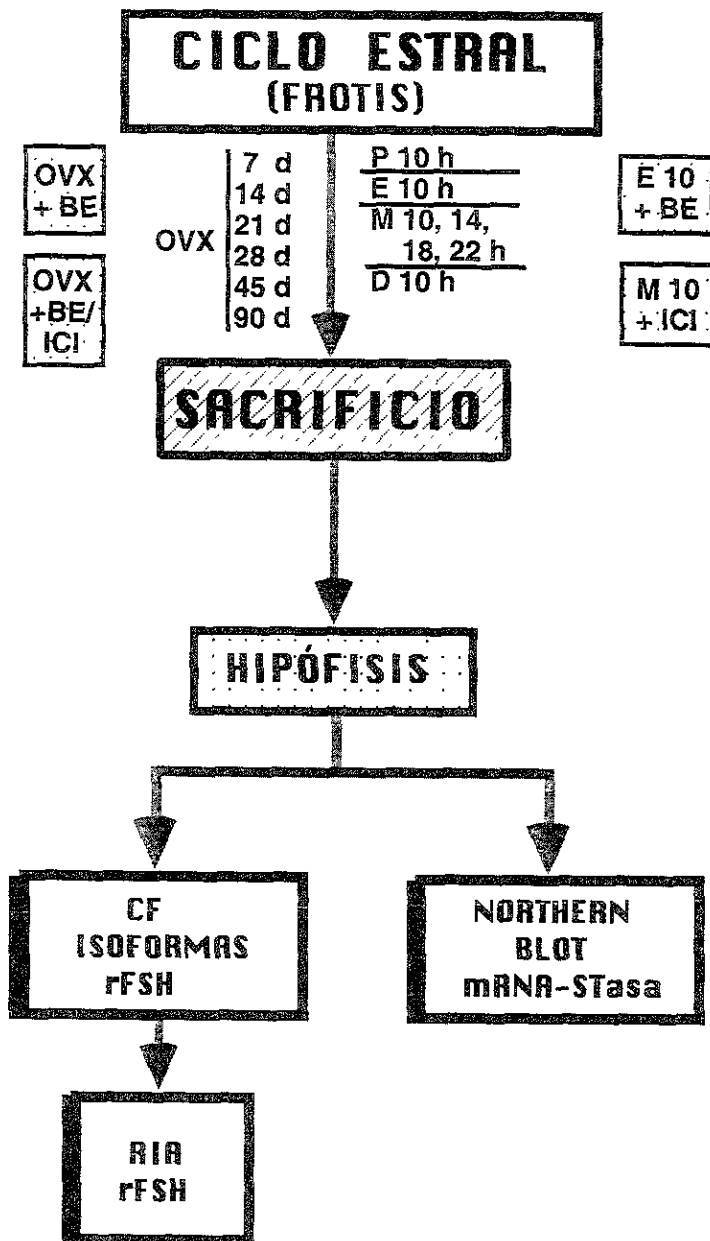


Fig. 11 Diagrama de flujo de la metodología seguida en el presente trabajo de investigación. CE=animales intactos en el ciclo estral, P=proestro, E=estro, M=metaestro, D=diestro, OVX=animales ovariectomizados, BE=animales tratados con benzoato de etradiol, ICI=animales tratados con el antiestrógeno ICI 182,780

8) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente protocolo de investigación se dividen en cuatro: A) la síntesis de un fragmento del ADNc-ST3N y la secuenciación del mismo empleando técnicas de Biología Molecular, B) el análisis de la expresión del ARNm-ST3N por hibridaciones "Northern blot", C) la separación por carga de las isoformas moleculares de la FSH mediante cromatoenfoques y D) la determinación de las concentraciones séricas de las hormonas LH, FSH y estradiol.

A) SÍNTESIS DEL ARNm-ST3N

La sonda de ADNc para determinar la expresión del ARNm-ST3N fue sintetizada mediante las técnicas de retrotranscripción y de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) empleando los oligonucleótidos reportados en la metodología. Este producto fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (Fig. 12) para demostrar que el peso molecular está de acuerdo a lo reportado, que es de aproximadamente 350 pares de bases (pb; carril 2). La fotografía del gel muestra los estándares de peso molecular de 100 pb ("100 bp DNA ladder"; carril 1) señalando las bandas de 100, 300 y 600 pb y el estándar de peso y masa molecular ("DNA mass ladder"; carril 3) con las bandas de 10, 20, 40 y 80 ng respectivamente. Una vez purificado por columna de exclusión molecular y por precipitación etanólica, el producto de RT-PCR se volvió a separar por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% para determinar su pureza y cuantificar su concentración por comparación con el estándar de peso y masa molecular, para poder ser utilizado para la secuenciación de sus bases.

En un estudio realizado por duplicado se determinó la secuencia de los nucleótidos del producto de RT-PCR para el ADNc-ST3N purificado, el cual presentó una homología de más del 99% (345/346) con respecto a la secuencia reportada previamente por Wen (1992a), encontrándose una mutación en la base 970 donde se observó el nucleótido C en lugar del nucleótido G reportado. Después de haberse comprobado su secuencia y su pureza, se utilizó como sonda para cuantificar la expresión del ARNm-ST3N por la técnica de hibridación denominada "Northern Blot".

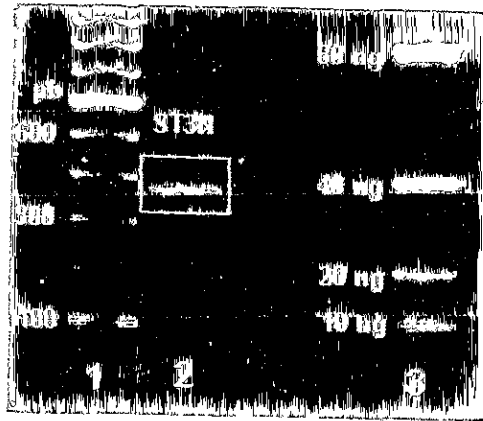


Fig.12 Separación electroforética del ADNc-ST3N. Fotografía de un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases, el carril 2 al ADNc-ST3N y el carril 3 al marcador de peso molecular y masa con sus respectivos valores.

B) EXPRESIÓN DEL ARNm-ST3N

Las autorradiografías obtenidas de todos los experimentos fueron analizadas densitométricamente en un analizador de imágenes Eagle Eye® y los resultados se expresan en forma del cociente del área de la densidad óptica relativa calculada para la expresión del ARNm-ST3N entre el área calculada para la sonda de normalización de la ciclofilina, ARNm-Cyc, cuya expresión es constitutiva. En todas las figuras se muestra una autorradiografía representativa del análisis del ARNm hibridado con la sonda de ST3N. La talla molecular del ARNm-ST3N es de aproximadamente 2.5 Kb (kilobases), mientras que el peso molecular del ARNm-Cyc es de 1.0 Kb

EXPRESIÓN DEL ARNm-ST3N EN DIFERENTES TEJIDOS

Se realizaron estudios preliminares para determinar la especificidad del ADNc-ST3N y compararla con lo observado previamente (Wen y cols., 1992a), donde se hibridó la sonda con la membrana conteniendo 15 µg de ARN total de fragmentos de los siguientes tejidos de ratas hembra adultas en la fase de diestro: bazo, hígado, pulmón, glándula submaxilar, intestino, ovario, corazón, cerebro, riñón e hipófisis completa.

En la gráfica 13 se observa que la expresión del ARNm-ST3N es mayor en el pulmón, corazón, cerebro y riñón de rata hembra adulta comparada con los demás tejidos que presenta una mínima expresión. Estos tejidos presentan una expresión 2 a 3 veces mayor con respecto a la observada en la hipófisis completa, que es similar a la observada en el colon de la rata hembra (no se muestra en la gráfica).

A diferencia de lo informado por Wen y cols., (1992a) donde se observan al menos dos bandas de ARNm de diferente peso molecular en algunos tejidos (2.5 y 2.0 Kb), en los resultados aquí mostrados se pudo observar la sola banda pesada, de 2.5 Kb. Esto se puede explicar por dos razones: 1) debido a que el tamaño de la sonda aquí empleada es menor (solamente se sintetizó el fragmento de señalización de la ST3N, figura 6) a la utilizada por ellos, que emplearon el ADNc completo; de esta manera se tienen menos probabilidades de generar interacciones con las regiones de alta homología de las otras sialiltransferasas (sialilmotifs) y, por tanto, es más específica. Estos datos concuerdan con los reportados por otros autores (Childs y cols., 1990; Gillespie y cols., 1992). 2) Debido a que la forma más ligera reportada por Wen corresponde a un ARN procesado en forma diferencial y de menor peso.

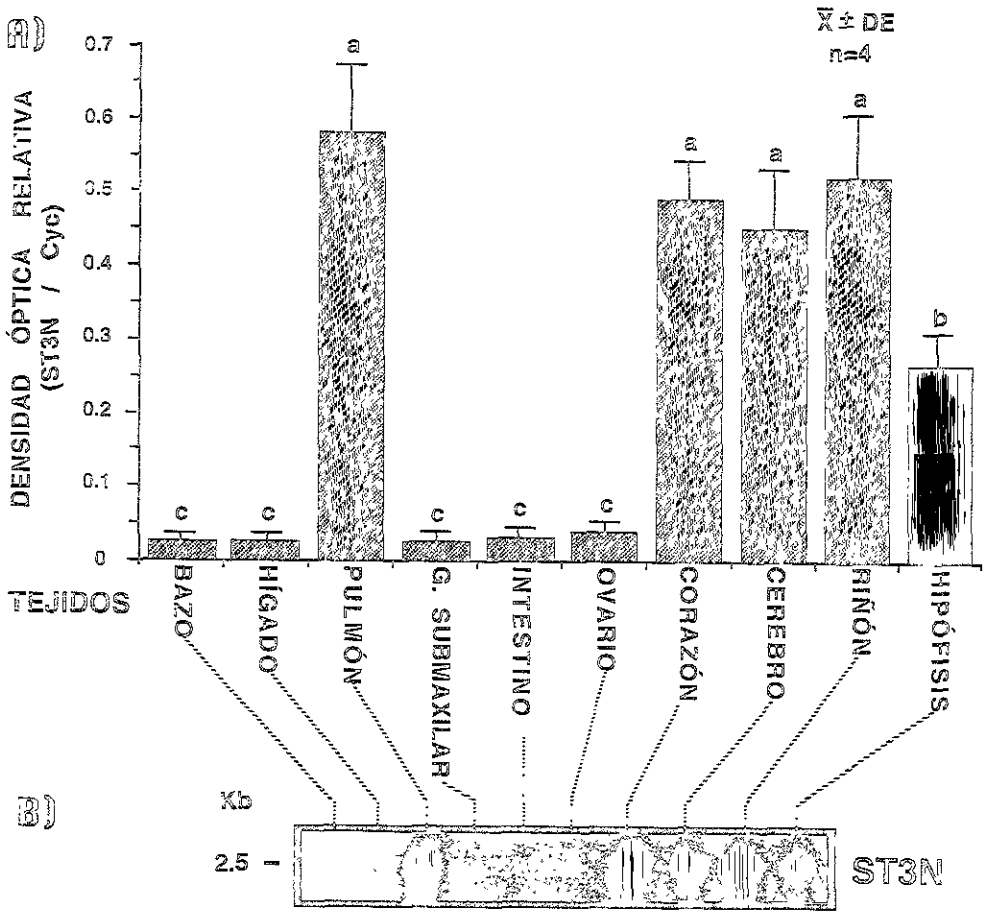


Fig.13 Expresión del ARNm-ST3N en diferentes tejidos de la rata hembra. A) Los resultados de la gráfica están expresados por el promedio de los cocientes de la expresión del ARNm-ST3N entre el de la ciclofilina (Cyc) con sus respectivas desviaciones estándar ($\bar{X} \pm SD$). Las diferencias significativas entre los diferentes tejidos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N. El peso molecular del ARNm-ST3N se expresa en kilobases (Kb).

Cabe hacer notar que el tiempo de exposición de las placas de autorradiografía de las membranas hibridadas con la sonda de ST3N fue mayor (5 a 7 días) si se compara con el tiempo de exposición de las membranas hibridadas con la sonda de normalización (Cyc), que fue de 1 a 2 días. Por esta razón, las membranas no se hibridaron con ambas sondas al mismo tiempo, a pesar de que los pesos moleculares de ellas eran lo suficientemente diferentes como para realizar la doble hibridación.

EXPERIMENTO 1. ANIMALES INTACTOS

Este estudio se diseñó para determinar si la expresión del ARNm-ST3N se modificaba durante el ciclo estral de la rata, por lo que se realizaron hibridaciones de la sonda ST3N con los ARN's obtenidos de hipófisis de ratas sacrificadas entre las 10:00 y las 11:00 h de cada uno de los días del ciclo estral. En la figura 14 se muestran los resultados del análisis de 5 animales por estadio y se realizaron al menos 2 experimentos independientes con el mismo ARN; los resultados se expresan como el promedio de los cocientes de las densidades ópticas relativas del ARNm-ST3N entre sus respectivas normalizaciones, ARNm-Cyc, con sus respectivas desviaciones estándar.

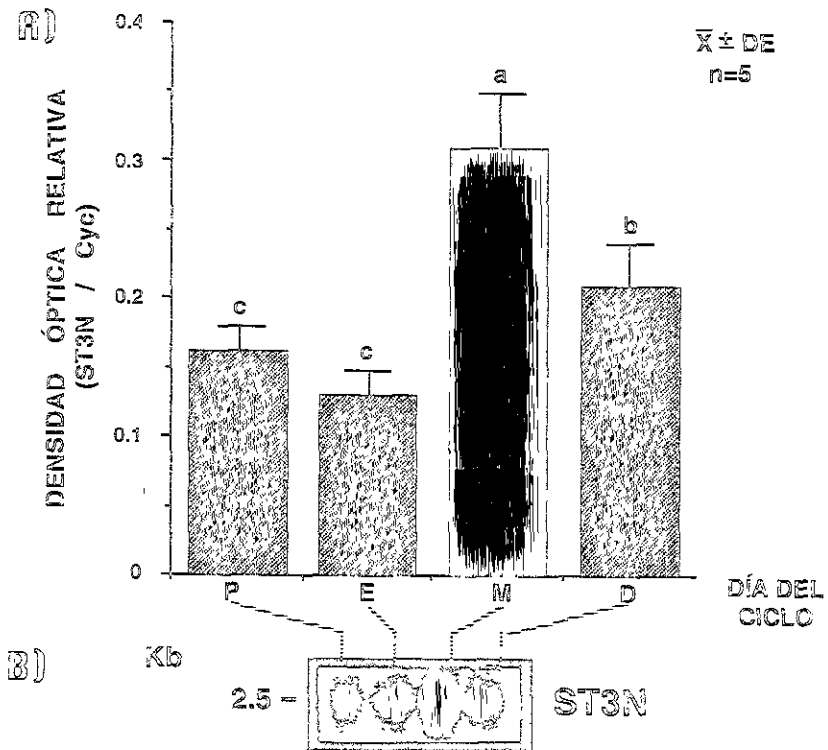


Fig. 14 Expresión del ARNm-ST3N intrahipofisiaria durante el ciclo estral de la rata. A) Las hipófisis se obtuvieron en la mañana (10:00 h) de las diferentes fases del ciclo (P=Proestro, E=Estro, M=Metaestro y D=Diestro). Se resalta la barra más oscura el día del M, donde se observó la mayor expresión del ARNm-ST3N. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

Se observó que el mayor incremento en la concentración relativa del ARNm-ST3N fue durante la mañana del día del M con una disminución de un 33% con respecto a lo obtenido en la mañana del día del D, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La expresión del ARNm-ST3N disminuyó en un 50% en la etapa del P con respecto a la fase de M ($p < 0.005$) y se mantuvo ligeramente más baja durante el E. Al comparar la expresión de este ARNm en las etapas del P y E con respecto a la observada durante el D, se encuentra una diferencia significativa ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente) siendo la mayor expresión en esta última etapa. El incremento de 2 a 3 veces en la expresión del ARNm-ST3N en la fase de M con respecto a lo observado en las de P y E indica la existencia de un mecanismo de regulación diferencial de su expresión a lo largo del ciclo estral en la rata, mientras que el hecho de que su expresión en la fase de D es ligeramente menor (1.5 veces) con respecto a la observada en la fase de M hace pensar que la presencia del ARNm que codifica a la ST3N se mantiene por varias horas antes de ser reciclado.

Con base en el experimento anterior se decidió ampliar el intervalo de observaciones en la fase del M (donde se presenta la mayor expresión del ARNm-ST3N) a intervalos de 4 horas a partir de las 10:00 h del M para determinar el lapso de tiempo de la máxima expresión del ARNm-ST3N, sacrificando a los animales en las siguientes horas: M 10:00 h, M 14:00 h, M 18:00 h y M 22:00 h. Se hace notar que los sacrificios de los animales empezaron 15 a 20 minutos antes del tiempo señalado para que se pudiera terminar con los sacrificios de todos los animales 15 a 20 minutos después de lo señalado.

Los resultados obtenidos al tomar muestras con intervalos de tiempo más cortos durante el ciclo estral se muestran en la Fig.15, en donde se observa que la mayor expresión del ARNm de la enzima fue alcanzado alrededor de las 10:00 h del M, para que posteriormente a las 14:00 h disminuya ligeramente su expresión (< 1.5 veces; $p > 0.05$, sin significancia estadística), la cual decrece paulatinamente hacia las 18:00 y 22:00 h del M (2.4 veces; $p < 0.01$ con respecto a M 10:00 h). se mantiene descendiendo durante la mañana del D, con niveles de expresión similares a las etapas anteriores, con un descenso en la expresión del ARNm-ST3N en las fases del P y E (3 veces comparado con M 10:00 h, $p < 0.005$) similar al observado en el experimento anterior. Los experimentos se realizaron en al menos 7 hipófisis obtenidas de ratas sacrificadas en cada uno de los diferentes tiempos.

También se realizaron experimentos en hipófisis de tres ratas sacrificadas a las 06:00 h del M para determinar si el incremento se iniciaba antes de las 10:00 h (con el mismo intervalo de tiempo de 4 horas), sin embargo, la expresión del ARNm-ST3N fue semejante a la observada a las 14:00 h del M ($p>0.1$) y sin significancia estadística ($p>0.05$) con respecto a M 10:00 h

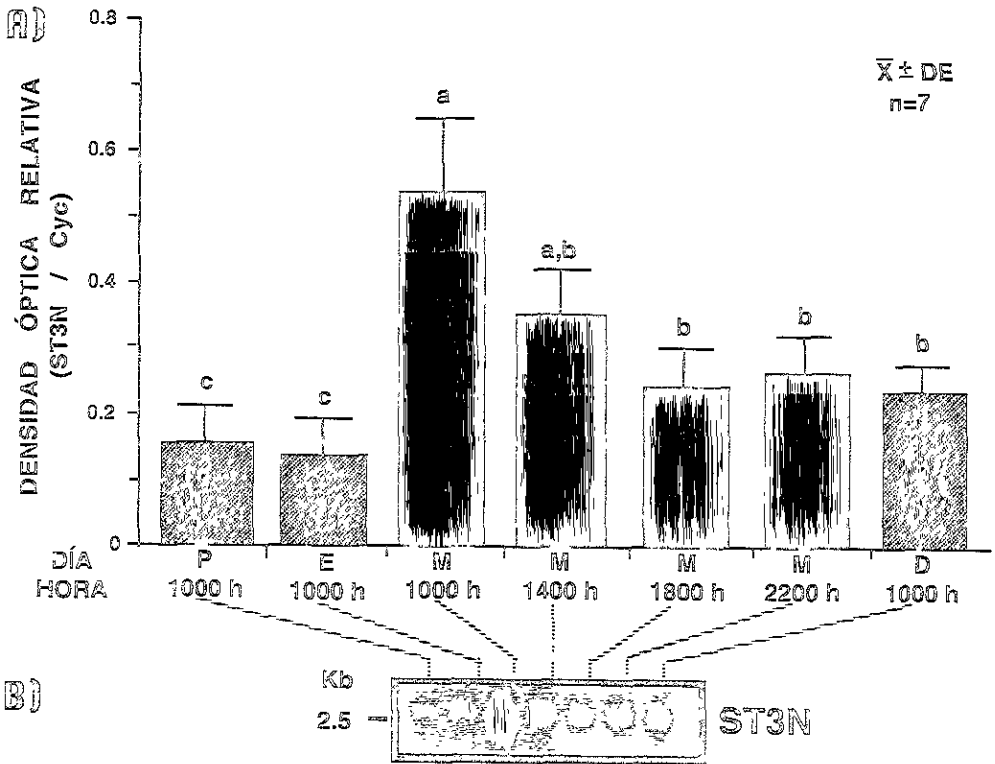


Fig.15 A) Expresión de ARNm-ST3N a diferentes horas del metaestro (barras oscuras) y durante la mañana (10:00 h) del resto del ciclo estral de la rata (P, E y D). Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p<0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

Con estos resultados se asume que la menor expresión del ARNm que codifica a esta enzima se presenta en el día del estro, que incrementa su concentración durante la mañana del metaestro hasta alcanzar la máxima alrededor de las 10:00 h del metaestro. para disminuir paulatinamente durante el resto del día del metaestro, durante todo el diestro y bajar en el día del proestro hasta presentar nuevamente la expresión basal mínima durante el día del estro.

EXPERIMENTO 2. RATAS OVX

En la figura 16 se muestran los resultados del comportamiento observado en la expresión del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas ovariectomizadas (OVX) en el día del P y sacrificadas a diferentes tiempos post-ovariectomía. Con la finalidad de hacer una comparación directa, se incluyeron en el mismo experimento ARN's de hipófisis de ratas sacrificadas en la fase del ciclo en la cual se observa la mayor expresión de la enzima, (M 10:00 h) y en la fase en la cual se llevó a cabo la ooforectomía (P 10:00 h) y que presenta la menor expresión del ARNm-ST3N intrahipofisiario.

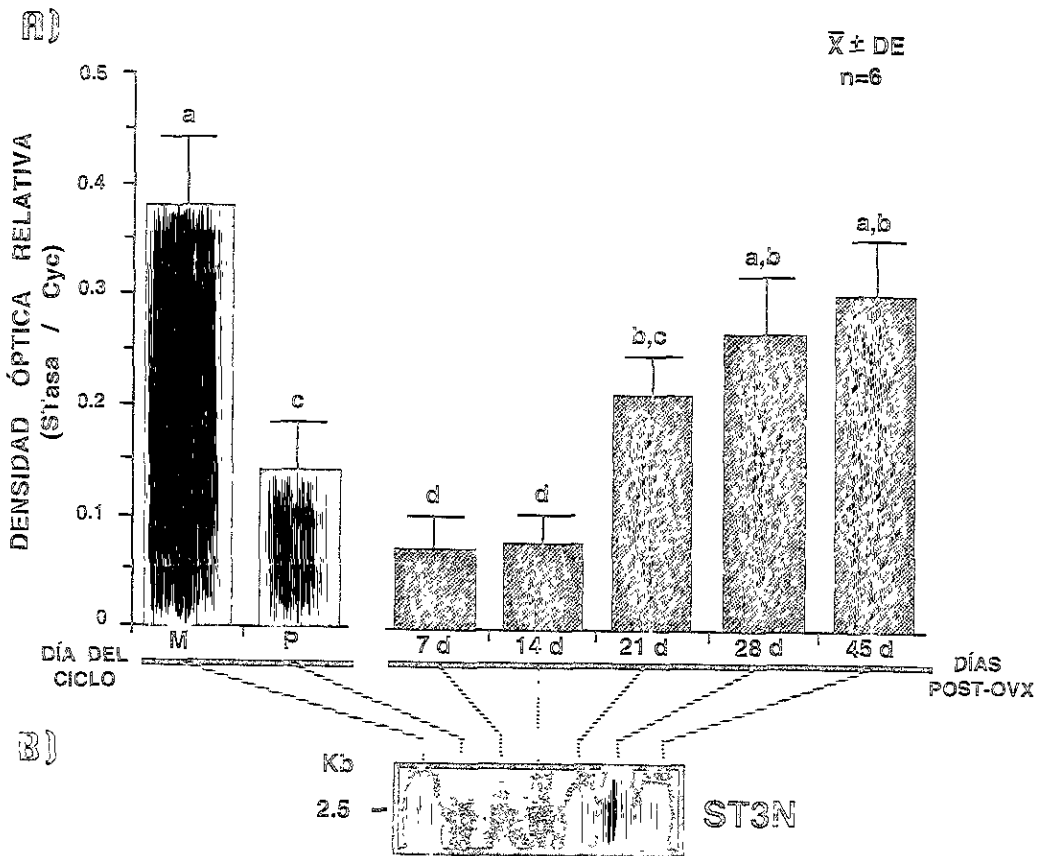


Fig.16 A) Expresión de ARNm-ST3N intrahipofisiaria de ratas ovariectomizadas (OVX) a las 10:00 h del P y sacrificadas a diferentes tiempos: 7, 14, 21, 28 y 45 días post-ovariectomía, en comparación con las concentraciones de ratas sacrificadas a las 10:00 h del M y del P. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; p<0.05. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

Contrariamente a lo esperado, en la gráfica 16 se observa que, a pesar de que se elimina la principal fuente de estrógenos endógenos por la castración durante 7 días, la expresión del ARNm-ST3N disminuye hasta alcanzar valores inferiores a los encontrados en las hipófisis de ratas intactas sacrificadas en la mañana del P ($p < 0.05$ en P vs. 7 días OVX). A los 14 días post-ovariectomía parece no haber ningún cambio con respecto a la expresión observada a los 7 días post-OVX, sin embargo a los 21 días se observó un incremento considerable (>2 veces; $p < 0.05$) en la expresión de la ST3N. Esta se incrementó gradualmente a los 28 y 45 días post-castración ($p < 0.005$ vs. 7 y 14 días OVX), hasta alcanzar los valores en los niveles de expresión del ARNm-ST3N comparables (sin diferencia estadística), pero en promedio inferiores con respecto a los observados en la mañana del M.

Con la finalidad de analizar el efecto de la castración sobre la expresión del ARNm-ST3N, se realizaron operaciones simuladas ("sham") en animales que se encontraban en la fase del P, y se sacrificaron en grupos de 3 a los 7, 21 y 45 días después de la operación y se obtuvo la hipófisis. También se revisó la citología vaginal de cada animal los 4 días previos a su sacrificio y los resultados obtenidos con los grupos de animales "sham" a los 7, 21 y 45 días post-operación indican que no existen diferencias significativas con respecto a los animales intactos y sacrificados en las diferentes fases del ciclo estral, indicando que la operación simulada no tiene efecto sobre la expresión del ARNm de la ST3N. La única diferencia notable con respecto a los animales intactos fue la pérdida en la regularidad de sus ciclos en el 50% de los animales "sham".

En humanos se ha informado que la deficiencia de estradiol induce la formación de isoformas de FSH más ácidas/sializadas presentes en el suero de pacientes menopausicas y que la administración de 17β -estradiol inhibe su formación (Wide y Naessen, 1994), por lo que se esperaba que las hipófisis de animales con ooforectomía bilateral por 7 y 14 días presentaran altas concentraciones de la enzima ST3N (y por consiguiente de su ARNm), responsable de la adición del ácido siálico a la FSH.

Estos resultados contradictorios abren la posibilidad de que existan otros factores gonadales (p. ej. activina, inhibina, folistatina u otro) que regulen la expresión de la enzima ST3N, que al momento de la remoción de los ovarios se pierdan también estos posibles factores y por tanto, en forma inversa al estradiol, se pierda la estimulación de su expresión hipofisaria.

EXPERIMENTO 3. ANIMALES INTACTOS + BE

Con la finalidad de analizar el papel que tiene el estradiol en la regulación del ARNm que codifica a la enzima ST3N, se utilizaron grupos de 6 ratas adultas cíclicas a los cuales se les administraron 10 µg de benzoato de estradiol (BE) o aceite de maíz (Vh) a las 10:00 h en el día del E (donde se encuentran las concentraciones más bajas del ARNm-ST3N) y se sacrificaron 24 horas después del tratamiento (fig. 17).

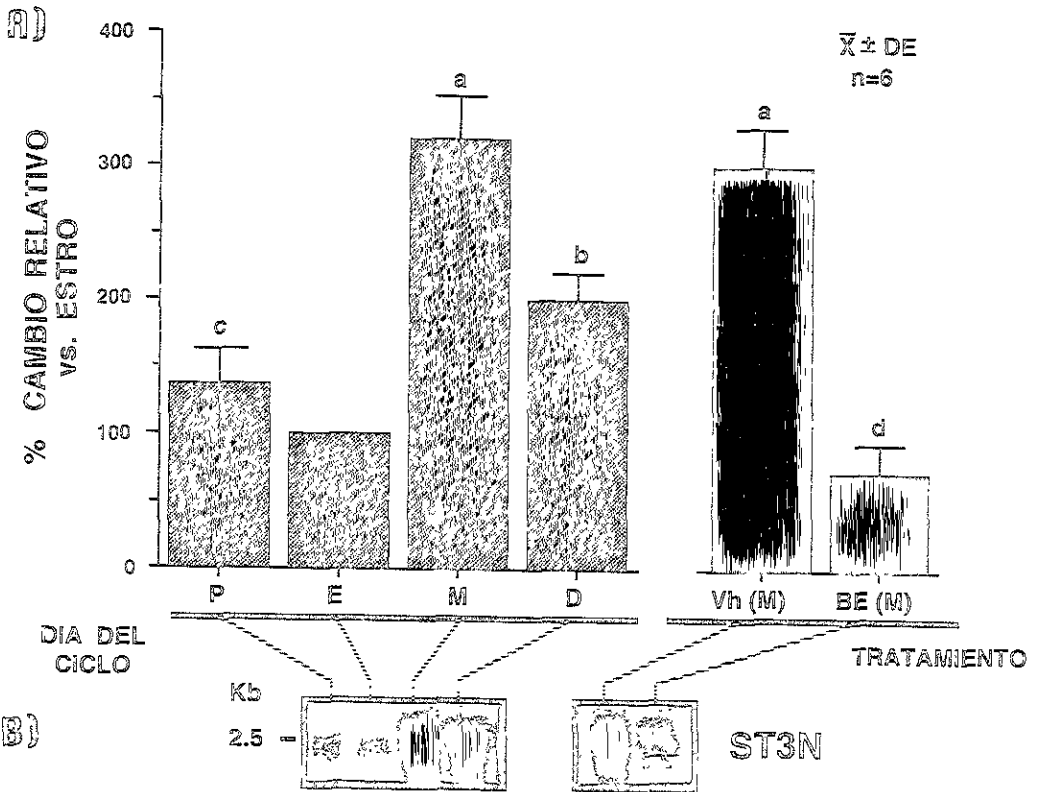


Fig. 17 A) Efecto del estradiol sobre la expresión del ARNm-ST3N en ratas adultas cíclicas. Inyección de benzoato de estradiol (BE) o aceite de maíz (Vh) en la mañana del E y sacrificadas 24 h después. Los resultados se expresan en relación a la concentración promedio del ARNm-ST3N durante el estro (la más baja), la cual constituye el 100%. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; p<0.05. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

En esta figura se muestra la gráfica comparativa entre las concentraciones del ARNm-ST3N durante la mañana del ciclo estral y los animales tratados con BE y con vehículo en el día del E. en la cual se expresa el porcentaje de cambio con respecto al promedio de la concentración presente en la etapa del E (100%).

Los animales que recibieron el estrógeno (BE) en la mañana del E y se sacrificaron 24 h después (en la mañana del M) presentan un decremento significativo ($>300\%$; $p < 0.001$) en la concentración del ARNm-ST3N con respecto a su testigo (Vh), hasta alcanzar concentraciones inferiores (80%) a las observadas durante la mañana del E. La expresión en los animales que recibieron solamente el aceite de maíz es de magnitud semejante a la de los animales sacrificados en la mañana del día del M ($p > 0.5$), por lo que se deduce que el aceite de maíz no tiene efecto sobre la expresión del ARNm-ST3N.

Con este experimento se demostró que la administración de un estrógeno de alta potencia biológica, como es el caso del BE, puede prevenir la expresión del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas donde naturalmente se expresaría en altas concentraciones.

EXPERIMENTO 4. RATAS OVX + BE

Siguiendo la misma lógica y con la finalidad de determinar si el estradiol es capaz de prevenir la expresión del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas hembra castradas por un período de 28 días, se realizó un estudio con 3 grupos de animales, donde el primero recibió 100 μ l de aceite de maíz (Vh), el segundo y tercero fueron tratados con 10 μ g de BE y sacrificados 24 y 48 horas después. Debido a la inconsistencia en los resultados obtenidos en animales castrados por 7 y 14 días y que las concentraciones observadas fueron semejantes en animales ovariectomizados por 28 y por 45 días, el efecto de los estrógenos en animales OVX se decidió realizar en aquellos ratas con 28 días de castración, que fue donde se observaron las concentraciones máximas en el experimento 2.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18, donde se puede observar que existe un decremento en las concentraciones del ARNm-ST3N del 40% en animales tratados con BE por 24 h y del 60% en aquellos que se sacrificaron 48 h después de la inyección del estrógeno, tomando como 100% de expresión al grupo Vh ($p < 0.005$ y $p < 0.001$ respectivamente).

Comparando los efectos del BE, a dosis iguales, en hipófisis de ratas hembra castradas con respecto a las intactas, se observa que el estrógeno administrado a animales OVX es incapaz de prevenir con la misma intensidad, la expresión del ARNm-ST3N como sucede con los animales intactos inyectados en la mañana del E y sacrificados en la mañana del M, donde la expresión baja a concentraciones semejantes a las basales. Sin embargo, se observa que el efecto inhibitorio del benzoato de estradiol se prolonga por más de 24 horas después de su administración.

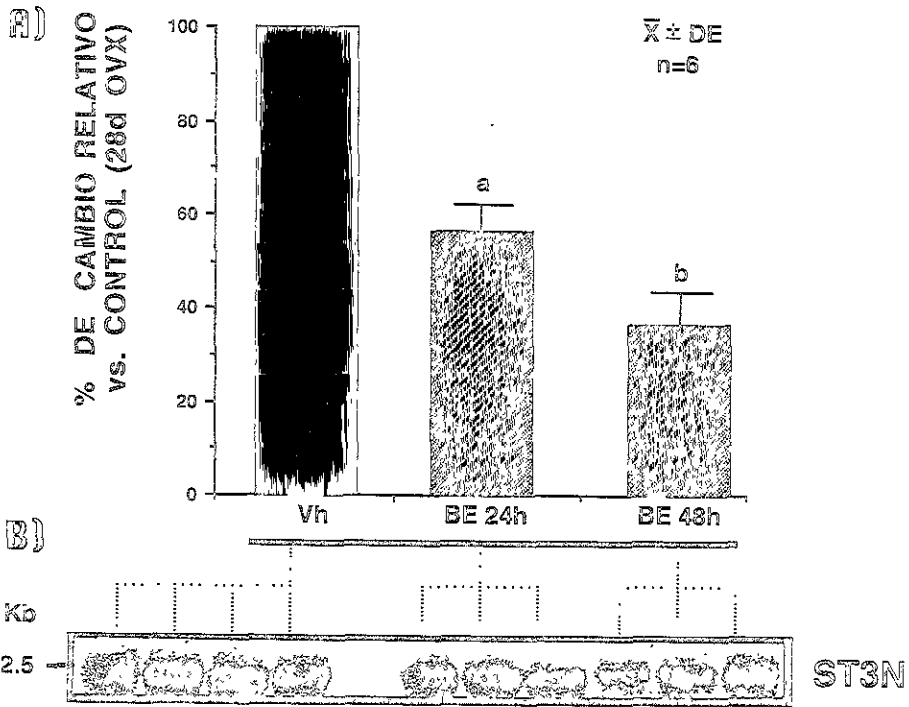


Fig. 18. A) Efecto del estradiol sobre la expresión del ARNm-ST3N en ratas ovariectomizadas por 28 días. Inyección de aceite de maíz (Vh) o benzoato de estradiol (BE) y sacrificadas 24 y 48 h después. Los resultados se expresan en relación a la concentración promedio del ARNm-ST3N de los animales tratados con Vh (máximo incremento), el cual constituye el 100%. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

Estos resultados, tomados en conjunto con los datos obtenidos en el experimento con animales OVX, reflejan que la regulación de la expresión génica de la ST3N se encuentra modificada cuando se remueven los ovarios, ya que pueden existir otros factores que son eliminados (además de los estrógenos) e intervienen en la regulación de la expresión de esta enzima.

EXPERIMENTO 5. ANIMALES INTACTOS + ICI

Para demostrar que el efecto inhibitorio de los estrógenos exógenos sobre la expresión del ARNm-ST3N es a través del receptor de estrógenos, se inhibió la actividad fisiológica del estradiol endógeno mediante el empleo de un antiestrógeno puro, de alta potencia antagonista, el ICI 182,780 (ICI; Wakeling y cols., 1991) en animales intactos. Este se administró a las 10:00 h del día del M (etapa donde se obtuvo la máxima expresión) y se sacrificaron 8 y 24 horas después, en estadíos comparables con M a las 18:00 h y D a las 10:00 h.

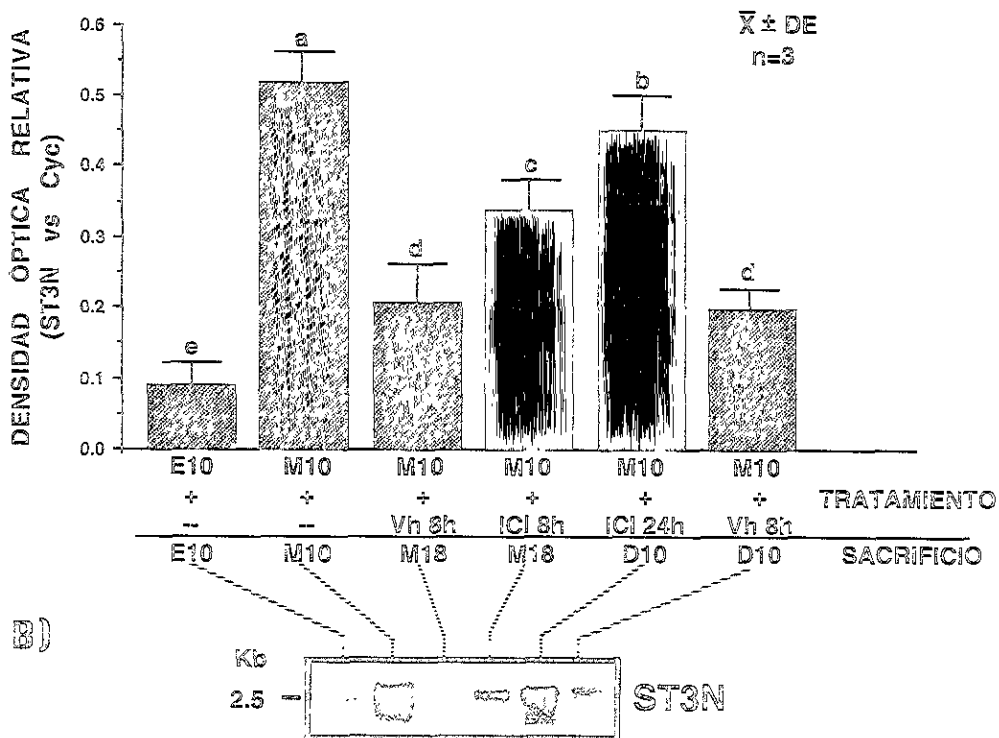


Fig. 19 A) Efecto de un antiestrógeno puro sobre la expresión del ARNm-ST3N en ratas intactas. Inyección de propilén glicol (Vh) o de 2 mg de ICI 182,780 / Kg de peso corporal (ICI) a ratas intactas a las 10 horas del día del metaestro y sacrificadas 8 y 24 horas después de la administración. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

En los resultados mostrados en la figura anterior se observa un incremento significativo (170%; $p < 0.05$) en las concentraciones del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas que fueron tratados con el antiestrógeno ICI y se sacrificaron 8 horas (ICI 8 h) después, en comparación con los animales inyectados con el vehículo y sacrificados 8 h después de la inyección (Vh 8 h).

Este incremento se hizo más evidente (220 %; $p < 0.005$) cuando las hipófisis se obtuvieron de animales sacrificados 24 h después del tratamiento con ICI (ICI 24 h), al compararse con su respectivo control (Vh 24 h), revirtiéndose el efecto inhibitorio del incremento en las concentraciones del estradiol endógeno hacia la tarde del M y mañana del D. A pesar de que la potencia antiestrogénica del ICI es alta, el incremento en la expresión del ARNm-ST3N en ratas ICI 24 h no alcanza las concentraciones encontradas en las hipófisis de ratas intactas sacrificadas en la mañana del M (89%; $p < 0.05$).

EXPERIMENTO 6. ANIMALES OVX + BE + ICI

Con la finalidad de conocer si el antiestrógeno ICI es capaz de revertir el efecto inhibitorio del estradiol exógeno sobre la expresión del ARNm-ST3N en animales ooforectomizados, 3 grupos de animales OVX por 28 días fueron inyectados con aceite de maíz y propilén glicol (Vh), benzoato de estradiol (BE) por 24 horas (BE 24 h) y por 48 horas (BE 48 h) o una combinación de BE y el antiestrógeno ICI (BE + ICI). Como punto de referencia se incluyó ARN hipofisiario de animales sacrificados a las 10:00 h del día del P (P 10) en que se realizó la castración y donde las concentraciones del ARNm-ST3N son bajas.

En la figura 20 se observa que el antiestrógeno ICI pudo revertir en un 85% el efecto supresor del BE sobre de la síntesis del ARNm-ST3N si se compara con los animales Vh ($p < 0.05$) y casi un 150 y un 250% con respecto a los animales tratados con BE por 24 y 48 horas ($p < 0.005$ y $p < 0.001$) respectivamente.

Si se comparan estos resultados con el experimento 4, animales OVX + BE, se observa el mismo patrón de inhibición de la expresión dependiente del tiempo de exposición al estrógeno exógeno; sin embargo, si se comparan con los resultados obtenidos en el experimento 5, animales intactos + ICI, el antiestrógeno tampoco es capaz de revertir totalmente el efecto inhibitorio de los estrógenos, en este caso del BE exógeno.

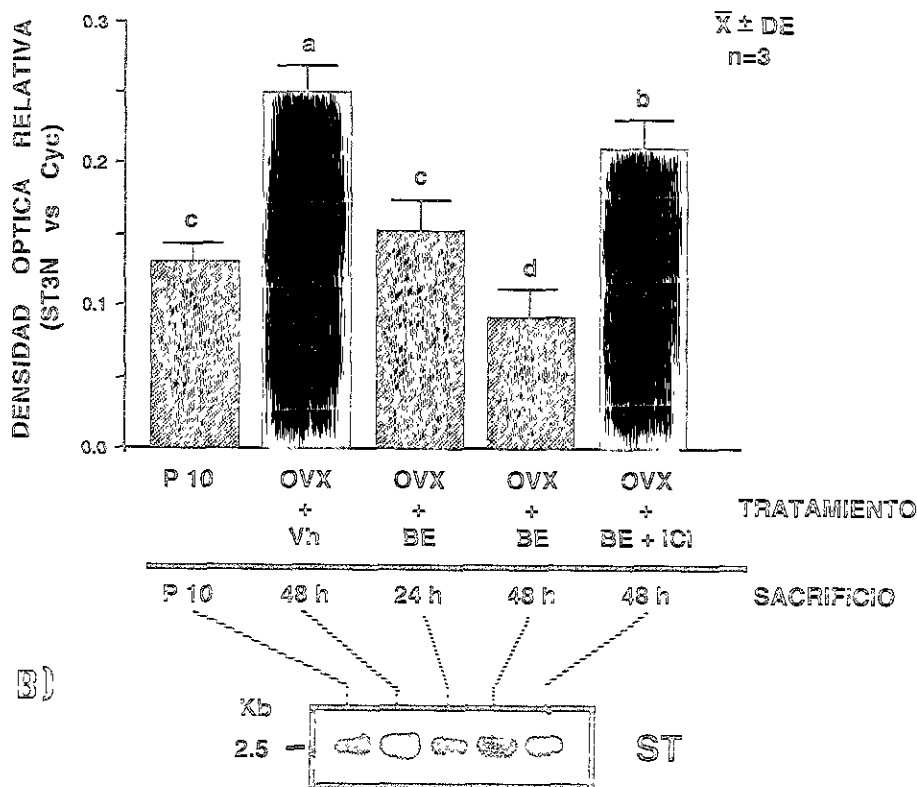


Fig. 20. A) Efecto del antiestrógeno ICI 182,780 sobre la expresión de la ST3N en animales ovariectomizados. Se inyectaron 100 μ l de aceite de maíz/propilén glicol 1:1 (Vh), 10 μ g de benzoato de estradiol (BE) o la combinación de BE y 2 mg de ICI 182,780 / Kg de peso corporal (ICI) a las 10 de la mañana a ratas con 28 días de ovariectomía (OVX). Se sacrificaron 24 y 48 h después y se obtuvieron las hipófisis para cuantificar el ARNm-ST3N. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridaron los ARN's totales con la sonda de ST3N.

C) ISOFORMAS DE LA FSH DE RATA

ISOFORMAS DURANTE EL CICLO ESTRAL

En la figura 21 se muestra un patrón representativo de los resultados obtenidos de los cromatofocos de hipófisis de rata hembra en las diferentes fases del ciclo estral, en donde las isoformas fueron separadas en función a sus puntos isoeléctricos [pI]. Las hipófisis utilizadas en cada caso fueron obtenidas a las 10:00 h de cada uno de los 4 días del ciclo estral.

Los patrones de distribución por carga de las isoformas de la FSH intrahipofisaria muestran en el eje de las abscisas el número de fracción colectado (2 ml por fracción), mientras que en el eje de las ordenadas izquierdo se encuentra la concentración de FSH expresado en ng del estándar RP-2 / ml y en el eje Y derecho las unidades de pH para el gradiente, el cual se denota con una línea que atraviesa la gráfica de arriba a la izquierda hacia abajo a la derecha.

Las isoformas se dividieron en aquellas con un $\text{pH} \geq 5.0$ (menos ácidas) y aquellas que eluyeron en un $\text{pH} < 5.0$ (más ácidas/sializadas), separación que se denota mediante una raya continua al centro de la gráfica. Cuando el gradiente alcanzó el $\text{pH} = 4.0$ se adicionó la solución de cloruro de sodio 1 M (señalado con una flecha), con lo que se forzó a aquellas isoformas de FSH que no eluyeron en el gradiente de pH entre 7.4 y 4.0 a salir de la columna. fracciones a las que se les denominó "pico de sal" y se incluyen con las isoformas más ácidas.

De las gráficas de la figura 21 se observa que existe un predominio de las isoformas que eluyeron a un $\text{pH} < 5.0$ en las etapas de Estro (Fig.21-B), Metaestro (Fig. 21-C) y Diestro (Fig. 21-D), mientras que en el Proestro (Fig. 21-A) se observa un predominio de las isoformas menos ácidas.

Estos resultados concuerdan con lo informado previamente (Ulloa-Aguirre y cols., 1995) y confirman la existencia de mecanismos de regulación en la formación de formas moleculares de la FSH en la hipófisis a lo largo del ciclo estral de la rata, en función de las necesidades fisiológicas del animal, de tal manera que las formas con menor contenido de ácido siálico (mayor actividad biológica) se sintetizan y liberan a la circulación en estados previos a la ovulación con la finalidad de ejercer un fuerte estímulo al folículo ovárico preovulatorio, mientras que las formas más sializadas se sintetizan y liberan con la finalidad de reclutar folículos primarios que pudieran ser estimulados durante el siguiente ciclo.

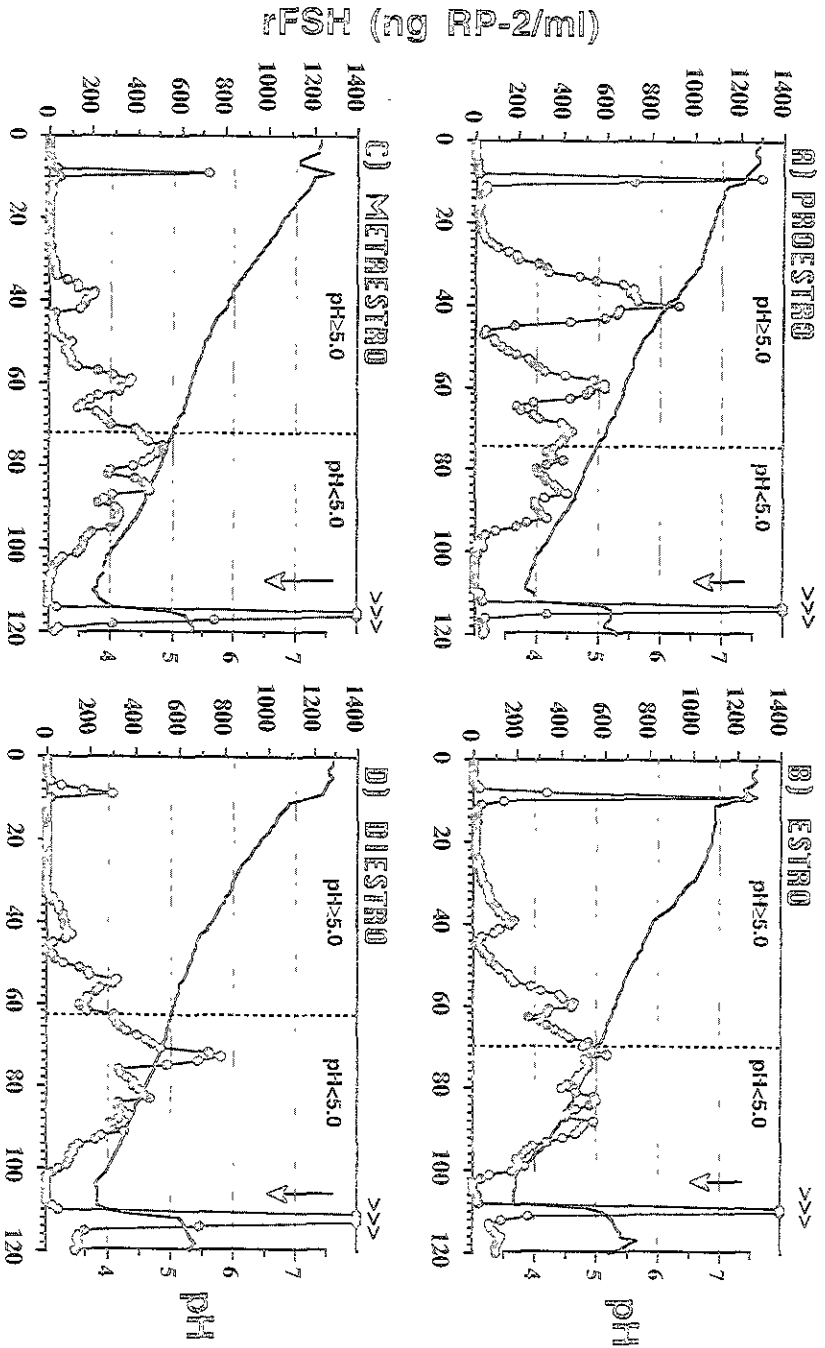


Fig. 21 Patrones de distribución de las isoformas de FSH después del CI¹ de extracto de hipófisis de ratas adultas sacrificadas a las 10:00 h en los días del A) Proestro, B) Estro, C) Metaestro, y D) Diestro. La línea discontinua a la mitad de cada gráfica indica la separación entre las isoformas más ácidas (pH < 5.0) y las menos ácidas (pH > 5.0); la línea descendente que atraviesa las gráficas representa el gradiente de pH, y la flecha indica la adición de 1M NaCl después del cual se generan las isoformas denominadas "pico de sal".

La gráfica 22 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos a partir de los cromatoenfocos de hipófisis de ratas a lo largo del ciclo estral, donde se pueden observar las diferencias en la expresión de isoformas más ácidas con respecto a las menos ácidas. Durante el ciclo estral se observa que en la mañana del día del P, previo a la ovulación, es la única fase que presenta una mayor proporción relativa de isoformas menos ácidas con respecto a las más ácidas. Esta relación se invierte en los otros estadios, incrementándose paulatinamente la proporción de isohormonas más ácidas, y disminuyendo las que contienen menos ácido siálico. Al correlacionar estos resultados con los obtenidos en la expresión del ARNm-ST3N (Fig. 14 y 15), se observa una predominancia de isoformas más sializadas en las fases del M y del D, cuando la expresión del ARNm-ST3N intrahipofisiaria es más alta.

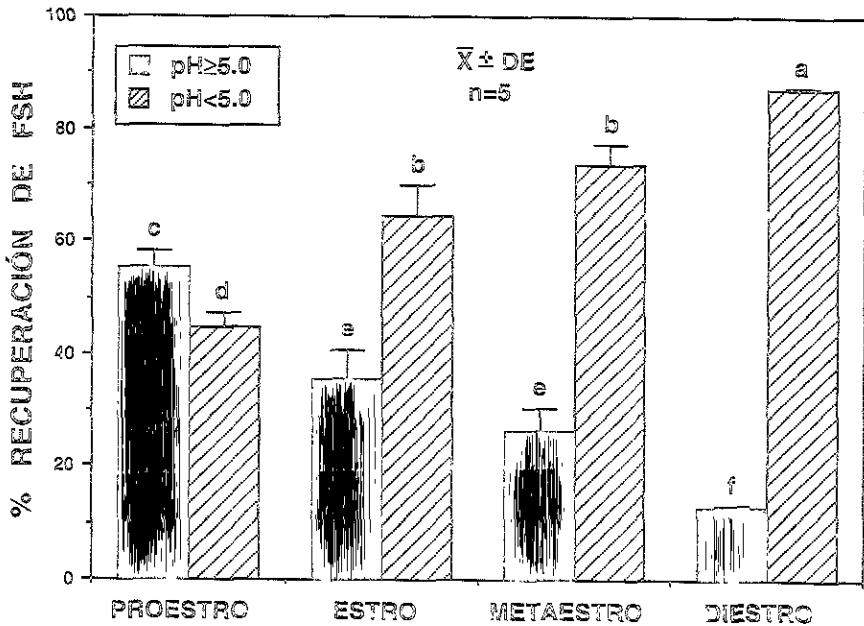


Fig. 22 Porcentajes de recuperación de las isoformas de FSH separadas por cromatoenfoco de hipófisis de ratas en diferentes estadios del ciclo estral durante la mañana de cada día. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras $p < 0.05$.

ISOFORMAS DE LA rFSH EN RATAS OVX

En las figuras 23 a 27 se muestran los patrones de distribución por carga de los cromatoenfocos de hipófisis de ratas ovariectomizadas y sacrificadas a diferentes tiempos. En todas las gráficas se observa un mayor porcentaje de isoformas con más ácido siálico ($pH < 5.0$) con respecto a las menos ácidas, sin embargo, en hipófisis obtenidas de ratas con 7, 14 y 21 días postcastración (figuras 23-25) se observa que las formas más sializadas son mucho más abundantes que las menos ácidas, si se comparan con la distribución de isoformas de FSH de hipófisis de ratas sacrificadas 28 y 45 días después de la castración (figuras 26 y 27).

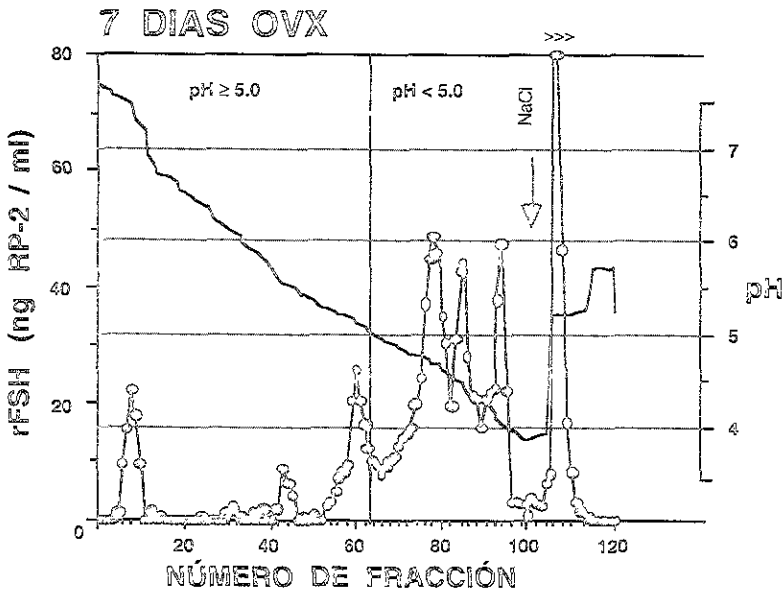


Fig. 23 Patrón representativo de las isoformas de FSH obtenidas de hipófisis de ratas sacrificadas 7 días post-ovariectomía.

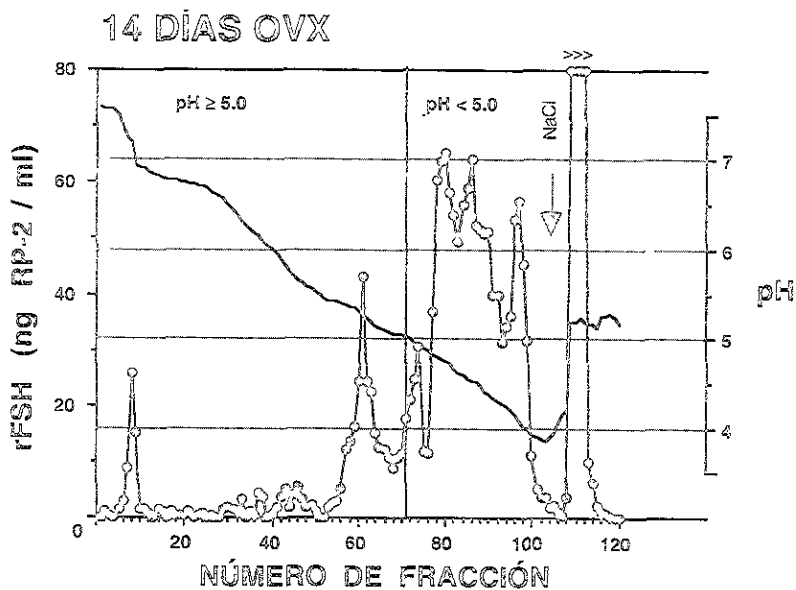


Fig. 24 Patrón representativo de las isoformas de rFSH obtenidas de hipófisis de ratas sacrificadas 14 días post-ovariectomía.

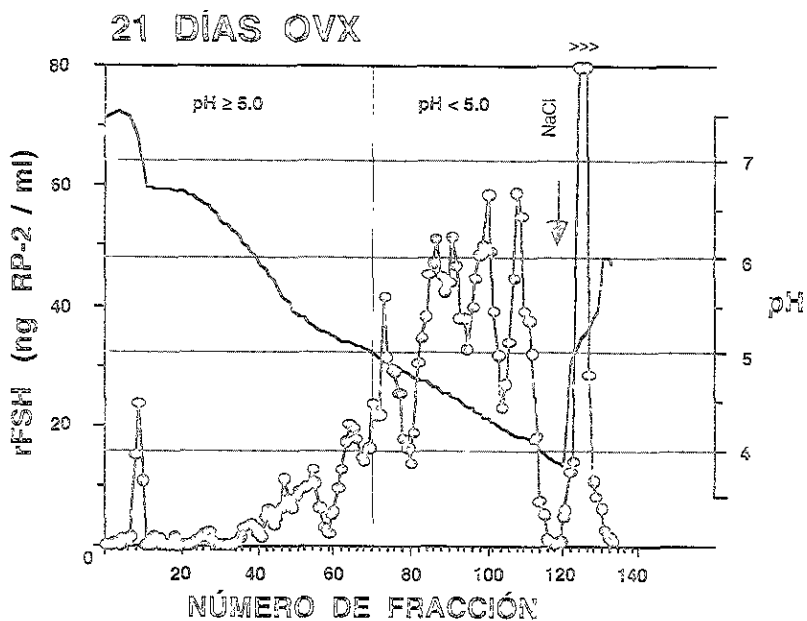


Fig. 25 Patrón representativo de las isoformas de rFSH obtenidas de hipófisis de ratas sacrificadas 21 días post-ovariectomía.

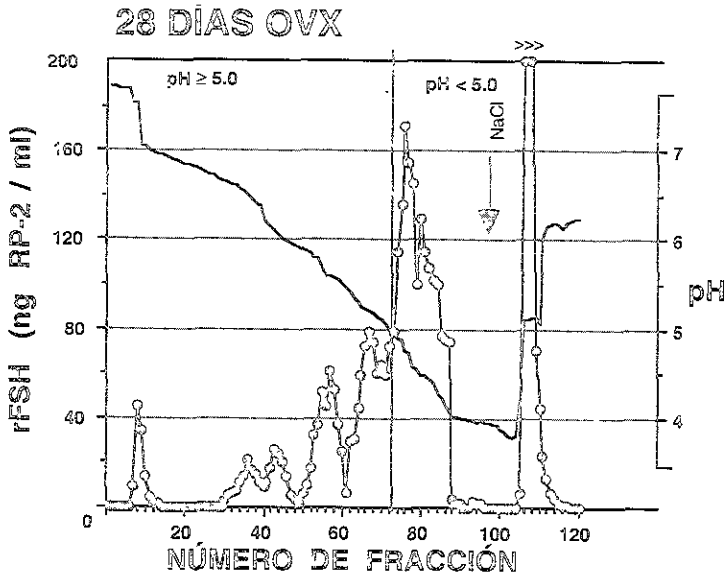


Fig. 26 Patrón representativo de las isoformas de rFSH obtenidas de hipófisis de ratas sacrificadas 28 días post-ovariectomía.

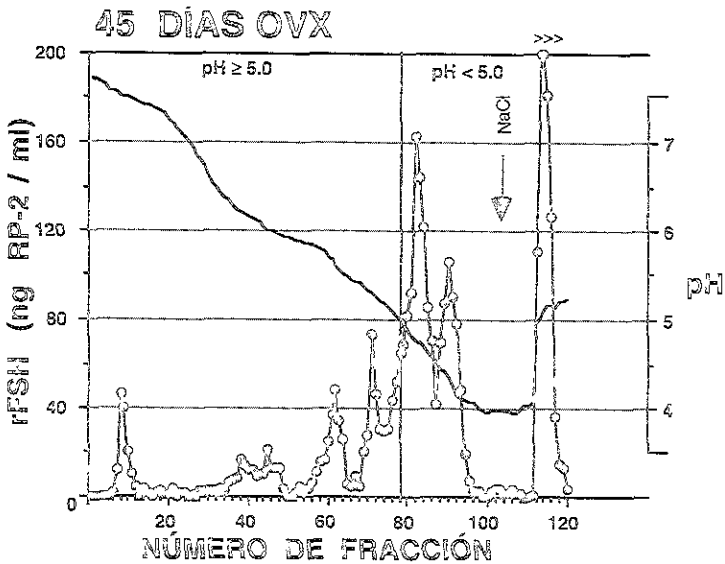


Fig. 27 Patrón representativo de las isoformas de rFSH obtenidas de hipófisis de ratas sacrificadas 45 días post-ovariectomía.

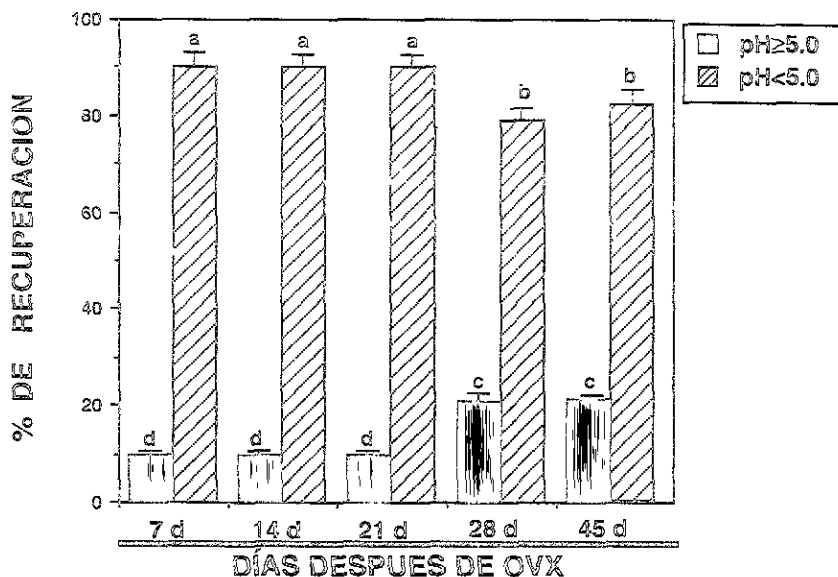


Fig. 28. Porcentajes de recuperación de isoformas de rFSH separadas por cromatoenfoques de hipófisis de ratas ovariectomizadas y sacrificadas a diferentes intervalos.

Esta gráfica muestra los resultados obtenidos en los cromatoenfoques de hipófisis de ratas sacrificadas a diferentes intervalos después de la remoción de las gónadas, los cuales son expresados en porcentaje de recuperación. La proporción relativa de isoformas ácidas separadas de las hipófisis de animales castrados es mayor en todos los casos con respecto a las formas menos ácidas; sin embargo existe un incremento de estas últimas isohormonas de FSH a los 28 y 45 días post-OVX. Mientras que en el ciclo estral existe correlación entre los resultados obtenidos en los cromatoenfoques (fig. 28) y la expresión del ARNm-ST3N (fig. 16), en los cromatoenfoques de animales ovariectomizados hay una falta de correlación, ya que mientras la expresión del ARNm de la enzima permanece baja en los días 7 y 14 post-ovariectomía, la proporción relativa de isoformas más sializadas es mayor. En el caso de las hipófisis obtenidas 21 días postcastración se observa incremento en la concentración del ARNm de la enzima, cuando la proporción relativa de isohormonas aún no ha cambiado con respecto a 7 y 14 días postcastración. Contrario a lo que se esperaba, el ARNm-ST3N se incrementa simultáneamente con la cantidad de isoformas menos sializadas a partir de los 28 días y hasta los 45 días post-ovariectomía, lo que pudiera indicar que la regulación en la síntesis y secreción de isoformas de la FSH en animales ovariectomizados está controlada en forma diferente al animal intacto, ya que la remoción de los ovarios pudiera impedir que otros factores gonadales incidan sobre el eje hipotálamo-hipófisis, y se activen o dejen de activarse otros mecanismos alternos de sialización de la FSH.

D) CONCENTRACIONES HORMONALES

La figura 29 muestra las concentraciones séricas de la FSH y la LH, medidas por medio de sus respectivos RIA's, de los animales sacrificados durante la mañana (10:00 h) de los diferentes días del ciclo estral. La sensibilidad para ambas determinaciones fue de 0.1 ng/ml y 0.05 ng/ml para FSH y LH respectivamente.

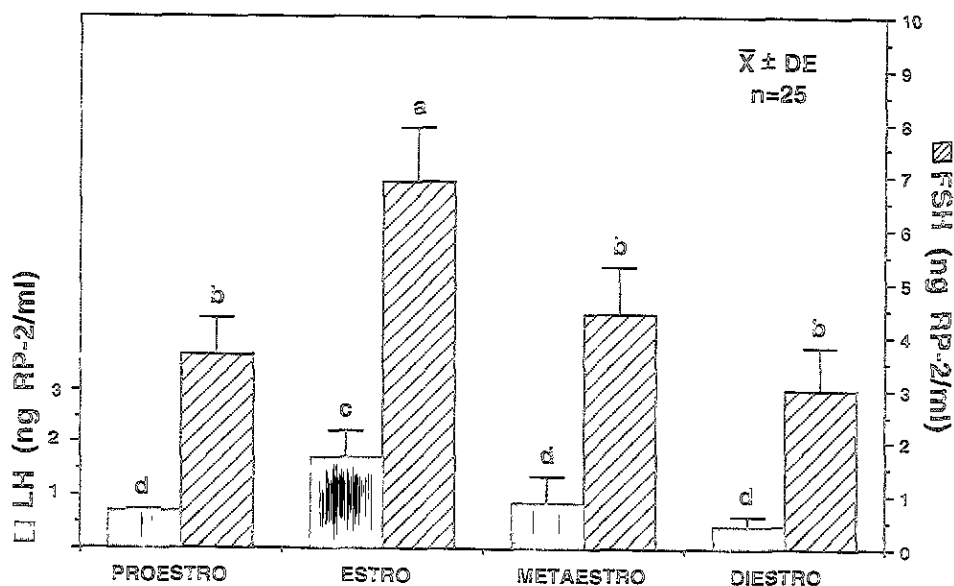


Fig. 29 Concentraciones séricas de las hormonas de rata FSH y LH en los cuatro días del ciclo estral sacrificados a las 10:00 h. Las diferencias significativas entre los grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$.

Las concentraciones séricas de ambas gonadotropinas, de acuerdo a lo publicado por Smith (1975) y Freeman (1994) (ver figura 10), se incrementa en la tarde (15:00 a 17:00 h) del día del P. En el caso de la LH aumenta rápidamente su secreción y la máxima concentración se observa a las 17:00 h, descendiendo hasta concentraciones basales en la mañana del E. Para la FSH se presentan dos incrementos, uno entre las 17 y 21:00 h del P y el segundo en la madrugada del día del E, bajando su concentración durante la tarde y noche del P. Congruente con estos informes, en la gráfica 29 se tiene una visión parcial de las concentraciones séricas de las gonadotropinas hipofisarias, donde solamente se alcanza a observar un incremento en ambas hormonas en la mañana del estro, lo que representa el descenso en sus concentraciones proveniente de la tarde del día del P y madrugada del E.

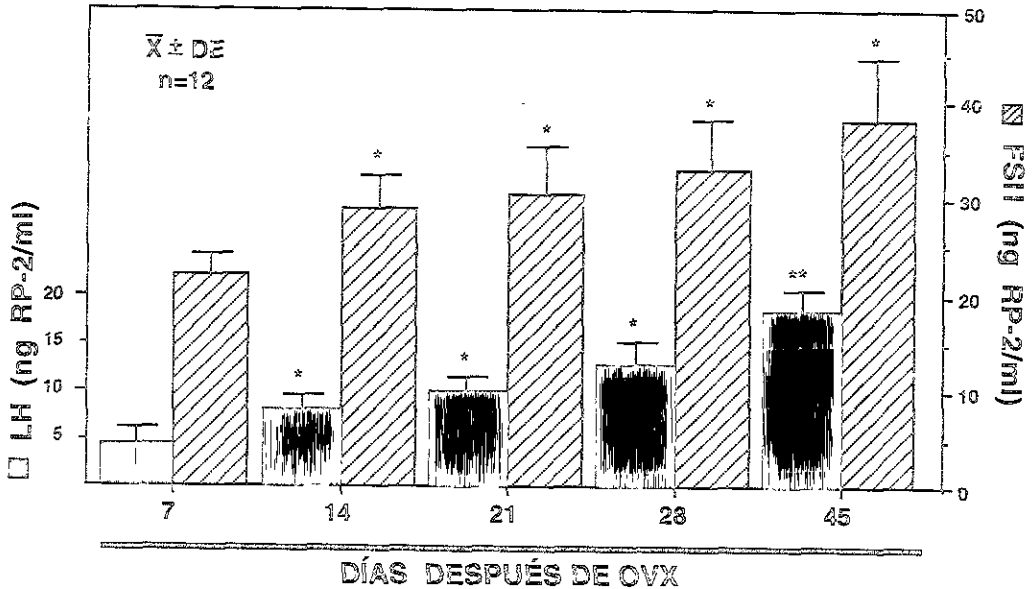


Fig. 30 Concentraciones séricas de las hormonas de rata FSH y LH de animales ovariectomizados. Diferencias significativas con respecto a los animales sacrificados después de 7 días de castración se denotan con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.005$

Las concentraciones séricas de las gonadotropinas hipofisarias de ratas sacrificadas a diferentes intervalos de tiempo después de ser ovariectomizados, en la mañana del día del P, se muestran en la figura 30. Para hacer el análisis estadístico, los resultados se comparan con respecto a las concentraciones encontradas en los animales sacrificados después de 7 días de castración.

En el caso de las concentraciones séricas de FSH en animales castrados, éstas se incrementan rápidamente a los 7 días de gonadectomía y después hay un incremento en el día 14 que corresponde al 30% respecto al período anterior, mientras que entre los días 21 y 28 la velocidad en el incremento en la concentración de FSH es menor, si se compara con la inicial, pero constante (7-10%) y entre 28 y 45 días se incrementan las concentraciones con mayor rapidez (15%), pero más lentamente que en aquellos animales sacrificados por un período de tiempo corto.

Los incrementos en concentraciones de la LH sérica se comportan de manera similar a la FSH, con un incremento rápido durante el período corto de ovariectomía (40-50%), seguido de incrementos moderados hacia los 14, 21 y 28 días de castración y un aumento en la concentración de hormona entre los 28 y los 45 días post-OVX.

Congruente con lo informado (Ward y cols., 1991), el incremento de moderado a alto en las concentraciones séricas de LH y de FSH es debido a la pérdida de la retroalimentación negativa de los esteroides gonadales estradiol y progesterona (Freeman, 1994).

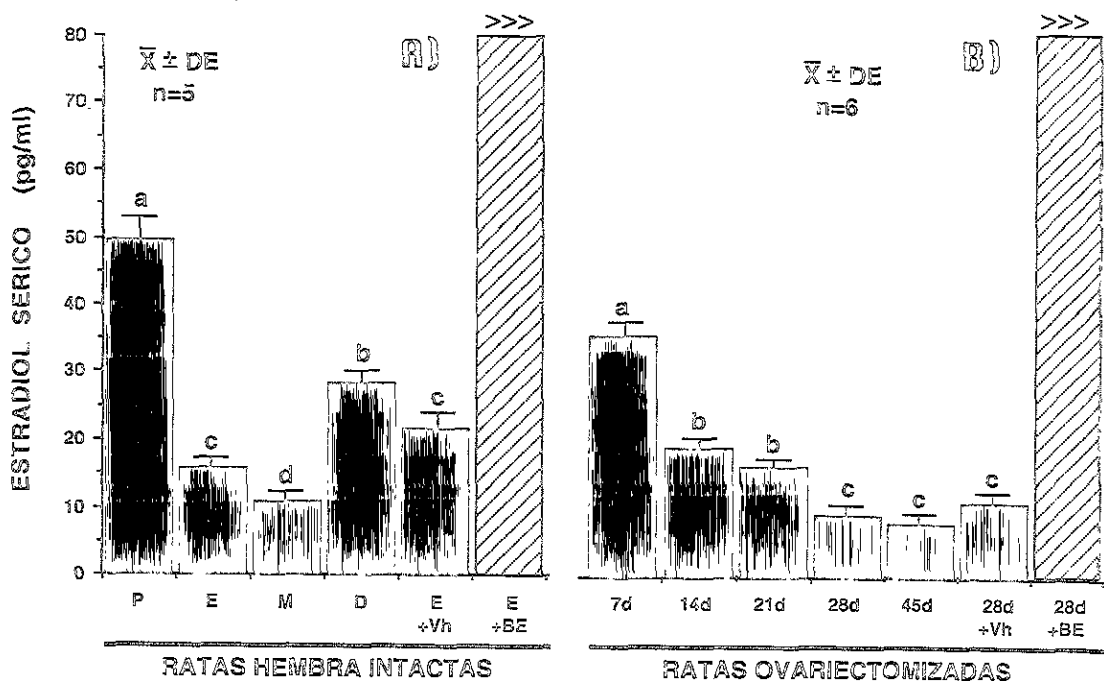
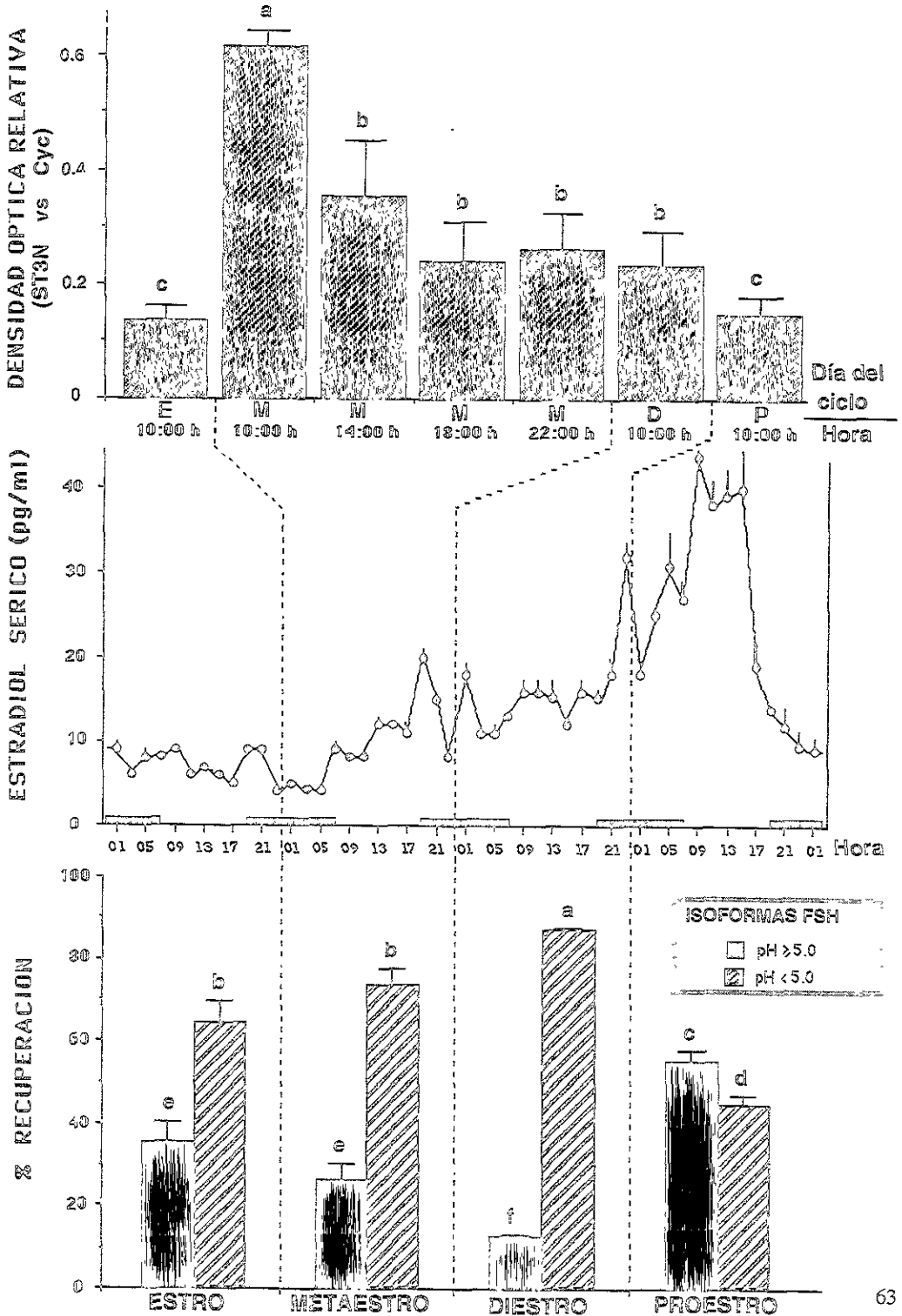


Fig. 31 Concentraciones de 17β -estradiol sérico de animales sacrificados; A) en la mañana (10:00 h) de los diferentes días del ciclo estral en comparación con aquellos inyectados con vehículo (Vh) o benzoato de estradiol (BE) y sacrificados en el día del E. B) Animales sacrificados a diferentes intervalos (7, 14, 21, 28 y 45 días) después de la ovariectomía en comparación con animales ovariectomizados por 28 días y tratados con Vh o con BE. Diferentes letras minúsculas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para cada grupo, sin tomar en cuenta a los animales tratados con BE, donde las concentraciones son muy elevadas (>>>).

Las concentraciones séricas de estradiol en ratas intactas y ovariectomizadas se muestran en la figura 31. Durante el ciclo estral, el estradiol presenta su máxima concentración en la mañana del día del P, disminuyendo a una tercera parte durante la mañana del E y a concentraciones basales en el día del M (20% con respecto a las observadas en P); durante la mañana del D se inicia el incremento nuevamente (45% con respecto a P) que culminará en el máximo incremento presentado entre la 09:00 y las 17:00 h (fig. 32, panel medio, reproducido de Smith y cols., 1975). La administración de aceite de maíz en el día del E no modificó la concentración de estradiol con respecto a su correspondiente día en animales intactos ($p > 0.05$).

En el caso de animales ovariectomizados en el día del P, después de 7 días de castración se observan altas concentraciones de estradiol sérico, que disminuye en un 50% ($p < 0.05$) en animales con 14 y 21 días post-OVX, y en 75% ($p < 0.005$) en ratas con 28 y 45 días de castración. Al igual que en animales intactos, la inyección de aceite de maíz a animales con 28 días post-OVX no modificó su concentración de estradiol ($p > 0.05$).

Fig. 32 (HOJA SIGUENTE) **PANEL SUPERIOR**) Expresión del ARNm-ST3N a las 10:00 h de los días del D, P y E, así como en M a las 10:00, 14:00, 18.00 y 22:00h. **PANEL MEDIO**) Concentraciones de estradiol en suero de rata obtenido a intervalos de 2 horas a lo largo de cada uno de los días del ciclo estral, cada punto representa la concentración media de estradiol de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan los períodos de obscuridad en que se mantuvo a los animales. **PANEL INFERIOR**) Distribución de isoformas moleculares de FSH durante el ciclo estral. Las barras sólidas muestran las isoformas menos ácidas y las barras ralladas las isoformas más ácidas



9.- CONCLUSIONES

Se ha demostrado previamente que cambios en la cantidad de residuos de ácido siálico pueden tener efectos biológicos tan variados como la modificación en la distribución por carga eléctrica de la FSH, generando diferentes isohormonas, y la modulación de las propiedades biológicas de la FSH circulante, por lo que es indudable que éstos juegan un papel fisiológico importante ya que contribuyen a ajustar la actividad estimulante de los folículos a necesidades temporales (Ulloa-Aguirre y cols., 1995; Padmanabhan y cols., 1999).

Con la finalidad de demostrar que las variaciones en la carga eléctrica de la FSH están determinadas principalmente por la modificación en el contenido del ácido siálico como residuo terminal (Zerfaoui y Ronin, 1996), se realizaron estudios en los que se incubaron diferentes preparaciones de FSH con la enzima desializante neuraminidasa, observándose que la cantidad de isoformas más ácidas disminuyó y la de formas menos ácidas se incrementaron en forma proporcional al tiempo de incubación, hasta que solamente se detectaron isoformas que eluyeron en valores de pH iguales o mayores a 6.4 (Chappel y cols., 1984; Ulloa-Aguirre y cols., 1984; Galway y cols., 1990a).

La modulación de las propiedades biológicas de la FSH por el ácido siálico, radica en el hecho de que cuando la molécula de FSH presenta menor cantidad de estos residuos, se generan isoformas menos ácidas, lo que le confiere mayor afinidad por su receptor y una mayor respuesta hormono-específica. Por otro lado, la vida media plasmática de las isoformas más sializadas aumenta notablemente (Ulloa-Aguirre y cols., 1995)

La importancia de estudiar la regulación en la expresión de la enzima responsable de la adición de residuos de ácido siálico a la molécula de FSH, la α 2,3-sialiltransferasa o ST3N, llevó a realizar el presente trabajo de investigación, en donde se demuestra por primera vez que las concentraciones de su ARNm en la hipófisis anterior cambian significativamente de acuerdo a la hora y el día del ciclo estral y que la dinámica de estos cambios en las concentraciones del ARNm-ST3N están asociados temporalmente con variaciones en las concentraciones de estradiol sérico.

Basados en la secuencia del ADNc de la enzima ST3N publicada por Wen (1992b) se diseñaron los oligonucleótidos apropiados para sintetizar un fragmento del ADNc que abarcara exclusivamente la región de sialización con alta especificidad de la enzima (excluyendo la región de sialización denominada "sialilmotif"), y que presentara la menor homología con el resto de los, por lo menos, 15 miembros de esta familia de sialiltransferasas. Se analizó la secuencia de nucleótidos del producto de RT-PCR y se comprobó su especificidad al hibridar esta sonda con ARN's provenientes de tejidos, incluyendo la hipófisis, en los que se informó su expresión.

En un primer experimento se determinó que el ARNm-ST3N se expresa en forma diferencial durante el ciclo estral de la rata, teniendo su máxima expresión durante la mañana del M, fase en la cual la concentración de estradiol sérico se encontró relativamente baja, hayazgo que se correlaciona con la predominancia de isoformas de FSH más ácidas (fig. 32). Durante los días que preceden a la ovulación (D y P) se observó la disminución progresiva del ARNm-ST3N en paralelo con el incremento en las concentraciones séricas de estradiol, alcanzando sus valores más bajos inmediatamente antes y después de la máxima exposición de la hipófisis a esteroides sexuales, es decir, en el día del P y la mañana E respectivamente, siendo en el día del P (seguido del estro) donde se han aislado la mayor proporción relativa de isoformas de FSH con menor contenido de ácido siálico (Fig. 32).

En forma inversa, se observó incremento significativo en las concentraciones del ARNm-ST3N al tiempo en que la liberación de estradiol era más baja en el ciclo estral (metaestro) y en animales castrados por 28 días, lo que sugiere que los cambios en las concentraciones de estradiol pueden influir en la síntesis, velocidad de transcripción o estabilidad del ARNm de esta glicosiltransferasa. Esta posibilidad se apoyó en los experimentos en los cuales se demostró que la administración de benzoato de estradiol en la mañana del E o después de 28 días de castración, bloqueó el incremento natural del ARNm-ST3N como resultado de las bajas concentraciones séricas del estradiol. Aparentemente, el efecto supresivo del estradiol sobre la expresión del ARNm-ST3N se pudo prolongar por varias horas o aún por días después de la exposición máxima a este esteroide, efecto que se vió reflejado en la persistencia de bajas concentraciones del ARNm de esta enzima durante la mañana del E y después de la remoción de las gónadas en el día del P. Sin embargo, el hecho de que se hayan mantenido bajas las concentraciones del ARNm-ST3N durante al menos catorce días después de la ovariectomía y que la respuesta al estradiol exógeno en los animales gonadectomizados se atenuó considerablemente con respecto al comportamiento exhibido en los animales intactos, sugiere que otros factores extrahipofisarios podrían estar involucrados en el control de la expresión de esta enzima.

El empleo del antiestrógeno ICI 182,780 sirvió para comprobar la idea de que la regulación en la expresión del gen de la ST3N es vía el receptor citoplasmático de estrógenos. Este antiestrógeno fue capaz de contrarrestar casi en su totalidad el efecto inhibitorio del estradiol endógeno en animales intactos y del exógeno en animales ovariectomizados, lo que provocó que se incrementara la expresión del ARNm-ST3N; sin embargo, el efecto antiestrogénico del ICI sobre la ST3N fue menor en animales ovariectomizados por 28 días pretratados con estrógenos endógenos.

El fraccionamiento por cromatografía de extractos hipofisarios permitió la identificación de patrones de distribución por carga de FSH particulares para cada día del ciclo estral, donde se observó el incremento más significativo en la abundancia relativa de isoformas de FSH menos ácidas durante la mañana del día del P y en menor grado durante el E, tiempos en los que las concentraciones del ARNm-ST3N fueron menores. Sin embargo, esta relación inversa entre la abundancia de isoformas menos ácidas y la disminución en las concentraciones del ARNm-ST3N estuvo prácticamente ausente durante el resto de los días del ciclo, particularmente en el D, así como también después de siete y catorce días de la ovariectomía, condiciones durante las cuales la abundancia relativa de isoformas más ácidas fue mayor y las concentraciones de ARNm-ST3N disminuyeron considerablemente.

La existencia de una correlación parcial, más que total, entre las concentraciones de ARNm-ST3N y los cambios en la distribución de isoformas de FSH se puede deber a los siguientes factores: 1) La participación concomitante de otras sialiltransferasas (principalmente la ST6N) u otras glicosiltransferasas y sulfatasas, las cuales podrían estar a su vez reguladas por uno o varios factores extrahipofisarios, que participan en el procesamiento postraduccional de la FSH (Dharmesh y Baenziger, 1993; Rafferty y cols., 1995); 2) variaciones en la disponibilidad de sustrato, lo cual podría permitir la sialización efectiva en condiciones caracterizadas por bajas concentraciones enzimáticas de la enzima y reducida producción de FSH, como sucede en los días del M y D (Ortolano y cols., 1988; Freeman, 1994) y 3) la incapacidad de nuestro sistema de RIA de FSH para distinguir entre el incremento en la producción de isoformas más sializadas y la disminución en la inmunogenicidad de epítopes presentes en ciertas glicofomas de FSH, las cuales contienen estructuras de oligosacáridos menos complejos y cuya abundancia relativa podría estar incrementada. (Leipheimer y cols., 1984; Dahl y Stone, 1992; Luderer y cols., 1993; Phillips y cols., 1994; Phillips y cols., 1996; Stanton y cols., 1996; Phillips y cols., 1997).

Los resultados obtenidos no permiten precisar si el estradiol modifica las concentraciones del ARNm-ST3N y por lo tanto la sialización de la FSH, actuando directamente en el gonadotropo o indirectamente sobre el hipotálamo regulando la actividad de GnRH o por una combinación de ambas. De hecho, algunos estudios involucran al péptido hipotalámico GnRH en la modulación de la glicosilación y en el grado de heterogeneidad de la LH y la FSH dependiente de ácido siálico (Galle y cols., 1983; Ulloa-Aguirre y cols., 1992c; Phillips y Wide, 1994); sin embargo, estudios *in vivo* más recientes, empleando animales experimentales y en humanos, han permitido la distinción entre los sitios hipofisiario e hipotalámico que son regulados por los estrógenos (Padmanabhan y cols., 1988; Hassing y cols., 1993; Wide y Naessen, 1994; Wide y cols., 1995). En estos estudios se demostró que la inyección pulsátil de GnRH no puede alterar el patrón de distribución por carga de la FSH intrahipofisiaria y secretada en animales con hipogonadismo inducido, mientras que el tratamiento con estradiol incrementa selectivamente las isoformas menos ácidas.

Por otro lado, mientras que en mujeres normales la abundancia relativa de isoformas de FSH menos ácidas se incrementa dramáticamente durante el período preovulatorio, etapa en la cual hay un incremento en las concentraciones del estradiol y mayor sensibilidad de la hipófisis a GnRH (Padmanabhan y cols., 1988; Wide y Bakos, 1993), los cambios observados en la distribución de isoformas séricas de la FSH no se alteró significativamente con la administración consecutiva de dosis bajas y altas de GnRH durante cada fase del ciclo (Ulloa-Aguirre y cols., 1995). A pesar de que los resultados de estos estudios no permiten excluir sitios adicionales intrahipofisarios de control mediados por interacciones autócrinas o parácrinas (cuya naturaleza y papel en la regulación postraduccional de formas moleculares de la FSH son desconocidos), la mayoría de los datos indican que los estrógenos tienen un papel determinante en la definición del grado de sialización y la síntesis de tipos específicos de isoformas de la FSH.

Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con estudios *in vitro* (Chotigeat y cols., 1994) e *in vivo* en demostrar que las diferentes isohormonas producidas por la glándula hipofisiaria están relacionados con el procesamiento postraduccional de la señal trófica, como en el caso de la LH (Smith y cols., 1990; Baenziger y cols., 1992; Dharmesh y Baenziger, 1993; Manzella y cols., 1995), la TSH (Monaco y cols., 1975; Grollman y cols., 1993; Helton y Magner, 1994a; Helton y Magner, 1995; Persani y cols., 1998), la prolactina (Hoffmann y cols., 1993; Manzella y cols., 1997) y la misma FSH (Galway y cols., 1990a; Galway y cols., 1990b).

Además, otros investigadores ha demostrado que las actividades de otras glicosiltransferasas (como la ST6N, la N-acetil galactosamina transferasa y la alfa-manosidasa II) (Helton y Magner, 1994b), las sialidasas (Cohen-Forterre y cols., 1990; Cohen-Forterre y cols., 1992) y otras sialiltransferasas pueden estar reguladas por diferentes factores hormonales (Coughlan y cols., 1996; Coughlan y Breen, 1998; Maguire y cols., 1998) en gran variedad de tejidos reproductivos (Nelson y cols., 1975; Nelson y cols., 1977; van Aswegen y cols., 1990) y no reproductivos (Toporowicz y Reisner, 1986; Kolinska y cols., 1988; Paulson y Colley, 1989; Livingston y cols., 1990; Nemansky y cols., 1992; Svensson y cols., 1992; Gillespie y cols., 1993; Hamr y cols., 1997; Maguire y cols., 1997).

La expresión a gran escala de las sialiltransferasas de origen recombinante (Williams y cols., 1995), así como la identificación de las regiones de control en el promotor y en los elementos de respuesta a diferentes hormonas presentes en las sialiltransferasas, permitirán conocer plenamente el papel de los factores hipotalámicos u ováricos en la regulación de su expresión. A su vez, el conocimiento de los mecanismos de regulación de la adición de ácido siálico a las hormonas glicoprotéicas por estímulos específicos podría ser utilizado para generar glicohormonas con un contenido conocido de carbohidratos, que permitan contralar con mayor precisión la duración e intensidad de la señal trófica sobre sus órganos blanco.

Como siguiente meta se analizará la expresión del ARNm-ST3N en hipófisis de ratas en diversas condiciones fisiológicas y experimentales mediante la técnica de hibridación *in situ*, lo que permitirá confirmar con precisión el sitio de síntesis de este ARNm, combinando la identificación de éste con la técnica de inmunohistoquímica contra la subunidad β -FSH. Así mismo, se pretende analizar el efecto de cada uno de los posibles estímulos hormonales que pueden modifican postraduccionalmente la expresión del ARNm-ST3N en cultivos primarios de hipófisis. Se intentará clonar la región del promotor de la ST3N de rata en un vector que contenga el gen reportero de la luciferasa (pGL3 basic reporter vector) y transfectarlo a la línea celular GGH3, que a su vez concontenga un vector que exprese al receptor de GnRH de rata, e incubarlas con las hormonas esteroides, los factores hormonales y antihormonales empleados en el cultivo primario, con la finalidad de analizar el grado de activación o inactivación del promotor de la ST3N ante la incubación con los factores hormonales que pudieran regular su síntesis.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Amoresano A, Siciliano R, Orru S, Napoleoni R, Altarocca V, De Luca E, Sirna A y Pucci P. (1996). Structural characterisation of human recombinant glyco hormones follitropin, lutropin and choriongonadotropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem.* 242 (3): 608-618.
- 2) Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V y Robertson WR. (1998). Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod.* 4 (7): 631-639.
- 3) Baenziger JU. (1994). Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it! *FASEB J.* 8 (13): 1019-1025.
- 4) Baenziger JU y Green ED. (1988). Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta.* 947 (2): 287-306.
- 5) Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL y Beranek MC. (1992). Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1): 334-338.
- 6) Becker WM, Reece JB y Poenie MF. (1996). *The World of the Cell.* Benjamin/Cummings, Publishers. Menlo Park, CA, USA. 3rd Ed.
- 7) Berger EG, Grimm K, Bachi T, Bosshart H, Kleene R y Watzele M. (1993). Double immunofluorescent staining of α 2,6 sialyltransferase and β 1,4 galactosyltransferase in monensin-treated cells: evidence for different Golgi compartments? *J Cell Biochem.* 52 (3): 275-288.
- 8) Bishop LA, Robertson DM, Cahir N y Schofield PR. (1994). Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol Endocrinol.* 8 (6): 722-731.
- 9) Boothby M, Ruddon RW, Anderson C, McWilliams D y Boime I. (1981). A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem.* 256 (10): 5121-5127.
- 10) Bousfield GR, Perry WM y Ward DN. (1994). Gonadotropins. Chemistry and biosynthesis. En: *The Physiology of Reproduction.* (Knobil E & Neil J D, Eds.). Raven Press, Ltd. New York, USA. 2nd Ed. Vol. 1. pp. 1749-1792.

- 11) Burnside J, Buckland PR y Chin WW. (1988). Isolation and characterization of the gene encoding the α -subunit of the rat pituitary glycoprotein hormones. *Gene*. 70 (1): 67-74.
- 12) Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CK, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC y Schofield PR. (1993). Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology*. 132 (1): 351-356.
- 13) Chappel SC. (1995). Heterogeneity of follicle stimulating hormone: control and physiological function. *Hum Reprod Update*. 1 (5): 479-487.
- 14) Chappel SC, Bethea CL y Spies HG. (1984). Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology*. 115 (2): 452-461.
- 15) Chappel SC, Coutifaris C y Jacobs SJ. (1982). Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology*. 110 (3): 847-854.
- 16) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A y Coutifaris C. (1983a). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev*. 4 (2): 179-211.
- 17) Chappel SC, Ulloa-Aguirre A y Ramaley JA. (1983b). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*. 28 (1): 196-205.
- 18) Childs GV, Unabia G, Wierman ME, Gharib SD y Chin WW. (1990). Castration induces time-dependent changes in the follicle-stimulating hormone β -subunit messenger ribonucleic acid-containing gonadotrope cell population. *Endocrinology*. 126 (4): 2205-2213.
- 19) Chin WW, Kronenberg HM, Dee PC, Maloof F y Habener JF. (1981). Nucleotide sequence of the mRNA encoding the pre- α -subunit of mouse thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78 (9): 5329-5333.
- 20) Chin WW, Maizel JV, Jr. y Habener JF. (1983). Difference in sizes of human compared to murine α -subunits of the glycoprotein hormones arises by four-codon gene deletion or insertion. *Endocrinology*. 112 (2): 482-485.
- 21) Chomczynski P y Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162 (1): 156-159.

- 22) Chotigeat W, Watanapokasin Y, Mahler S y Gray PP. (1994). Role of environmental conditions on the expression levels, glycoform pattern and levels of sialyltransferase for hFSH produced by recombinant CHO cells. *Cytotechnology*. 15 (1-3): 217-221.
- 23) Cohen-Forterre L, Andre J, Mozere G, Peyroux J y Sternberg M. (1990). Kidney sialidase and sialyltransferase activities in spontaneously and experimentally diabetic rats. Influence of insulin and sorbinil treatments. *Biochem Pharmacol*. 40 (3): 507-513.
- 24) Cohen-Forterre L, Andre J y Sternberg M. (1992). Sex and age dependence of rat kidney sialidase. *Enzyme*. 46 (6): 309-314.
- 25) Colley KJ, Lee EU, Adler B, Browne JK y Paulson JC. (1989). Conversion of a Golgi apparatus sialyltransferase to a secretory protein by replacement of the NH₂-terminal signal anchor with a signal peptide. *J Biol Chem*. 264 (30): 17619-17622.
- 26) Colley KJ, Lee EU y Paulson JC. (1992). The signal anchor and stem regions of the β -galactoside α 2,6- sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 267 (11): 7784-7793.
- 27) Cooke DJ, Crowe MA y Roche JF. (1997). Circulating FSH isoform patterns during recurrent increases in FSH throughout the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 110 (2): 339-345.
- 28) Coughlan CM y Breen KC. (1998). Glucocorticoid induction of the α 2,6 sialyltransferase enzyme in a mouse neural cell line. *J Neurosci Res*. 51 (5): 619-626.
- 29) Coughlan CM, Secki JR, Fox DJ, Unsworth R y Breen KC. (1996). Tissue-specific regulation of sialyltransferase activities in the rat by corticosteroids in vivo. *Glycobiology*. 6 (1): 15-22.
- 30) Daane TA y Parlow AF. (1971). Periovarian patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrous cycle as revealed by radioimmunoassays: effects of pentobarbital. *Endocrinology*. 88 (3): 653-663.
- 31) Dandjal RY y Colley KJ. (1993). Specific sequences in the signal anchor of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase are not essential for Golgi localization. Membrane flanking sequences may specify Golgi retention. *J Biol Chem*. 268 (35): 26310-26319.

- 32) Dahi KD y Stone MP. (1992). FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl.* 13 (1): 11-22.
- 33) Danielson PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ y Sutcliffe JG. (1988). p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA.* 7 (4): 261-267.
- 34) Datta AK y Paulson JC. (1995). The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J Biol Chem.* 270 (4): 1497-1500.
- 35) Datta AK, Sinha A y Paulson JC. (1998). Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J Biol Chem.* 273 (16): 9608-9614.
- 36) Dharmesh SM y Baenziger JU. (1993). Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (23): 11127-11131.
- 37) Fiddes JC y Goodman HM. (1979). Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the α -subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature.* 281 (5730): 351-356.
- 38) Flack MR, Bennet AP, Froehlich J, Anasti JN y Nisula BC. (1994a). Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 79 (3): 756-760.
- 39) Flack MR, Froehlich J, Bennet AP, Anasti J y Nisula BC. (1994b). Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem.* 269 (19): 14015-14020.
- 40) Franc JL, Hovsepian S, Fayet G y Bouchilloux S. (1984). Differential effects of thyrotropin on various glycosyltransferases in porcine thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 118 (3): 910-915.
- 41) Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction.* (Knobil E & Neil J D, Eds.). Raven Press, Ltd. New York, USA. 2nd Ed. Vol. 2. pp. 613-658.
- 42) Galle PC, Ulloa-Aguirre A y 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 (1): 31-39.

- 43) Galway AB, Hsueh AJ, Keene JL, Yamoto M, Fauser BC y Boime I. (1990a). *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology*. **127** (1): 93-100.
- 44) Galway AB, Lapolt PS, Tsafriri A, Dargan CM, Boime I y Hsueh AJ. (1990b). Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. *Endocrinology*. **127** (6): 3023-3028.
- 45) Ganong WF. (1987). Review of medical physiology. Appleton & Lange. Norwalk, Conn. 13th Ed.
- 46) Gharib SD, Roy A, Wierman ME y Chin WW. (1989). Isolation and characterization of the gene encoding the β -subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA*. **8** (5): 339-349.
- 47) Gharib SD, Wierman ME, Badger TM y Chin WW. (1987). Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in the rat. *J Clin Invest*. **80** (2): 294-299.
- 48) Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA y Chin WW. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*. **11** (1): 177-199.
- 49) Gillespie W, Kelm S y Paulson JC. (1992). Cloning and expression of the Gal β -1,3 GalNAc α 2,3- sialyltransferase. *J Biol Chem*. **267** (29): 21004-21010.
- 50) Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M y Baum LG. (1993). Regulation of α 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin PNA(+) to PNA(-) phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem*. **268** (6): 3801-3804.
- 51) Glenn TC y Glenn SJ. (1994). Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs). *Trends Genet*. **10** (10): 344.
- 52) Godine JE, Chin WW y Habener JF. (1982). α -subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J Biol Chem*. **257** (14): 8368-8371.
- 53) Goodwin RG, Moneman CL, Rottman FM y Nilson JH. (1983). Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common α -subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones. *Nucleic Acids Res*. **11** (19): 6873-6882.

- 54) Green ED y Baenziger JU. (1988a). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. I. Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 263 (1): 25-35.
- 55) Green ED y Baenziger JU. (1988b). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 263 (1): 36-44.
- 56) Grollman EF, Saji M, Shimura Y, Lau JT y Ashwell G. (1993). Thyrotropin regulation of sialic acid expression in rat thyroid cells. *J Biol Chem.* 268 (5): 3604-3609.
- 57) Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC. (1994). Regulation of gonadotropin gene expression. En: *The Physiology of Reproduction.* (Knobil E & Neil J D. Eds.). Raven Press, Ltd. New York, USA. 2nd Ed. Vol. Capítulo 31, Vol. 2. pp. 1793-1813.
- 58) Hamr A, Delannoy P, Verbert A y Kolinska J. (1997). The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of beta-galactoside α 2,6-sialyltransferase in the small intestine of suckling rats is suppressed by mifepristone (RU-38.486). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 60 (1-2): 59-66.
- 59) Harsch IA, Simoni M y Nieschiag E. (1993). Molecular heterogeneity of serum follicle-stimulating hormone in hypogonadal patients before and during androgen replacement therapy and in normal men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 39 (2): 173-180.
- 60) Hassing JM, Kletter GB, I'Anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL y Padmanabhan V. (1993). Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH) isoform distribution pattern of pituitary or circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology.* 132 (4): 1527-1536.
- 61) Helton TE y Magner JA. (1994a). Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: an *In situ* hybridization study. *Endocrinology.* 134 (6): 2347-2353.
- 62) Helton TE y Magner JA. (1994b). β -1,4-galactosyltransferase and α -mannosidase-II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Endocrinology.* 135 (5): 1980-1985.

- 63) Helton TE y Magner JA. (1995). β -Galactoside α -2,3-sialyltransferase messenger RNA increases in thyrotrophs of hypothyroid mice. *Thyroid*. 5 (4): 315-317.
- 64) Hirschberg CB y Snider MD. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*. 56 63-87.
- 65) Hoffmann T, Penel C y Ronin C. (1993). Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *J Endocrinol Invest*. 16 (10): 807-816.
- 66) Jackson RC y Blobel G. (1980). Post-translational processing of full-length presecretory proteins with canine pancreatic signal peptidase. *Ann N Y Acad Sci*. 343 391-404.
- 67) Kitagawa H, Mattei MG y Paulson JC. (1996). Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal B1,3 Gal NAc/Gal B1,4 Glc NAc α 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem*. 271 (2): 931-938.
- 68) Kitagawa H y Paulson JC. (1993). Cloning and expression of human Gal B1,3 (4) GlcNAc α 2,3- sialyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 194 (1): 375-382.
- 69) Kitagawa H y Paulson JC. (1994a). Cloning of a novel α 2,3-sialyltransferase that sialylates glycoprotein and glycolipid carbohydrate groups. *J Biol Chem*. 269 (2): 1394-1401.
- 70) Kitagawa H y Paulson JC. (1994b). Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J Biol Chem*. 269 (27): 17872-17878.
- 71) Kleene R y Berger EG. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta*. 1154 (3-4): 283-325.
- 72) Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Roberson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Grotjan HE y Kinder JE. (1995). Effects of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol Reprod*. 52 (2): 297-304.
- 73) Kolinska J, Ivanov S y Chelibonova-Lorer H. (1988). Effect of hydrocortisone on sialyltransferase activity in the rat small intestine during maturation. Changes along the villus-crypt axis and in fetal organ culture. *FEBS Lett*. 242 (1): 57-60.

- 74) Kornfeld R y Kornfeld S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54 631-664.
- 75) Lambert A, Talbot JA, Anobile CJ y Robertson WR. (1998). Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Mol Hum Reprod.* 4 (7): 619-629.
- 76) Leipheimer RE, Bona-Gallo A y Gallo RV. (1984). The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy on diestrus day 1 in the rat. *Endocrinology.* 114 (5): 1605-1612.
- 77) Livingston BD, De Robertis EM y Paulson JC. (1990). Expression of β -galactoside α -2,6 sialyltransferase blocks synthesis of polysialic acid in *Xenopus* embryos. *Glycobiology.* 1 (1): 39-44.
- 78) Livingston BD y Paulson JC. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem.* 268 (16): 11504-11507.
- 79) Luderer U, Strobl FJ, Levine JE y Schwartz NB. (1993). Differential gonadotropin responses to N-methyl-D,L-aspartate in metestrous, proestrous, and ovariectomized rats. *Biol Reprod.* 48 (4): 857-866.
- 80) Magner J, Klibanski A, Fein H, Smallridge R, Blackard W, Young W, Jr., Ferriss JB, Murphy D, Kane J y Rubin D. (1992). Ricin and lentil lectin-affinity chromatography reveals oligosaccharide heterogeneity of thyrotropin secreted by 12 human pituitary tumors. *Metabolism.* 41 (9): 1009-1015.
- 81) Maguire TM, Coughlan CM, Seckl JR y Breen KC. (1998). The effect of corticosteroids on serum sialyltransferase enzyme activities in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 1379 (1): 23-28.
- 82) Maguire TM, Thakore J, Dinan TG, Hopwood S y Breen KC. (1997). Plasma sialyltransferase levels in psychiatric disorders as a possible indicator of HPA axis function. *Biol Psychiatry.* 41 (11): 1131-1136.
- 83) Manzella SM, Dharmesh SM, Beranek MC, Swanson P y Baenziger JU. (1995). Evolutionary conservation of the sulfated oligosaccharides on vertebrate glycoprotein hormones that control circulatory half-life. *J Biol Chem.* 270 (37): 21665-21671.

- 84) Manzella SM, Dharmesh SM, Cohick CB, Soares MJ y Baenziger JU. (1997). Developmental regulation of a pregnancy-specific oligosaccharide structure. NeuAc α -2,6 Gal NAc β -1,4 Glc NAc. on select members of the rat placental prolactin family. *J Biol Chem.* 272 (8): 4775-4782.
- 85) Maurer RA. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary deoxyribonucleic acid for the beta-subunit of rat follicle stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* 1 (10): 717-723.
- 86) Maurer RA y Beck A. (1986). Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the beta-subunit of bovine follicle-stimulating hormone. *DNA.* 5 (5): 363-369.
- 87) Monaco F, Salvatore G y Robbins J. (1975). The site of sialic acid incorporation into thyroglobulin in the thyroid gland. *J Biol Chem.* 250 (4): 1595-1599.
- 88) Nelson JD, Jato-Rodriguez JJ, Labrie F y Mookerjee S. (1977). Glycosyltransferase and UDP-galactose pyrophosphatase activities in the endometrium during oestrous cycle of the rat. *J Endocrinol.* 73 (1): 53-58.
- 89) Nelson JD, Jato-Rodriguez JJ y Mookerjee S. (1975). Effect of ovarian hormones on glycosyltransferase activities in the endometrium of ovariectomized rats. *Arch Biochem Biophys.* 169 (1): 181-191.
- 90) Nemansky M, Edzes HT, Wijnands RA y Van den Eijnden DE. (1992). The polypeptide part of human chorionic gonadotrophin affects the kinetics of alpha 6-sialylation of its N-linked glycans but does not alter the branch specificity of CMP-NeuAc:Gal β -1,4 Glc NAc-R α -2,6-sialyltransferase. *Glycobiology.* 2 (2): 109-117.
- 91) Nilson JH, Thomason AR, Cserbak MT, Moncman CL y Woychik RP. (1983). Nucleotide sequence of a cDNA for the common α -subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones. Conservation of nucleotides in the 3'-untranslated region of bovine and human pre- α -subunit mRNAs. *J Biol Chem.* 258 (8): 4679-4682.
- 92) Ortolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Hiff-Sizemore SA, Landefeld TD, Maurer RA y Marshall JC. (1988). Follicle-stimulating hormone β -subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Endocrinology.* 123 (6): 2946-2948.

- 93) Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Kelch RP y 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 (3): 465-473.
- 94) Padmanabhan V, Lee JS y Beitins IZ. (1999). Follicle-stimulating isohormones: regulation and biological significance. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 87-99.
- 95) Padmanabhan V, McFadden K, Mauger DT, Karsch FJ y Midgley AR, Jr. (1997). Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion. I. Direct evidence for separate episodic and basal components of FSH secretion. *Endocrinology.* 138 (1): 424-432.
- 96) Padmanabhan V, Sairam MR, Hassing JM, Brown MB, Ridings JW y Beitins IZ. (1991). Follicle-stimulating hormone signal transduction: role of carbohydrate in aromatase induction in immature rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 79 (1-3): 119-128.
- 97) Paulson JC y Colley KJ. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type- specific glycosylation. *J Biol Chem.* 264 (30): 17615-17618.
- 98) Persani L, Borgato S, Romoli R, Asteria C, Pizzocaro A y Beck-Peccoz P. (1998). Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab.* 83 (7): 2486-2492.
- 99) Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K y Wide L. (1997). Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (9): 3103-3106.
- 100) Phillips DJ, Hudson NL, Gentle LR y McNatty KP. (1994). Bioactive follicle-stimulating hormone concentrations in plasma during the estrous cycle of the ewe. *Biol Reprod.* 51 (6): 1292-1298.
- 101) Phillips DJ, McNatty KP, Smith P, Pettersson K y Wide L. (1996). Median charge of gonadotrophin isoforms in the pituitary gland and in the circulation of sheep fetuses from mid- to late gestation. *J Endocrinol.* 149 (1): 29-39.
- 102) Phillips DJ y Wide L. (1994). Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 79 (3): 814-819.
- 103) Pierce JG y Parsons TF. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50 465-495.

- 104) Rafferty B, Mower JA, Ward HL y Rose M. (1995). Differences in carbohydrate composition of FSH preparations detected with lectin-ELISA systems. *J Endocrinol.* 145 (3): 527-533.
- 105) Rathman P y Saxena BB. (1984). Structure-function relationships of gonadotropins. En: *Hormone Receptors in Growth and Reproduction.* (Saxena B B, Eds.). Raven Press, Ltd. New York, USA. Ed. Vol. pp. 21-35.
- 106) Reichert LE, Jr. (1971a). Biological evidence for the subunit structure of human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 89 (3): 925-928.
- 107) Reichert LE, Jr. (1971b). Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. *Endocrinology.* 88 (4): 1029-1044.
- 108) Ronin C. (1992). Glycosylation of pituitary hormones: a necessary and multistep control of biopotency. *Glycoconj J.* 9 (6): 279-283.
- 109) Rulli SB, Creus S, Pellizzari E, Cigorraga SB, Calandra RS y Campo S. (1996). Immunological and biological activities of pituitary FSH isoforms in prepubertal male rats: effect of antiandrogens. *Neuroendocrinology.* 63 (6): 514-521.
- 110) Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO y Vutyavanich T. (1987). Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res.* 43 383-429.
- 111) Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74 (12): 5463-5467.
- 112) Shome B, Parlow AF, Liu WK, Nahm HS, Wen T y Ward DN. (1988). A reevaluation of the amino acid sequence of human follitropin beta-subunit. *J Protein Chem.* 7 (4): 325-339.
- 113) Simoni M, Jockenhovel F y Nieschlag E. (1994). Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species. *J Endocrinol.* 141 (2): 359-367.
- 114) Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK y Nieschlag E. (1992). Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic androgen deprivation induced by castration or androgen blockade. *J Mol Endocrinol.* 9 (2): 175-182.
- 115) Smith PL, Kaetzel D, Nilson J y Baenziger JU. (1990). The sialylated oligosaccharides of recombinant bovine lutropin modulate hormone bioactivity. *J Biol Chem.* 265 (2): 874-881.

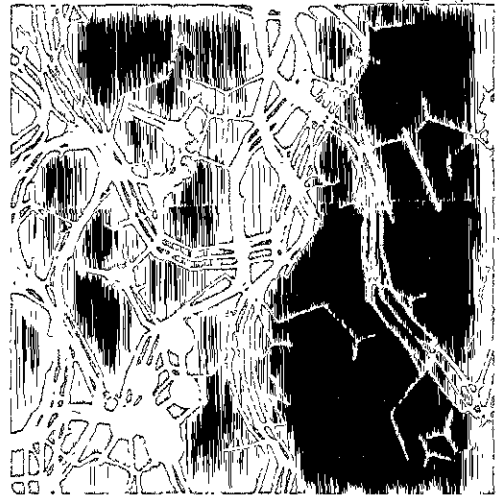
- 116) Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT y Robertson DM. (1996). Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol.* 125 (1-2): 133-141.
- 117) Stockell Hartree A y Renwick AG. (1992). Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J.* 287 (3): 665-679.
- 118) Storring PL. (1992). Assaying glycoprotein hormones: the influence of glycosylation on immunoreactivity. *Trends Biotechnol.* 10 (12): 427-432.
- 119) Sugino H, Takio K y Ward DN. (1989). Reevaluation of the amino acid sequence of porcine follitropin. *J Protein Chem.* 8 (2): 197-219.
- 120) Suttajit M, Reichert LE, Jr. y 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 (10): 3405-3408.
- 121) Svensson EC, Conley PB y Paulson JC. (1992). Regulated expression of α -2,6-sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP, and LAP. *J Biol Chem.* 267 (5): 3466-3472.
- 122) Svensson EC, Soreghan B y Paulson JC. (1990). Organization of the β -galactoside α 2,6-sialyltransferase gene. Evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation. *J Biol Chem.* 265 (34): 20863-20868.
- 123) Taatjes DJ, Roth J, Weinstein J, Paulson JC, Shaper NL y Shaper JH. (1987). Codistribution of galactosyl- and sialyltransferase: reorganization of trans Golgi apparatus elements in hepatocytes in intact liver and cell culture. *Eur J Cell Biol.* 44 (2): 187-194.
- 124) Tapper CM, Naftolin F y Brown-Grant K. (1972). Influence of the reproductive state at the time of operation on the early response to ovariectomy in the rat. *J Endocrinol.* 53 (1): 47-57.
- 125) Totokura NR y Blithe DL. (1995). Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotrophins, thyrotrophin and free alpha subunit. *Glycobiology.* 5 (1): 3-10.
- 126) Totokura NR, Szkudlinski MW y Weintraub BD. (1994). Structure-function studies of oligosaccharides of recombinant human thyrotrophin by sequential deglycosylation and resialylation. *Glycobiology.* 4 (4): 525-533.
- 127) Toporowicz A y Reisner Y. (1986). Changes in sialyltransferase activity during murine T cell differentiation. *Cell Immunol.* 100 (1): 10-19.

- 128) Tsuji S, Datta AK y Paulson JC. (1996). Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology*. 6 (7): v-vii.
- 129) Uehara F, Ohba N, Nakashima Y, Yanagita T, Ozawa M y Muramatsu T. (1993). Developmental change of distribution of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase mRNA in rat retina. *Exp Eye Res*. 56 (1): 89-93.
- 130) Ulloa-Aguirre A y Chappel SC. (1982). Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J Endocrinol*. 95 (2): 257-266.
- 131) Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C y Chappel SC. (1983). Multiple species of FSH are present within hamster anterior pituitary cells cultured *in vitro*. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 102 (3): 343-350.
- 132) Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E y Diaz-Sanchez V. (1992a). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod*. 7 (1): 23-30.
- 133) Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza R, Dominguez R, Morales L y Flores A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. *J Endocrinol*. 126 (2): 323-332.
- 134) Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E y Diaz-Sanchez V. (1992b). Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in a purified commercial preparation. *Hum Reprod*. 7 (10): 1371-1378.
- 135) Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P y Chappel SC. (1988a). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Hum Reprod*. 3 (4): 491-501.
- 136) Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damian-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L y Dominguez R. (1988b). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*. 38 (1): 70-78.
- 137) Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Jr., Beitins IZ y Padmanabhan V. (1995). Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*. 16 (6): 765-787.

- 138) Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L y Chappel S. (1984). Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biol Reprod.* 30 (2): 382-387.
- 139) Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E y Damian-Matzumura P. (1992c). Effects of gonadotrophin-releasing hormone, recombinant human activin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isohormones secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *J Endocrinol.* 134 (1): 97-106.
- 140) Valove FM, Finch C, Anasti JN, Froehlich J y Flack MR. (1994). Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 135 (6): 2657-2661.
- 141) van Aswegen CH, van Rensburg HG, Becker PJ, Wittliff JL y du Plessis DJ. (1990). Influence of sialic acid on the binding activity of estrogen receptors. *Clin Physiol Biochem.* 8 (4): 169-178.
- 142) Ward DN, Bousfield GR y Moore KH. (1991). Gonadotropins. En: *Reproduction in Domestic Animals*. Eds.). Academic Press, Inc. London. Ed. Vol. Capítulo 2. pp. 25-79.
- 143) Wakeling AE, Dukes M y Bowler J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research* 51:3867-3873.
- 144) Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai PH y Paulson JC. (1987). Primary structure of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH_2 -terminal signal anchor. *J Biol Chem.* 262 (36): 17735-17743.
- 145) Wen DX, Livingston BD, Medzihradszky KF, Kelm S, Burlingame AL y Paulson JC. (1992a). Primary structure of Gal β 1,3 (4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. Evidence for a protein motif in the sialyltransferase gene family. *J Biol Chem.* 267 (29): 21011-21019.
- 146) Wen DX, Svensson EC y Paulson JC. (1992b). Tissue-specific alternative splicing of the β -galactoside α 2,6- sialyltransferase gene. *J Biol Chem.* 267 (4): 2512-2518.
- 147) Wide L. (1982). Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 55 (4): 682-688.

- 148) Wide L. (1989). Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *J Endocrinol.* 123 (3): 519-529.
- 149) Wide L y Bakos O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 76 (4): 885-889.
- 150) Wide L y Naessen T. (1994). 17 β -oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol.* 40 (6): 783-789.
- 151) Wide L, Naessen T y Phillips DJ. (1995). Effect of chronic daily oral administration of 17 β -oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post- menopausal women. *Clin Endocrinol.* 42 (1): 59-64.
- 152) Williams MA, Kitagawa H, Datta AK, Paulson JC y Jamieson JC. (1995). Large-scale expression of recombinant sialyltransferases and comparison of their kinetic properties with native enzymes. *Glycoconj J.* 12 (6): 755-761.
- 153) Wilson CA, Leigh AJ y Chapman AJ. (1990). Gonadotrophin glycosylation and function. *J Endocrinol.* 125 (1): 3-14.
- 154) Zerfaoui M y Ronin C. (1996). Glycosylation is the structural basis for changes in polymorphism and immunoreactivity of pituitary glycoprotein hormones. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 34 (9): 749-753.

Journal of Molecular Endocrinology



Journal of Molecular Endocrinology

Expanding
worldwide
readership

An international journal at the forefront of endocrinology, reporting cutting-edge research into molecular and cellular aspects of the subject.

- No page or reviewing charges
- Receiving offices in United States and UK
- High impact factor
- Wide international circulation
- Rapid publication

Endocrinology on the Web:
<http://www.endocrinology.org>
with free access to advance abstracts
of articles accepted for publication.
Full text available at
subscribing institutions!

How to submit your paper

The Journal publishes **Research Papers, Reviews and Commentaries**.

In addition, **Rapid Communications** report novel observations of immediate relevance. They must be supported by a separate statement giving reasons for rapid, rather than regular, publication. These articles are printed directly from the authors' typescripts (although initial submission may be in the usual format).

Send **four** copies of your manuscript to *Journal of Molecular Endocrinology*, 17/18 The Courtyard, Woodlands, Bradley Stoke, Bristol BS32 4NQ, UK, or **five** copies to Dr M H Melner, United States Receiving Office, *Journal of Molecular Endocrinology*, Department of Obstetrics and Gynecology, Vanderbilt University School of Medicine, C1100 Medical Center North, 21st Avenue South & Garland, Nashville, Tennessee 37232-2515, USA.

Subscribe to the Journal

Timely publication of the latest research – All papers rigorously peer reviewed – International coverage and editorial board – Contains review articles, commentaries, research papers and rapid communications

ISSN 0952-5041 (Bimonthly) Editor: Professor J I Mason

Order form

Please enter my subscription to *Journal of Molecular Endocrinology* at

- the personal price of £79/\$135
 the institutional price of £202 (Europe)/\$390 (N&S America)/£233 (Rest of World)

Send me a proforma invoice

Charge my Visa/Access/Mastercard (Number _____ Expiry date _____)

Name _____

Address _____

Signature _____ Date _____

If paying by credit card, please ensure you include the address where your credit card bills are sent, if different from above.

Please return this form to Society for Endocrinology, 17/18 The Courtyard, Woodlands, Bradley Stoke, Bristol BS32 4NQ, UK.

Tel: +44-1454-616046, Fax +44-1454-616071, E-mail, sales@endocrinology.org.



Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat

P Damián-Matsumura^{1,2}, V Zaga^{1,2}, A Maldonado²,
C Sánchez-Hernández², C Timossi^{1,3} and A Ulloa-Aguirre¹

¹Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico

²Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

³Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, Mexico

(Requests for offprints should be addressed to A Ulloa-Aguirre, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición SZ, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan 14000, México DF, Mexico) (P Damián-Matsumura, A Maldonado, C Timossi and A Ulloa-Aguirre are now at Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Gineco-obstetricia no. 4, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico DF, Mexico)

ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone (FSH) is synthesized by the anterior pituitary gland in multiple molecular forms. Increased acidic/sialylated FSH charge isoforms are associated with conditions characterized by a low oestrogen output. In the present study, we analysed the dynamics of the changes in mRNA levels of the enzyme Gal β 1,3[4]GlcNAc α 2,3-sialyltransferase (2,3-STase) (one of the enzymes that incorporate sialic acid residues into the FSH molecule) in intact and ovariectomized rats. The anterior pituitaries of 4-day regularly cyclic adult female Wistar rats were obtained at 1000 h on the days of pro-oestrus (P), oestrus (O), dioestrus 1 (D1) and dioestrus 2 (D2), at 0200 h, 1400 h, 1800 h and 2200 h on D1, at 1800 h on day of O and at 1000 h after 7, 14, 21, 28 and 45 days of oophorectomy performed on the morning of P. Total RNA was isolated from each gland and the 2,3-STase levels were measured by Northern blot hybridization analysis employing a 346-base pair cDNA probe encoding for a non-conserved amino acid sequence of the catalytic domain of the enzyme. Maximal levels of the enzyme mRNA were detected at 1000 h on D1, thereafter, they progressively decreased by 60% during the ensuing 24 h, reaching the lowest concentration values (26% of the maximally observed level on D1) at 1000 h on day of P and remaining unchanged during

the morning of O. Administration of the potent oestradiol receptor antagonist ICI 182,780 at 1000 h on D1 completely reverted the time-dependent decrease in 2,3-STase mRNA levels observed during the afternoon of D1, whereas oestradiol benzoate administered at 1000 h on day of O significantly reduced the enzyme mRNA levels (to 21% of the levels detected in vehicle-treated controls). In ovariectomized rats, the α 2,3-STase mRNA progressively increased from day 21 to day 45 post castration. Administration of oestradiol benzoate on day 28 after oophorectomy significantly reduced the 2,3-STase mRNA levels (to 36% of the levels detected in vehicle-injected controls); ICI 182,780 partially counteracted this oestradiol-mediated effect. The dynamics of these changes in 2,3-STase mRNA levels partially correlated with changes in the relative abundance of the FSH charge isoforms separated by preparative chromatofocusing of anterior pituitary extracts, particularly in glands obtained during the morning of P and O. These data demonstrate for the first time that pituitary 2,3-STase is a hormonally-regulated enzyme and that the changes in transcription and/or stability of its mRNA may be involved, in part, in the post-translational processing of the FSH molecule during certain physiological conditions. *Journal of Molecular Endocrinology* (1999) **23**, 153–165

INTRODUCTION

Follicle-stimulating hormone (FSH), one of the signals produced by the anterior pituitary (AP)

gland, is involved in the regulation of several essential reproductive processes occurring at the gonadal level. This gonadotrophin is a heterodimer composed of two glycosylated subunits, α and β

(Pierce & Parsons 1981, Gharib *et al.* 1990). Each subunit of FSH exhibits two N-linked glycosylation sites located at positions Asn52 or 56 and Asn78 or 82 in FSH α and Asn6, 7 or 13 and Asn23, 24 or 30 in FSH β (Fiddes & Goodman 1979, Pierce & Parsons 1981, Esch *et al.* 1986, Watkins *et al.* 1987, Gharib *et al.* 1989). Glycosylation and processing of incorporated oligosaccharides involve a complex biosynthetic pathway which, after initiation in the rough endoplasmic reticulum, continues through the Golgi apparatus until the mature gonadotrophin is transported to secretory granules (Baenziger & Green 1988). As in other related glycoprotein hormones (luteinizing hormone (LH), chorionic gonadotrophin and thyrotrophin (TSH)), oligosaccharide structures on FSH are highly variable and play a key role in determining the biological properties of the hormone (Wilson *et al.* 1990, Ulloa-Aguirre *et al.* 1995, Ulloa-Aguirre & Timossi 1998). In FSH, most oligosaccharide chains are dibranched structures with either both ends terminating in a negatively charged group (GalNAc-SO₄⁻ or Gal-sialic acid) or one branch terminating in a negatively charged residue and the other in noncharged mannose. Dibranched oligosaccharides, with and without a bisecting GlcNAc moiety linked to the β -linked core mannose residues, and tribranched oligosaccharides of different types, but containing terminal sialic acid residues are also found (Green & Baenziger 1988, Stockell Hartree & Renwich 1992). Variations in the structure and distribution of sialylated and, to a lesser extent, sulphated Asn-linked oligosaccharides constitute the main chemical basis for FSH isoform formation and the extensive charge heterogeneity exhibited by this particular gonadotrophin (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995).

Multiple FSH charge isoforms have been isolated from AP extracts, serum and urine of several animal species including man (Chappel *et al.* 1983, Ulloa-Aguirre *et al.* 1986, 1988, 1992a, 1995, Simoni *et al.* 1994, Stanton *et al.* 1996). The more acidic/sialylated variants exhibit longer plasma half-life but lower receptor binding activity and *in vitro* biological potency than the less acidic counterparts (Ulloa-Aguirre *et al.* 1984, 1992a, Cerpa-Poljak *et al.* 1993, Zambrano *et al.* 1996). The distribution of the intrapituitary and secreted FSH charge isoforms changes during specific physiological conditions (Padmanabhan *et al.* 1988, Wide 1989, Wide & Bakos 1993, Ulloa-Aguirre *et al.* 1995, Zambrano *et al.* 1995), thus indicating that FSH heterogeneity is a hormonally regulated phenomenon. In terms of endocrine regulation, there is growing evidence suggesting that hypothalamic and gonadal inputs (gonadotrophin-

releasing hormone (GnRH) and/or sex steroids) may be involved in modulating the molecular nature of the hormone and therefore its biological attributes (Ulloa-Aguirre *et al.* 1995). For example, it has been shown that the release of less sialylated, short-lived FSH glycoforms is increased in conditions in which the AP is exposed to high levels of oestrogens such as the periovulatory phase of the menstrual cycle or after long-term oestradiol administration to hypogonadal subjects (Galle *et al.* 1983, Padmanabhan *et al.* 1988, Wide & Bakos 1993, Wide & Naessén 1994, Zambrano *et al.* 1995). However, the molecular mechanisms responsible for the changes in sialylation of the FSH molecule during these and other physiological states remain unclear. Since the oestrous cycle represents an ordered sequence of changing hormonal events during which the pituitary gland is cyclically exposed to variable amounts of gonadal and hypothalamic hormones, we tested the hypothesis that the mRNA levels of rat Gal β 1,3GlcNAc α 2,3-sialyltransferase (2,3-STase) (the enzyme that forms the NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc sequence typically found to terminate complex type N-linked oligosaccharide chains such as those present in FSH (Weinstein *et al.* 1982, Baenziger & Green 1988, Kleen & Berger 1993)) changes during the oestrous cycle and that oestrogens play a key role in the regulation of this enzyme mRNA levels.

MATERIALS AND METHODS

Adult Wistar female rats were maintained in groups of 5 animals under light-controlled conditions (lights on from 0500 to 1900 h). The body weights of the rats were between 250 and 300 g. Daily vaginal smears were obtained between 0900 h and 1100 h, and no animal was used until it had shown at least three consecutive 4-day oestrous cycles. Rats were decapitated at 1000 h on the days of pro-oestrus (P), oestrus (O), dioestrus 1 (D1) and dioestrus 2 (D2), at 0200 h, 1400 h, 1800 h and 2200 h on D1, at 1800 h on the day of O and at 1000 h after 7, 14, 21, 28 and 45 days of oophorectomy performed on the morning of P. The anterior pituitaries were dissected free from the posterior pituitaries, rapidly removed and immediately frozen at -70 °C until extraction of total cytoplasmic RNA or soluble proteins.

RNA extraction and Northern blot hybridization analysis

Total RNA from rat brain and anterior pituitary glands was isolated by the single-step acid

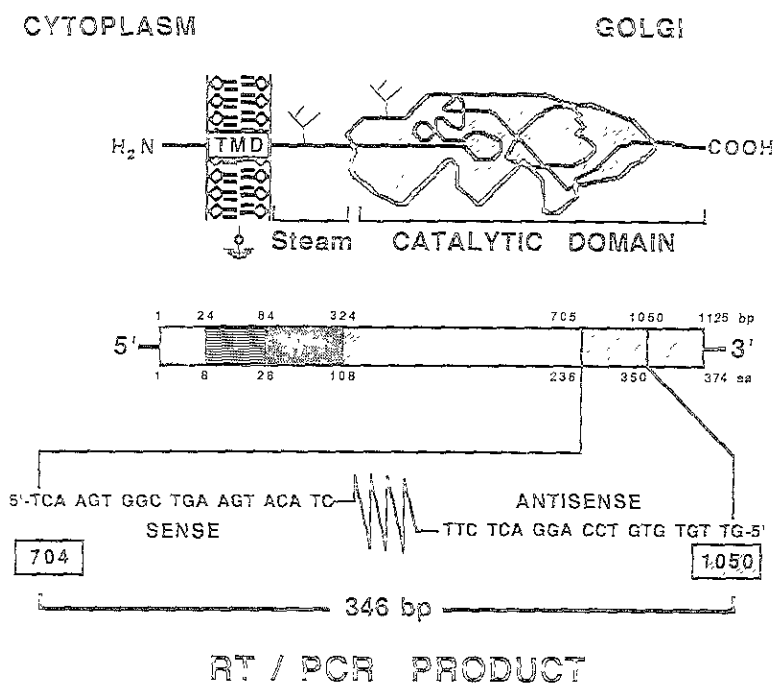


FIGURE 1 (Top panel) Model for the enzyme's domain structure and putative glycosylation sites (Middle panel) Representation of the enzyme according to the model shown on top. Straight lines indicate the untranslated parts of the mRNA/cDNA and the differently filled boxes represent the regions coding for the corresponding domains shown in the top figure, numbers indicate the length of the different regions (bp, base pairs, aa, amino acids) (Bottom panel) Sequence of the 2,3-STase cDNA synthesized and employed in the present study, filled boxes show the limits of the cDNA sequence.

guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform extraction method (Chomczynski & Sacchi 1987) using the TRIZol reagent (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and following the instructions supplied by the manufacturer. For Northern blot hybridization analysis, total RNA (~15 µg) was fractionated on 1.0% denaturing agarose gel and transferred to Zeta Probe GT membranes (BioRad, Hercules, CA, USA). After UV crosslinking and prehybridization, the membranes were hybridized during 16–24 h at 65 °C with the 2,3-STase cDNA probe radiolabelled with ^{32}P using a random primer labelling kit (Gibco). The filters were then washed at high stringency and autoradiographed on X-OMAT-AR film (Eastman Kodak). Each blot was stripped and rehybridized with a rat cyclophilin (Cyc) cDNA probe, prepared by random priming and used as a

control to compare the amounts of RNA loaded and transferred. Semiquantitative analysis of specific 2,3-STase mRNA was performed by densitometric scanning of the autoradiograms employing an Eagle Eye II video imaging system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Results are expressed as the 2,3-STase/Cyc mRNAs relative optical density (O.D.) ratios.

Synthesis and amplification of rat $\alpha 2,3$ -STase cDNA

Like other glycosyltransferases bearing type II membrane topology, the 2,3-STase has a short cytoplasmic domain, a hydrophobic signal-anchor sequence, a luminal stem region not required for catalytic activity and a large luminal catalytic domain (Kleen & Berger 1993) (Fig. 1). For the

purpose of this study, we synthesized a cDNA probe of 3+6 bp encoding for a non-conserved amino acid sequence (residues 236 to 350) of the catalytic domain of the enzyme located 10 amino acid residues far from the carboxyl-end of the so-called sialylmotif region (residues 178–225) (Wen *et al.* 1992, Datta & Paulson 1995). The oligonucleotide primers employed for the construction and amplification of cDNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were chosen based on the 2,3-STase cDNA sequence reported by Wen *et al.* (1992); sequences of the corresponding sense and antisense oligonucleotides are shown in Fig. 1. Reverse transcription of poly(A)+ RNA extracted from female rat brain (which expresses 2,3-STase mRNA at relatively high levels (Wen *et al.* 1992, Kitagawa & Paulson 1994)) was performed employing the GeneAmp RNA PCR reagent kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) following the instructions of the manufacturer. After completion of the reverse transcription, PCR was initiated by adding 80 μ l of a mix containing 2.5 units AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer), 15 mM of the sense and antisense oligonucleotides, 2 mM MgCl₂ and 8 μ l 10 \times PCR buffer II (Perkin Elmer). The temperature was raised to 95 °C for 105 s and the amplification was carried out by cycling 35 times, 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 1 min at 72 °C, and ended with a final extension step of 7 min at 72 °C. The 346 bp cDNA fragment was isolated by agarose gel electrophoresis followed by purification in polyester plug spin inserts (Glenn & Glenn 1994) and ethanol precipitation, and then subcloned into the pCR-Script SK (+) cloning vector (Stratagene). The sequence of the cDNA fragment was confirmed by dideoxynucleotide sequencing (Sanger *et al.* 1977). Northern blots of total RNA from different tissues probed with the 2,3-STase cDNA₇₀₄₋₁₀₅₀ showed probe hybridization to a mRNA of ~2.5 kb only in those tissues previously reported to express this particular enzyme (Wen *et al.* 1992). The relative amounts of $\alpha 2,3$ -STase mRNA detected in pituitary glands from castrated or D1 rats employing this particular cDNA probe represented ~39% of those present in other rat tissues that express this particular mRNA at high levels (i.e. lung, heart, brain, kidney).

Chromatofocusing of anterior pituitary extracts

AP glands were individually homogenized at 4 °C with ten strokes of a Teflon pestle in 100 μ l chromatofocusing eluent buffer (1:8 dilution of Polybuffer 74 (Pharmacia Fine Chemicals,

Piscataway, NJ, USA) in deionized water, pH 4.0) containing the protease inhibitor phenylmethylsulphonylfluoride (0.2 mg/ml; Sigma, St Louis, MO, USA). The AP homogenate was centrifuged at 1000 g for 30 min at 4 °C, and the supernatant fraction (AP extract) removed and stored frozen at -20 °C. Groups of four AP extracts were separately chromatofocused in 30 \times 1 cm columns of PBE-94 (Pharmacia) following a chromatofocusing procedure previously described (Ulloa-Aguirre *et al.* 1992a). After measuring the pH of the eluent fractions (110 to 130 2-ml fractions/column), they were stored frozen at -20 °C until the day of radioimmunoassay (RIA) of FSH. A total of three or four AP extracts per animal group were pooled and chromatofocused separately in triplicate columns. Recoveries of FSH by this method were 76 \pm 4% of the total amount originally applied to the column.

RIA of FSH and oestradiol

Purified rat FSH-I-7 (NIADDK, Bethesda, MD, USA) was iodinated by the Chloramine T method. The RIA of FSH was performed using the rat RIA kit provided by the NIADDK as previously reported (Ulloa-Aguirre *et al.* 1988); the reference preparation employed was rat FSH-RP-2 (NIADDK). 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 0.1 ng/ml. The RIA of 17 β -oestradiol was performed employing a solid phase commercial reagent kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). All samples were analysed in a single RIA run; the intra-assay variability was 3% and the sensitivity was 4 pg/ml.

Statistical analysis

One-way analysis of variance and the unpaired *t*-test were used to analyse differences between groups.

RESULTS

Adult cyclic rats were killed at the times shown in Fig. 2 and total pituitary RNA was analysed for the presence of 2,3-STase mRNA. As shown in the figure, the mRNA of the enzyme changed according to the day and time of the oestrous cycle. The highest levels were recorded on the morning of D1, whereas the lowest were on the morning of the days of P and O. A progressive increase in the

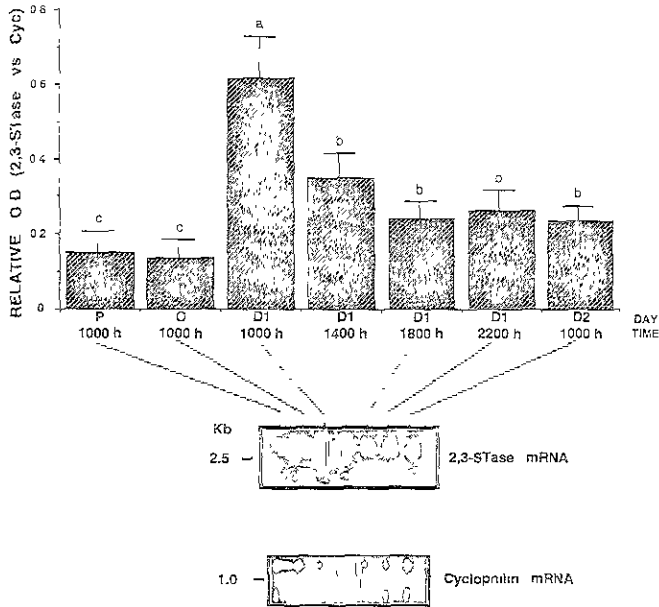


FIGURE 2. Representative experiment showing the changes in anterior pituitary 2,3-STase mRNA levels throughout the rat oestrous cycle (means \pm s.d. of 3 to 5 animals per group). Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group. Also shown are representative Northern blots of total RNA from anterior pituitary glands probed with radiolabelled 2,3-STase and cyclophilin cDNA probes. Similar results were found in three additional experiments.

enzyme mRNA levels was observed at 1800 h on the day of O and at 0200 h on D1 (not shown). With castration on the morning of the day of P, the AP $\alpha 2,3$ -STase mRNA levels remained at the values found on day of P until day 21 post castration, when the enzyme mRNA levels showed a progressive increase reaching maximal values after day 28 post-oophorectomy (Fig. 3).

Based on the results of the time course study, the effects of oestradiol administration on the pituitary $\alpha 2,3$ -STase mRNA levels were then tested. For this purpose, animals were subcutaneously injected with either vehicle (corn oil) or 10 μ g oestradiol benzoate (OB) on the morning of the day of O and total AP RNA was thereafter obtained at 1000 h on the presumptive D1. In a separate experiment, D1 animals received at 1000 h 2 mg/kg body weight (b.w.) of the potent oestrogen receptor antagonist ICI 182,780 (Wakeling *et al.* 1991) and its effects on 2,3-STase mRNA levels were then examined eight and twenty-four hours after its administration. As

shown in Fig. 4, administration of OB resulted in a significant decrease in the 2,3-STase mRNA to levels similar to those detected during the morning of O. In contrast, administration of a single dose of ICI 182,780 at 1000 h on D1 completely reversed the naturally occurring, time-dependent decrease in 2,3-STase mRNA levels observed at 1800 h on D1 and partially (by $30 \pm 5\%$) that occurring at 1000 h on D2 (Fig. 5). Castrated rats also received one dose of 10 μ g OB or vehicle on day 28 after oophorectomy and the levels of 2,3-STase mRNA were analysed 24 h and 48 h after OB administration. As shown in Fig. 6, oestradiol administration to female castrates significantly reduced the levels of the enzyme mRNA, although to a lesser extent than in OB-treated intact animals (to $56.4 \pm 5.7\%$ and $36.8 \pm 7.8\%$ of the levels detected 24 h and 48 h after OB administration in vehicle-injected castrated controls respectively). In this animal group, administration of ICI 182,780 and oestradiol benzoate, in tandem, reversed by 36% the effects of

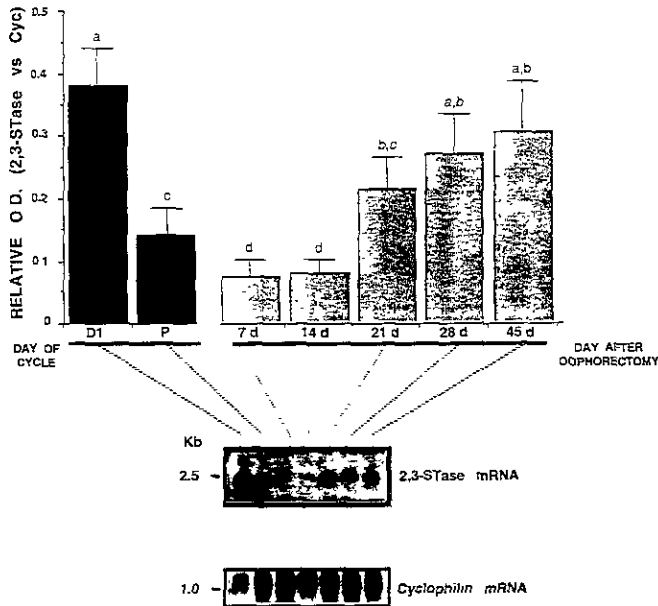


FIGURE 3. Changes in anterior pituitary 2,3-STase mRNA levels before and after castration on the morning of the day of P (means \pm s.d.). Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group. Also shown are representative Northern blots of total RNA from anterior pituitary glands probed with radiolabelled 2,3-STase and cyclophilin cDNA probes. The results are representative of 3 independent experiments.

OB on 2,3-STase mRNA levels observed at 48 h (Fig. 7).

Chromatofocusing fractionation of AP extracts revealed a marked increase in the relative abundance of FSH charge isoforms with elution pH values ≥ 5.0 at the time of highest serum oestradiol concentrations and lowest 2,3-STase mRNA levels, i.e. on the morning of P (Fig. 8). These less acidic FSH isoforms remained relatively increased during the day of O in a setting of low enzyme mRNA and relatively decreased serum oestradiol levels. Finally, on the morning of D2, there was a dissociation between the enzyme mRNA and serum oestradiol levels and the charge distribution of AP FSH, with the highest values for the most acidic isoforms in a setting of moderately increased serum oestradiol and decreased levels of the 2,3-STase mRNA (Fig. 8). In castrated rats, the pH distribution pattern of AP FSH was similar to that exhibited by intact animals killed at 1000 h on D1, with $>80\%$ of total FSH recovered in elution pH values <5.0 ; a

modest and not significant increase in less acidic isoforms (elution pH values ≥ 5.0) was detected exclusively on day 28 post-oophorectomy (not shown).

DISCUSSION

In the present study, we found that the mRNA levels of the 2,3-STase, one of the enzymes that add sialic acid to FSH, varied significantly according to the time and day of the rat oestrous cycle and that the dynamics of these changes in the enzyme mRNA levels were temporally associated with variations in serum oestradiol concentrations. Specifically, during the preovulatory days (D2 and P days) we observed a progressive decrease in 2,3-STase mRNA levels in the face of increasing serum oestradiol concentrations, reaching its lowest values immediately before and after maximal pituitary exposure to this sex steroid, i.e. in the

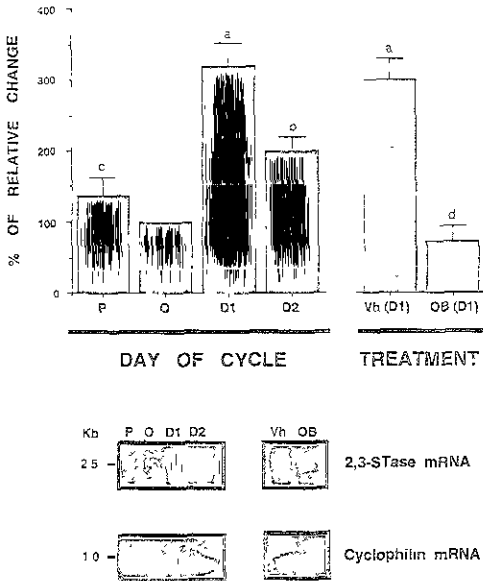


FIGURE 4. Changes in anterior pituitary 2,3-STase mRNA after administration of 10 μ g oestradiol benzoate (OB) or vehicle (Vh) on the morning of the day of oestrus (grey bars on the right) (means \pm s.d. of three separate experiments). The dynamics of the changes in pituitary 2,3-STase mRNA throughout the cycle in untreated animals is also shown for comparison (black bars on the left). Results are expressed as percentage change considering the normalized O.D. in the oestrous group as 100%. Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group. Representative Northern blots of total RNA from anterior pituitary glands probed with radiolabelled 2,3-STase and cyclophilin cDNA probes are also shown.

morning of P and O respectively; conversely, a significant rise in enzyme mRNA levels occurred at the time of lowest oestradiol output, thus suggesting that changes in oestrogen levels may influence the rate of transcription and/or stability of this glycosyltransferase mRNA. This possibility was in fact experimentally documented by the studies showing that administration of OB to both intact and castrated female rats blocked the naturally occurring increase in α 2,3-STase mRNA imposed by the low oestrogenic milieu, whereas the opposite effect was observed when the pure anti-oestrogen ICI 182,780 was injected to block the effects of endogenous or exogenous oestrogens. Apparently, the suppressive effects of oestradiol on the enzyme mRNA levels may extend throughout several hours

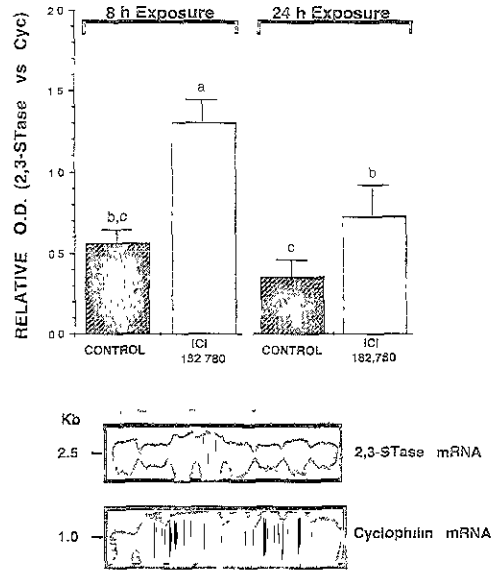


FIGURE 5. 2,3-STase mRNA levels in intact rats exposed during 8 h and 24 h to either vehicle (control) or the anti-oestrogen ICI 182,780 (2 mg/kg b.w.) administered subcutaneously at 1000 h on D1 (means \pm s.d.). Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group. Representative Northern blots of total RNA from anterior pituitary glands probed with radiolabelled 2,3-STase and cyclophilin cDNA probes are also shown. The results are representative of 3 separate experiments.

or even days after maximal oestradiol exposure as disclosed by the persistently low 2,3-STase mRNA levels during the morning of O and after gonadal removal on the day of P. Nevertheless, the finding that the α 2,3-STase mRNA levels remained persistently low at least for 14 days following oophorectomy, and that the response to both oestradiol benzoate and ICI 182,780 in the gonadectomized group was considerably attenuated as compared with those exhibited by the intact animals, suggests that other extrapituitary factors may be additionally involved in the control of this enzyme mRNA levels (see below).

We and others have shown that sialic acid plays a key role in determining both the charge isoform distribution and the biological activity of FSH and other glycoprotein hormones (Reichert 1971, Ulloa-Aguirre *et al.* 1984, Chappel *et al.* 1982, 1984, Wide 1989, Schaaf *et al.* 1997). Incubation of rat

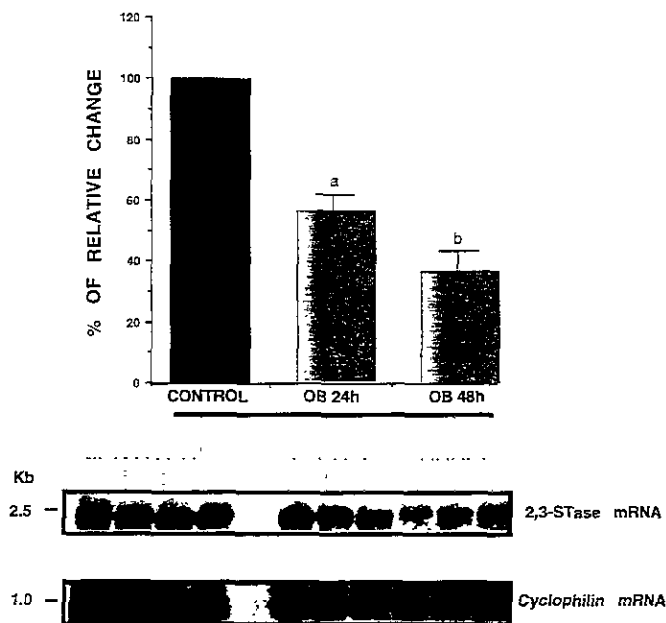


FIGURE 6. Changes in anterior pituitary 2,3-STase mRNA levels after 24 h and 48 h of oestradiol benzoate administration (OB; 10 μ g) on day 28 post-oophorectomy (means \pm s.d. of 3 independent experiments). Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group. Representative Northern blots of total RNA from anterior pituitary glands probed with radiolabelled 2,3-STase and cyclophilin cDNA probes are also shown.

and monkey AP extracts and recombinant human FSH with the enzyme neuraminidase progressively decreased the most acidic components of the hormone while concomitantly increasing the proportion of less acidic forms until only FSH isoforms with elution pH values of 6.4 or greater were detected (Chappel *et al.* 1984, Ulloa-Aguirre *et al.* 1984, Galway *et al.* 1990). Studies with neuraminidase-treated human sera and pituitary extracts also demonstrated that removal of sialic acid residues induces a shift in the charge of FSH isoforms towards less acidic isomers, thus suggesting that some of the charge variations detected in different physiological conditions are mainly due to differences in the terminal sugar content of FSH (Wide 1982, 1985, 1989). In the present study, chromatofocusing fractionation of AP extracts allowed the identification of significant shifts in FSH charge isoform distribution throughout the cycle, with a significant increase in the relative

abundance of the less acidic FSH isoforms during the morning of the day of P and to a lesser extent during O, times at which low 2,3-STase mRNA levels were detected. However, such a close inverse relationship between the abundance of less acidic isoforms and enzyme mRNA levels was practically absent during the following days of the cycle, particularly on D2, as well as after 7 and 14 days of castration, conditions during which the highest relative abundance of more acidic isoforms was detected in a setting of significantly decreased 2,3-STase mRNA levels. The existence of a partial rather than a complete correlation between this enzyme mRNA levels and the changes in FSH charge isoform distribution may be due to the following: (1) the concomitant participation of other sialyltransferases (e.g. $\alpha 2,6$ -STase) or glycosyltransferases (which may in turn be regulated by one or several extrapituitary factors) in FSH processing, including sialylation and/or sulphation (Baenziger &

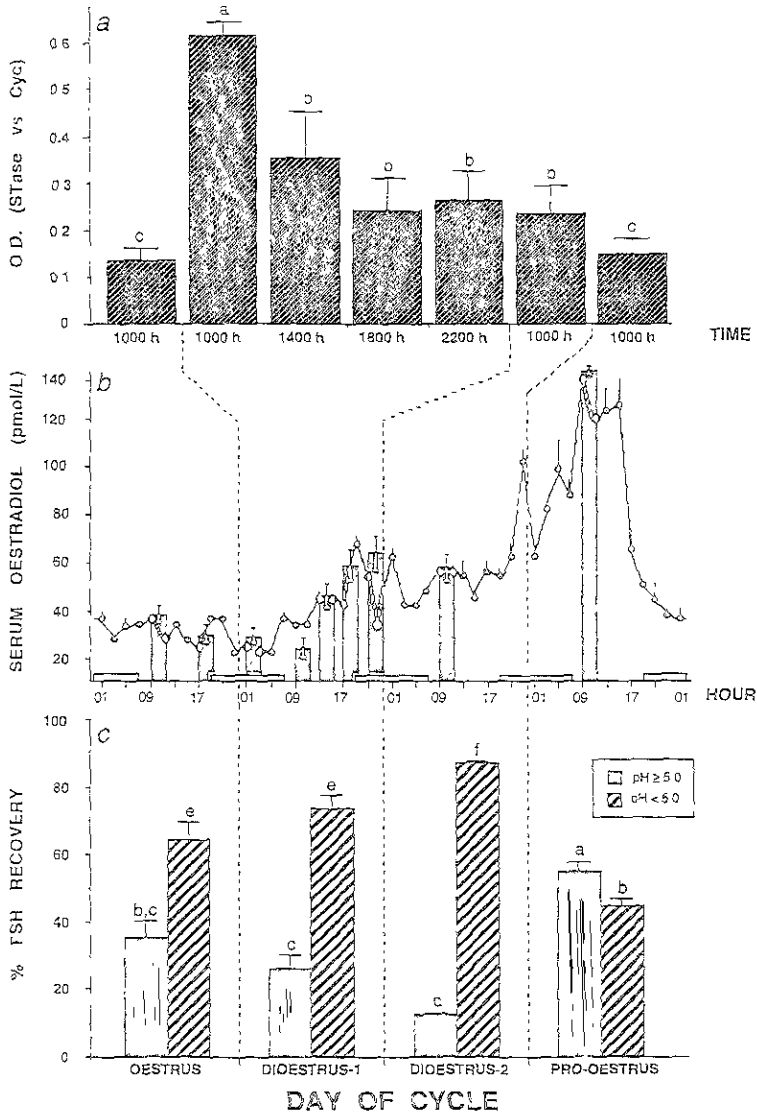


FIGURE 8 Temporal relationship between changes in anterior pituitary 2,3-STase (STase) mRNA levels throughout the oestrous cycle (a), the serum oestradiol concentrations (black bars in (b)) and the charge distribution of pituitary FSH at 1000 h on each day of the oestrous cycle (c); data in (c) are presented as the proportion of FSH recovered within elution pH values ≥ 5.0 and < 5.0 normalized as a percentage of total FSH recovered from each single chromatofocusing run (n =three columns per day of cycle). Intrapituitary FSH content was 0.15 ± 0.04 , 0.16 ± 0.02 , 0.06 ± 0.01 and 0.08 ± 0.01 μg FSH-RP-2/gland on the days of P, O, D1 and D2 respectively. For each graph the results represent the means \pm s.d. The pattern of oestradiol levels in serum samples taken at frequent intervals throughout the oestrous cycle as reported by Smith *et al.* (1975) is also shown for comparative purposes (closed circles in (b), means \pm s.e.m.). Horizontal bars represent the dark period.

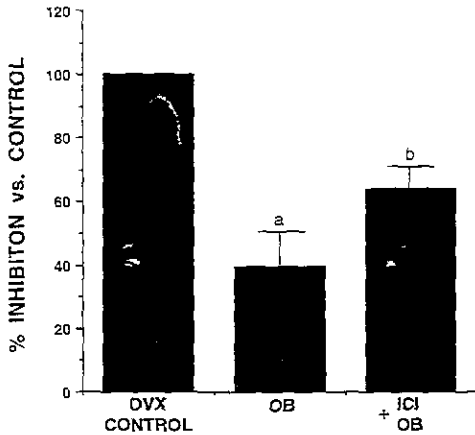


FIGURE 7. The effects of oestradiol benzoate (OB) or ICI 182,780 (ICI) plus OB on 2,3-STase mRNA levels in oophorectomized rats (means \pm s.d. of three separate experiments). Groups of four rats were castrated on the morning of P. On day 28 after oophorectomy, animals were divided into three treatment groups. The control group received vehicle at all times; the OB group was treated with vehicle at 1000 h, OB (10 μ g subcutaneously) at 1100 h and again with vehicle at 1000 h on the next day. Finally, the ICI 182,780 group received 2 mg/kg b.w. of the anti-oestrogen at 1000 h, followed by OB at 1100 h and again ICI 182,780 at 1000 h on the next day. All animals were killed by decapitation 48 h after the start of the experiment and the pituitary glands were processed for 2,3-STase mRNA measurement as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage change considering the normalized O.D. in the control group as 100%. Different letters above the bars indicate the existence of significant ($P < 0.05$) differences between each group.

Green 1988, Darmesh & Baenziger 1993, Helton & Magner 1994a,b, Kitagawa & Paulson 1994, Rafferty *et al.* 1995), (2) to variations in substrate availability, which may eventually allow for effective sialylation in conditions characterized by low enzyme levels and reduced FSH production, such as those present during both dioestrous days (Smith *et al.* 1975, Ortolano *et al.* 1988, present study); (3) to oestrogen-independent variations in the half-life of the enzyme, and/or (4) to the inability of our FSH RIA system to allow for a clear distinction between increased production of more acidic/sialylated isoforms and decreased immunogenicity of epitopes present in certain FSH glycoforms bearing less complex oligosaccharide structures

and whose relative abundance may be increased at a given time (Dahl & Stone 1992, Stanton *et al.* 1996).

These and other previously reported *in vivo* experiments (Padmanabhan *et al.* 1988, Wide & Naessén 1994) do not clarify unambiguously whether oestradiol modifies 2,3-STase mRNA levels and thus protein sialylation directly on the pituitary gland, on the hypothalamus to regulate GnRH activity, or by a combination of several pathways. Although some studies strongly implicate GnRH in modulating the glycosylation and degree of sialic acid-dependent charge heterogeneity of LH and FSH respectively (Galle *et al.* 1983, Miller *et al.* 1983, Liu *et al.* 1992, 1994, Ulloa-Aguirre *et al.* 1992b), more recently, several *in vivo* studies involving experimental animals and humans have allowed us to distinguish between pituitary and hypothalamic sites of regulation by oestrogens. Using the nutritionally growth-restricted ovariectomized lamb as the experimental model (state of hypogonadotrophism due to central inhibition of GnRH secretion in which the pituitary responsiveness to exogenous GnRH is preserved (Ebling *et al.* 1990)) it has been shown that whereas pulsatile administration of GnRH failed to alter the pattern of charge isoform distribution of intrapituitary and secreted FSH, oestradiol treatment selectively increased the secretion of less acidic/sialylated isoforms (Hassing *et al.* 1993, Lee *et al.* 1998). Likewise, although in normally ovulating women the relative abundance of less acidic FSH isoforms increased dramatically during the periovulatory period (a time of increased oestradiol levels and pituitary GnRH sensitivity) (Padmanabhan *et al.* 1988, Wide & Bakos 1993, Zambrano *et al.* 1995), the changes observed in the distribution of more and less acidic/sialylated serum FSH isoforms were not significantly altered by the consecutive administration of a low and high GnRH dose during each cycle phase (Zambrano *et al.* 1995). Although such studies data do not exclude additional intrapituitary loci of control via autocrine and/or paracrine interactions (whose nature and role, if any, in modifying the post-translational molecular forms of FSH are not known), the overall data strongly indicate that oestrogens play a determinant role in defining the degree of glycosylation of the FSH molecule during certain physiological conditions.

The present results are in agreement with other studies showing that products from target glands under the control of the AP gland are tightly involved in the posttranslational processing of the trophic signal (Miura *et al.* 1989, Gyves *et al.* 1990, Darmesh & Baenziger 1993, Helton & Magner 1994a,b, Persani *et al.* 1998). In fact, it has

been demonstrated that activities of some glycosyltransferases ($\alpha 2,6$ -sialyltransferase and GalNAc-transferase) and mannosidases (α -mannosidase-II), may be modulated specifically at the pituitary level by thyroid hormones (Helton & Magner 1994a,b) and oestrogens (Darmesh & Baenziger 1993), thereby potentially affecting sialylation and sulphation of TSH and LH respectively. Thus, regulation of the structure and biological properties of glycoprotein hormones by specific stimuli may represent an additional level of feedback control by which the target cell regulates the duration and intensity of the trophic signal released from the AP gland.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, grants 0004P-N9505 and G016M), the Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH), the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, and PADEP-UNAM (500307), México DF. The authors are indebted to the NIADDK for the rat FSH RIA material, to Drs Victor Sales and José Luis Velázquez from Zeneca Farma, Mexico, for the ICI 182,780 and to Mr Roberto Chavira for performing the RIA of 17β -oestradiol. Pablo Damían-Matsumura is a postgraduate student from the Facultad de Estudios Profesionales-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

REFERENCES

- Baenziger JU & Green ED 1988 Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochimica et Biophysica Acta* **947** 287-306
- Cerpa-Pollak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CKH, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC & Schofield PR 1993 Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and *in vitro* bioactivity. *Endocrinology* **132** 351-356
- Coppel SC, Coutifaris C & Jacobs SC 1982 Studies on the microheterogeneity of FSH present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamsters. *Endocrinology* **110** 847-854
- Chappel SC, Lillo-Aguirre A & Coutifaris C 1983 Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews* **4** 179-211
- Chappel SC, Bethea CL & Spies HG 1984 Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitary glands of *Cynomolgus* monkeys. *Endocrinology* **115** 452-461
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156-159
- Dahl KD & Stone MP 1992 FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays and their significance. *Journal of Andrology* **13** 11-22
- Darmesh SM & Baenziger JU 1993 Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90** 11127-11131
- Datta AK & Paulson JC 1995 The sialyltransferase 'sialylmotif' participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *Journal of Biological Chemistry* **270** 1497-1500
- Ebling FJP, Wood RI, Vannerson LA, Suttie JM, Buchlotz DC, Karsch FJ, Schall RE & Foster DL 1990 Metabolic interferences between growth and reproduction. III. Central mechanisms controlling LH secretion in the nutritionally growth-limited female lamb. *Endocrinology* **126** 2719-2727
- Esch FS, Meson AJ, Cookev K, Mercado M & Shimasaki S 1986 Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta chain of bovine follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83** 6618-6621
- Fiddes JC & Goodman HM 1979 Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature* **281** 351-356
- 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. *Journal of Endocrinology* **99** 31-39
- Gaiwaw AB, Hsueh AJW, Keene JL, Yamoto M, Fauser BCJM & Boime I 1990 *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* **127** 93-100
- Gharib SD, Roy A, Wierman ME & Chin WW 1989 Isolation and characterization of the gene encoding the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA* **8** 339-349
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA & Chin WW 1990 Molecular cloning of pituitary gonadotropin. *Endocrine Reviews* **11** 177-199
- Glenn TC & Glenn SJ 1994 Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs). *Trends in Genetics* **10** 344
- Green ED & Baenziger JU 1988 Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin II. Distribution of sulfated and sulfated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *Journal of Biological Chemistry* **263** 36-44
- Gyves PW, Gesundheit N, Thorakura NR, Stannard BS, DeChernev GS & Weinraub BD 1990 Change in the sialylation and sulfation of secreted thyrotropin in congenital hypothyroidism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87** 3792-3796
- Hassing JM, Kletter GB, l'Anson H, Woods RI, Beirns I, Foster DL & Padmanabhan V 1993 Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH) isoform distribution pattern of pituitary or circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology* **132** 1527-1536
- Helton TE & Magner JA 1994a Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotropin of hypothyroid mice: an *in situ* hybridization study. *Endocrinology* **134** 2347-2353
- Helton TE & Magner JA 1994b $\beta 1,4$ -Galactosyltransferase and α -mannosidase-II messenger ribonucleic acid levels increase with different kinetics in thyrotropin of hypothyroid mice. *Endocrinology* **135** 1980-1985

- Kitagawa H & Paulson JC 1994 Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *Journal of Biological Chemistry* **27** 17872-17878.
- Kleen R & Berger EG 1993 The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1154** 283-325.
- Lee JS, Manning JM, Foster DL & Padmanabhan V 1998 Estrogen increases the secretion of less-acidic FSH isomers in ovariectomized prepubertal and peripubertal lambs. *Program of the 80th Annual Meeting of the Endocrine Society (USA)*, New Orleans, LO, 1998, p 348 Abstract P2-74.
- Liu TC, Pu HF & Jackson GL 1992 Divergent roles of protein kinase C in luteinizing hormone biosynthesis versus release in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **131** 2711-2716.
- Liu TC, Pu HF & Jackson GL 1994 Differential actions of phospholipase C on gonadotropin-releasing hormone-stimulated release and glycosylation of luteinizing hormone in rat anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* **60** 62-68.
- 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. *Fertility and Sterility* **40** 242-247.
- Miura Y, Perkel VS, Papenberg KA, Johnson MJ & Magner JA 1989 Concanavalin-A, lentil and ricin affinity binding characteristics of human thyrotropin: differences in the sialylation of thyrotropin in sera of euthyroid, primary and central hypothyroid patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **69** 985-995.
- Ovtolano GA, Haisenleder DJ, Dalkin AC, Iliff-Sizemore SA, Landefeld TD, Maurer RA & Marshall JC 1988 Follicle-stimulating hormone beta subunit messenger ribonucleic acid concentrations during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **123** 2946-2948.
- Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J, Keich RP & Beitins IZ 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* **67** 465-473.
- Persani L, Borgato S, Romoli R, Astena C, Pizzocaro A & Beck-Peccoz P 1998 Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 2486-2492.
- Pierce JG & Parsons TF 1981 Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry* **50** 465-495.
- Rafferty B, Mower JA, Ward HL & Rose M 1993 Differences in carbohydrate composition of FSH preparations detected with lectin-ELISA systems. *Journal of Endocrinology* **145** 527-533.
- Reichert LE 1971 Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing. *Endocrinology* **88** 1029-1035.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson A 1977 DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74** 5463-5467.
- Schaaf L, Leiprecht A, Sajt M, Hübner U, Usadel KH & Kohn LD 1997 Glycosylation variants of human TSH selectively activate signal transduction pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* **132** 185-194.
- Simoni M, Jockenhovell F & Nieschlag E 1994 Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of immunoreactivity and *in vitro* bioactivity of different molecular species. *Journal of Endocrinology* **141** 359-367.
- Smith MS, Freeman ME & Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* **96** 219-226.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW & Robertson DM 1996 Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology* **125** 133-141.
- Stockell Hartree HA & Renwick GCA 1992 Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochemical Journal* **287** 665-679.
- Ulloa-Aguirre A & Timossi C 1998 Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update* **4** 260-283.
- Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L & Chappel S 1984 Production of all follicle-stimulating hormone isoforms from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biology of Reproduction* **30** 382-387.
- Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz-Sánchez V & Larrea F 1986 Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *Journal of Endocrinology* **110** 539-549.
- Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L & Domínguez R 1988 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, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E & Díaz-Sánchez V 1992a Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Human Reproduction* **7** 23-30.
- Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravioto A, Zambrano E & Damián-Matsumura P 1992b Effects of gonadotropin-releasing hormone, recombinant human actin-A and sex steroid hormones upon the follicle-stimulating isoforms secreted by rat anterior pituitary cells in culture. *Journal of Endocrinology* **134** 97-106.
- Ulloa-Aguirre A, Rees Mideley Jr A, Beitins IZ & Padmanabhan V 1995 Follicle-stimulating isoforms: characterization and physiological relevance. *Endocrine Reviews* **16** 765-787.
- Wakeling AE, Dukes M & Bowler J 1991 A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research* **51** 3867-3873.
- Watkins PC, Eddy R, Beck AK, Vellucci V, Leverone B, Tanzi RE, Gusella JF & Shows TB 1987 DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA* **6** 205-211.
- Weinstein J, de Souza-e-Silva U & Paulson JC 1982 Purification of a Gal $\beta 1 \rightarrow$ GlcNAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialyltransferase and a Gal $\beta 1 \rightarrow$ (+)GlcNAc $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase to homogeneity from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **257** 13835-13844.
- Wen DX, Livingston BD, Medzhiradzky KF, Kelm S, Burlingame AL & Paulson JC 1992 Primary structure of Gal $\beta 1,3(4)$ GlcNAc $\alpha 2,3$ -sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. *Journal of Biological Chemistry* **267** 21011-21019.
- 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. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinologica* **109** 190-197.
- Wide L 1989 Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. *Journal of Endocrinology* **123** 519-529.

- Wide L & Bakos O 1993 More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **76** 885-889
- Wide L & Naessen T 1994 17β -Estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clinical Endocrinology* **40** 783-789
- Wilson CA, Leigh AJ & Chapman AJ 1990 Gonadotrophin glycosylation and function. *Journal of Endocrinology* **125** 3-14
- Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Diez-Cueto L, Velchuis JD & U'Uoa-Aguirre A 1995 Dynamics of basal and gonadotrophin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80** 1647-1656
- Zambrano E, Barrios-de-Tomas J, Cardenas M & U'Uoa-Aguirre A 1996 Studies on the *in vitro* biological potency of the naturally occurring isoforms of intrapituitary follicle-stimulating hormone. *Molecular Human Reproduction* **2** 563-571

REVISED MANUSCRIPT RECEIVED 21 April 1999