

00377

12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ALFA 2,3-SIALILTRANSFERASA EN LA RATA HEMBRA

209038

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

Biol. Exp. **Ma. Angélica Maldonado Rodríguez**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA



MEXICO D.F.

AGOSTO, 2001

COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna MALDONADO RODRIGUEZ MA. ANGELICA con número de cuenta 99810274, con la tesis titulada: "REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ALFA 2,3-SIALILTRANSFERASA EN LA RATA HEMBRA", bajo la dirección del DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATSUMURA.

Presidente:	Dr. Enrique Antonio Pedemera Astegiano
Secretario:	Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. María Esther Cruz Beltrán
Suplente:	Dra. Leticia Morales Ledesma

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de octubre de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

El Comité Tutural de la presente tesis estuvo integrado por:

Dr. Pablo Damián Matsumura
Dra. Leticia Morales Ledesma y
Dr. Luis Felipe Jiménez García.

El presente trabajo fue apoyado económicamente por una beca de CONACYT con número 1513 del proyecto número 31706-N.

Pedid que se os dará
buscad y hallaréis;
llamad y se os abrirá.

Porque todo aquel que pide, recibe;
y el que busca, halla;
y al que llama;
se le abrirá.

Mateo 7: 7,8

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme ver la luz de un nuevo amanecer y por ponerme en el camino en el que me encuentro.

A ti Mamá por darme el ser, por tu apoyo, por tu gran e infinito amor, y sobre todo por ser formadora de alas y realizadora de sueños.

A ti Papá que aunque no estés físicamente junto a mí sé que estás ahí.

A ustedes hermanos Juana, Toño, Irma y Ale por aguantar mis locuras y apoyar mis sueños.

A Katy y Sergio cuya alegría e inocencia dan luz a mi vida.

A ti Sergio por darle felicidad a mi vida, por tu apoyo y la fuerza que día a día me das.

Y por último a todos mis compañeros y amigos y muy en especial a ti Pablo por inspirarme a alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a toda la gente que siempre estuvo a mi lado principalmente a mi familia y amigos sin cuyo apoyo habría sido muy difícil la realización de esta tesis, y en especial a Toño por su gran e invaluable ayuda.

Al director de mi tesis Dr. Pablo G. Damián Matsumura y a los Drs. Leticia Morales Ledesma, Luis Felipe Jiménez García, Enrique Antonio Pedernera Astegiano y María Esther Cruz Beltrán sinodales de mi tesis.

A mis amigos del Instituto Nacional de la Nutrición en donde inicio esta tesis, en especial a René, Martín, Sarita y Luis por brindarme su amistad.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" del IMSS y muy en especial a Rosy y a Jenny por el cariño que me han demostrado. Y un agradecimiento muy especial al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, Jefe de la unidad por la oportunidad brindada para formar parte de su grupo de trabajo; y a todas aquellas personas que no menciono pero que están dentro de mi corazón y que forman parte de mi vida, mil gracias.

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ANTECEDENTES	1
INTRODUCCIÓN	2
Generalidades de la hipófisis.....	2
Hormona folículo estimulante (FSH).....	11
Isoformas de la FSH.....	17
Patrones de secreción de la FSH, LH y estradiol durante el ciclo estral de la rata.....	25
Expresión del ARNm-2,3-STasa durante el ciclo estral.....	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Modelos animales experimentales.....	30
Experimentos.....	30
Síntesis de las sondas 2,3-STasa y ciclofilina.....	31
Hibridación por la técnica de NORTHERN BLOT.....	33
Análisis del ARNm por HIBRIDACIÓN <i>in situ</i>	35
Inmunohistoquímica para β -FSH.....	37
Radioinmunoensayos.....	37
Análisis de datos.....	38
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62

RESUMEN

La hormona estimulante de los folículos (FSH) es sintetizada por la adenohipófisis en forma de múltiples formas moleculares. Se ha relacionado el incremento en las isoformas de la FSH más ácidas (con mayor contenido de ácido siálico) con condiciones en las que predominan bajas concentraciones de estrógenos. En nuestro laboratorio se ha demostrado que las concentraciones hipofisarias del mensajero del ácido ribonucleico (ARNm) que codifica a la enzima Gal β 1,3[4]GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (2,3-STasa; una de las enzimas responsables de la incorporación de residuos de ácido siálico a las hormonas glicoproteicas) cambia durante el ciclo estral de la rata (J Mol Endocrinol. 23:153, 1999). En el presente estudio se investigaron los cambios en la expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa, mediante el empleo de las técnicas de northern blot e hibridación *in situ* (HIS), en hipófisis de ratas sacrificadas en diferentes estadios del ciclo estral, después de la administración de sustancias con actividad estrogénica y antiestrogénica y después de la ooforectomía. Ambas técnicas se llevaron a cabo empleando una sonda de ADN complementario de 346 pb el cual codifica para la secuencia no conservada del dominio catalítico de la 2,3-STasa; la localización específica de los gonadotropos que sintetizan la FSH se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica en secciones adyacentes a los empleados para la HIS, empleando un anticuerpo contra la fracción beta de la FSH. La máxima expresión del ARNm de la 2,3-STasa se observó en gonadotropos provenientes de ratas sacrificadas en la mañana (10:00 h) del metaestro (82 ± 5 células positivas/campos de 150 mm^2 a $1000\times$); se detectó un decremento progresivo en la expresión del ARNm de esta enzima durante la mañana del diestro (52 ± 7), el proestro (6 ± 2) y el estro (10 ± 4). Por otro lado, la expresión del ARNm-2,3-STasa como a la FSH fue significativamente mayor en hipófisis de ratas sacrificadas después de un periodo de 28 días de ovariectomía, en comparación con aquellas que se sacrificaron después de 7 días de castración. La administración de benzoato de estradiol (BE) o el antagonista del receptor de estrógenos ICI 182,780 a ratas intactas tuvo efectos opuestos sobre la expresión del ARNm de la 2,3-STasa, donde el BE bloqueó el incremento del ARNm que se observa durante la mañana del metaestro, mientras que el antiestrogénico revirtió el decremento fisiológico observado durante la tarde de ese mismo día y la mañana del diestro. Estos resultados confirman la idea de que los estrógenos regulan la adición de ácido siálico a las hormonas glicoproteicas de los gonadotropos y por lo tanto pueden ser directamente los responsables de los cambios en la distribución por carga de las isoformas de la FSH durante el ciclo menstrual de la mujer.

ABSTRACT

Follicle-stimulating hormone (FSH) is synthesized by the pituitary (AP) gland in multiple charge isoforms. It has been related the increased in the acidic sialylated FSH isoforms acids (to greater content sialic acid) to conditions in those which prevail concentration decreases of estrogens. In our laboratory has been demonstrated that the pituitary mRNA levels of the enzyme Gal beta1,3[4] GlcNAc, alpha 2,3-sialiltransferase (2,3-STase; one of the enzymes responsible for the incorporation of sialic acid residues in glycoprotein) change during the rat estrous cycle (J Mol Endocrinol. 23:153, 1999). In the present study were investigated the changes in the expression of the mRNA of the enzyme 2,3-STase in gonadotrope cells, through the employment of the technique of *in situ* hibridation (ISH), of rat AP glands sacrificed throughout the estrous cycle, after ovariectomy and the administration with activity estrogenic and antiestrogenic. ISH was perform employing a of 346 bp labeled with digoxigenin, complementary DNA probed encoding of the enzyme; specific localization of the 2,3-ST ase m RNA in gonadotropes was performed by immunohistochemistry in of sections adjacent to ISH, employing an anti β -FSH antiserum. The strongest expression of the 2,3-STase mRNA was observed in gonadotropes from rats sacrificed on the morning (10:00 h) of the Metaestrus (109 \pm 14 positive cells / 150 mm² fields at 400X); a progressive decline in the mRNA was then observed during the morning of Diestrus (130 \pm 9 positive cells/ fields), the Proestrus (57 \pm 7) and Estrus (60 \pm 12). On the other hand, the amount of positive cells/field was significantly higher in long-term after (28-days; 140 \pm 10) ovariectomized rats in compared to short-term (7-day; 16 \pm 8) castrates. Administration of estradiol of benzoato (EB) or estrogen receptor antagonist of the receiving of estrogens ICI 182,780 to intact rats provoked opposed effects on 2,3-STase mRNA expression, where the EB blocked the physiological increase in the mRNA levels occurring during the morning of the Metaestrus, while the antiestrogen reverted the physiological decline observed during the afternoon of that same day and the morning of the Diestrus. These results demonstrate that estrogens regulate sialylation of glicoproteins at of the gonadotrope cell level and thus may be directly responsible for the changes in the distribution by load with the isoforms of the FSH during the estrous cycle.

ANTECEDENTES.

La liberación cíclica de la gonadotropina adenohipofisiaria hormona estimulante de los folículos o folitropina (FSH) está controlada por mecanismos de retroalimentación positivos (estimulatorios) y negativos (inhibitorios) de diferentes factores, entre los que se encuentran los esteroides gonadales (estrógenos y andrógenos), los péptidos gonadales como activina, inhibina y folistatina (Gharib y cols., 1990) y el factor liberador hipotalámico llamado hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Sanno y cols., 1997), que actúan directa o indirectamente sobre los gonadotropos, células donde son sintetizadas y almacenadas en gránulos secretores (Chappel y cols. 1983; Ganong 1988).

La FSH pertenece a una familia de glicoproteínas, de la cual forman parte la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) placentaria, estas hormonas se encuentran formadas por dos cadenas polipeptídicas denominadas subunidad alfa (α) y subunidad beta (β), que se mantienen unidas por enlaces no covalentes. La subunidad α es común para todos los miembros de esta familia, mientras que el monómero β es específico para cada hormona y también varía de especie a especie, lo cual le confieren a cada hormona especificidad inmunológica y biológica sobre sus respectivas células blanco (Bousfield y cols., 1994; Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000).

Estas hormonas, al igual que otras glicoproteínas, experimentan un proceso de maduración por la glicosilación después de su traducción en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (REr) del gonadotropo, posteriormente se completa la maduración final en el Aparato de Golgi mediante la adición y remoción de carbohidratos necesaria para ser clasificadas, etiquetadas y enviadas a sus destinos finales (Baenzinger y Green, 1988). En el caso particular de la FSH, una de las modificaciones post-traduccionales más importantes es la que llevan a cabo un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, llamadas sialiltransferasas (Hirschberg y Snider, 1987), principalmente la α 2,3-sialiltransferasa (2,3-STasa) del Aparato de Golgi en el gonadotropo, que adiciona monómeros de ácido siálico a los oligosacáridos adheridos a la superficie de esta hormona peptídica. Estas modificaciones a la molécula de FSH le confiere variaciones en su estructura molecular y, por tanto, la creación de múltiples isoformas de la FSH, cada una con propiedades fisiológicas características tales como la vida media plasmática, la capacidad de unión al receptor, las actividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, además de que se piensa que estas modificaciones se encuentran reguladas hormonalmente (Wilson y cols., 1990; Ulloa-Aguirre y cols., 1995).

INTRODUCCIÓN.

GENERALIDADES DE LA HIPÓFISIS.

ANATOMÍA DE LA HIPÓFISIS.

Ubicación en el cerebro.

La glándula pituitaria o también llamada hipófisis es una glándula endócrina situada en la base del cerebro (figura 1A), se aloja en una depresión profunda del hueso esfenoides conocida como la silla turca. En humanos pesa aproximadamente 0.5 gramos con 1 cm de largo, 1-1.5 cm de ancho y 0.5 cm de alto. Produce al menos 10 hormonas y tiene conexiones nerviosas y vasculares con el cerebro, al cual esta unido por el tallo hipofisiario (Fawcett y Bloom 1992; Fanjul, 1995).

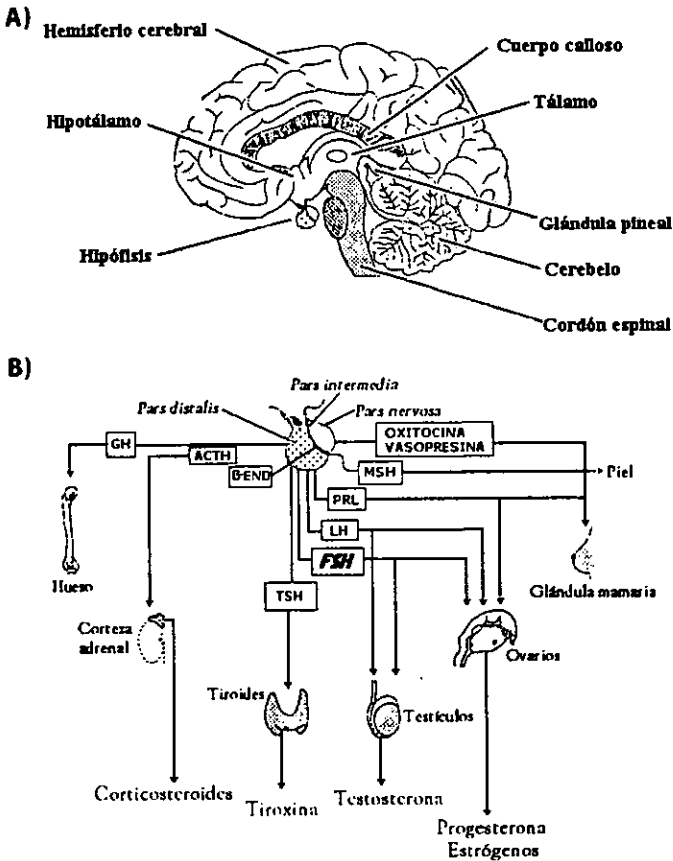


Fig. 1. Ubicación anatómica de la hipófisis. A) La hipófisis se encuentra conectada a la eminencia media del hipotálamo por el tallo hipofisiario. B) En la hipófisis se secretan 10 hormonas a partir de sus 3 lóbulos, estas hormonas una vez que son secretadas entran a la circulación y actúan en diferentes órganos blanco que también pueden ser glándulas que secretarán a su vez otras hormonas como en el caso de las gónadas (Brown, 1994).

División anatómica

Anatómicamente la hipófisis se encuentra dividida en neurohipófisis y adenohipófisis (figura 2) y a su vez cada una de ellas se subdividen de la siguiente forma:

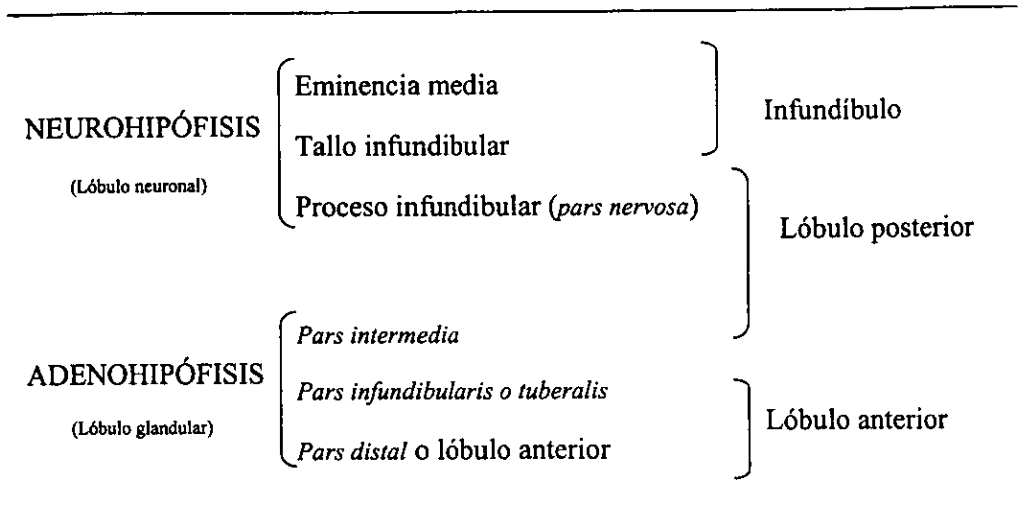


TABLA I. Divisiones y subdivisiones de la hipófisis (Everett, 1994).

La neurohipófisis deriva del ectodermo neural y se desarrolla como una prolongación que crece hacia abajo del suelo del diencéfalo, representa una verdadera extensión del cerebro.

Se encuentra formada por la *pars nervosa* (proceso infundibular) e infundíbulo, que a su vez está formada por el tallo infundibular y la eminencia media del *tuber cinereum*, en su mayoría se encuentra formada por axones de neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en el hipotálamo (figura 2).

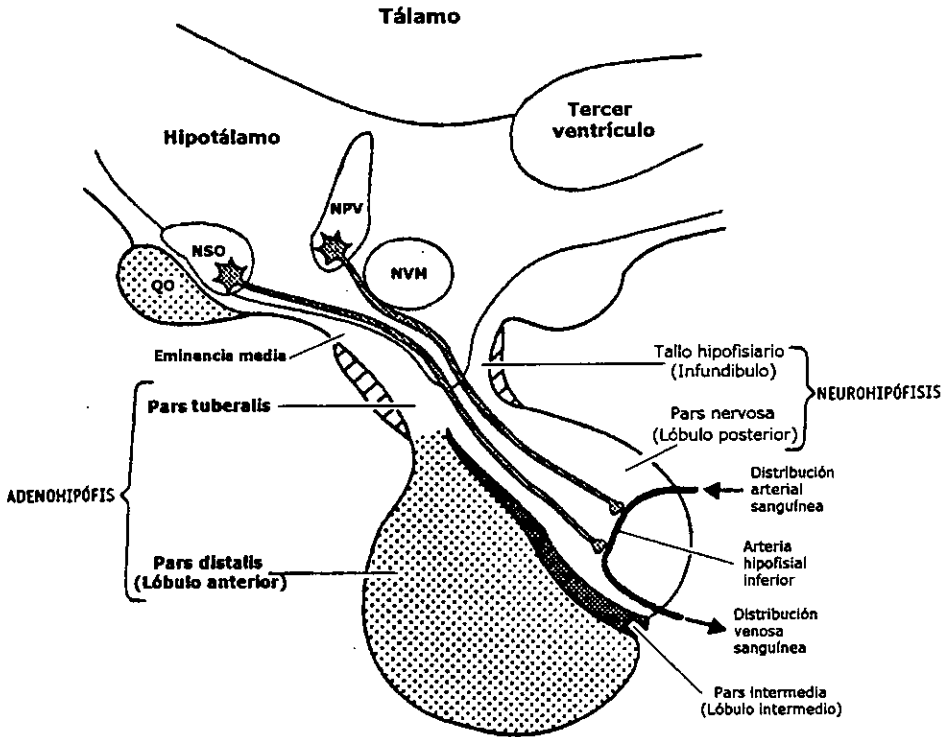


Fig. 2 Principales subdivisiones de la hipófisis. La neurohipófisis consta principalmente de la *pars nervosa* (lóbulo posterior) y el infundíbulo. Este contiene las terminales nerviosas de las células neurosecretoras cuyos cuerpos celulares están en los núcleos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV) del hipotálamo. Los axones de las células neurosecretoras en el NPV y NSO se proyectan hacia el infundíbulo del tallo hipofisiario a la *pars nervosa* donde son liberadas sus hormonas a la arteria hipofisial inferior. La adenohipófisis tiene 2 elementos: la *pars distalis* (lóbulo anterior) y la *pars tuberalis* del tallo hipofisial. En muchas especies la *pars intermedia* (lóbulo intermedio) es también considerada parte de la AH. NVM=Núcleo ventromedial, QO= Quiasma óptico (Brown, 1994).

La adenohipófisis se origina en el embrión como una evaginación dorsal del techo de la faringe embrionaria (Bolsa de Rathke) y se une al hipotálamo por medio del tallo hipofisiario llamado *pars tuberalis* el cual contiene al sistema porta-hipofisiario constituido por vasos sanguíneos. Las terminaciones nerviosas de las células neurosecretoras del hipotálamo llegan a la eminencia media donde los factores liberadores e inhibidores son vertidos al sistema porta-hipofisiario, por medio del cual son llevadas a la adenohipófisis. Por lo tanto, el tallo hipofisiario contiene axones nerviosos y vasos sanguíneos conectando al hipotálamo con la hipófisis, figuras 2 y 3 (Fawcett y Bloom, 1992; Brown, 1994). Esta se subdivide en *pars intermedia*, *pars infundibularis* o *tuberalis* y *pars distalis* o lóbulo anterior.

a) La *pars intermedia* se encuentra formada por epitelio multiestratificado de células basófilas, separa a la *pars distal* de la neurohipófisis; en la *pars intermedia* de los seres humanos la fisura es por lo general incompleta, las células basófilas residuales son pocas y pueden extenderse por el lóbulo neural, la cual es muy evidente en fetos y casi nula en adultos, mientras que en roedores (ratón) constituye el 19% de la hipófisis. Las principales células de la *pars intermedia* son las melanotrofas que secretan la hormona estimulante de los melanocitos u hormona melanotropa (MSH), son células epiteliales poligonales y grandes, ricas en mitocondrias y que poseen un retículo endoplasmico rugoso y un Aparato de Golgi bien desarrollados. La MSH es un polipéptido sencillo que puede tener varias formas, las cuales son similares en estructura a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Además de las células melanotrofas se encuentra un número pequeño de células con características de las células secretoras de ACTH de la *pars distalis*, éstas son células pequeñas que tienen un perfil irregular. Por último se encuentran células con forma estrellada, no secretoras que extienden sus largas prolongaciones ramificadas alrededor y entre las células glandulares y forman una red laxa (Brown, 1994).

b) La *pars infundibularis o tuberalis* solo constituye una pequeña parte de la hipófisis, se encuentra junto a la *pars intermedia* y tiene un ancho de 25-60 μm ; el rasgo morfológico característico es la disposición longitudinal de sus cordones de células epiteliales que ocupan los intersticios que quedan entre los vasos sanguíneos orientados longitudinalmente. Esta región es la más vascularizada de la hipófisis, ya que es atravesada por los vasos arteriales que van al lóbulo anterior y por el sistema portal venoso hipotálamo-hipofisiario, donde sus células epiteliales corresponden a células indiferenciadas y a pequeñas células basófilas y acidófilas; el componente principal es una célula cilíndrica o cuboidea, con un tamaño de 12-18 μm que contienen muchos gránulos pequeños o a veces finas gotitas de coloide. Las células pueden disponerse en acinos o pueden encontrarse en islotes de células de epitelio plano estratificado, sin una función hormonal específica asignada (Fanjul, 1995).

c) La *pars distalis o lóbulo anterior*, que es la porción mayor de la hipófisis, está formada por células glandulares dispuestas en cordones y grupos irregulares que se encuentran estrechamente relacionadas con una extensa red de sinusoides de pared delgada del sistema vascular sanguíneo. Este lóbulo se encuentra encerrado por una cápsula de colágena densa, poco estroma y fibras de colágena que acompañan a las arterias hipofisiarias superiores y a las vénulas portales (Fawcett y Bloom, 1992).

HORMONAS SECRETADAS POR LA HIPÓFISIS.

Las hormonas que produce la hipófisis son de 2 tipos:

- Hormonas cuyo efecto principal es la estimulación directa de los tejidos (por ejemplo GH y prolactina), y
- Hormonas que van a estimular glándulas endócrinas para que estas a su vez produzcan sus propias hormonas (como son, TSH, ACTH, FSH y LH).

En la tabla I se muestran las hormonas secretadas por cada uno de los lóbulos de la hipófisis incluyendo al lóbulo intermedio que es considerado como parte de la adenohipófisis.

LÓBULO	HORMONA	FUNCIÓN
LÓBULO NEURAL	Oxitocina	Estimula las contracciones uterinas y la salida de leche de la glándula mamaria.
	Vasopresina (hormona antidiurética).	Eleva la presión sanguínea y promueve la reabsorción de agua por los riñones.
LÓBULO ANTERIOR	Hormona del crecimiento (GH o Somatotropina).	Promueve la síntesis de proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y el crecimiento de huesos y músculos por estimulación de somatomedinas.
	Hormona adrenocorticotrópica (ACTH).	Estimula la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal.
	Hormona estimuladora de la tiroides (TSH o tiotropina).	Estimula la secreción de tiroxina (T4) y de la triiodotironina (T3) de la glándula tiroides.
	Prolactina (PRL).	Inducen la producción y secreción de leche en la glándula mamaria y estimula a las gónadas.
	Hormona estimulante de los folículos (FSH o folitropina)	Estimula el crecimiento del folículo primario, la secreción de estrógenos del ovario en hembras y la producción de espermatozoides en el testículo de machos.
Hormona luteinizante (LH o lutropina).	Estimula la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona en hembras; estimula a las células de Leyding (intersticial) para secretar andrógenos en machos.	
LÓBULO INTERMEDIO	Hormona estimulante de los melanocitos (MSH).	Estimula a los melanotropos para el oscurecimiento de la piel en anfibios y puede tener un efecto similar en humanos.
	β -Endorfina.	Actúa como neuromodulador en el cerebro para regular la liberación de neurotransmisores, y posiblemente como un analgésico circulatorio.

Tabla II. Hormonas de la glándula hipófisis.

Relación con el hipotálamo.

La secreción de las hormonas de la hipófisis está regulada principalmente por estímulos provenientes del hipotálamo mediante la conexión entre la hipófisis y el hipotálamo llamada sistema porta-hipofisiario (Fawcett y Bloom, 1992; Guyton y Hall, 2000).

El hipotálamo es el centro cerebral más importante en la regulación neuroendocrina; se encuentra dividido en 2 sistemas neurosecretores: el sistema parvicelular, cuyos axones se extienden desde los cuerpos celulares hasta la eminencia media, donde son liberados los péptidos estimulantes e inhibidores en el plexo secundario, para ser llevados a la circulación general (figura 3). El segundo es el sistema neurosecretor magnocelular, que está formado por los cuerpos neuronales localizados en el núcleo supraóptico (NSO) y en el núcleo paraventricular (NPV), cuyos axones amielínicos forman el cordón hipotálamo-hipofisiario que desciende hacia el lóbulo posterior de la hipófisis.

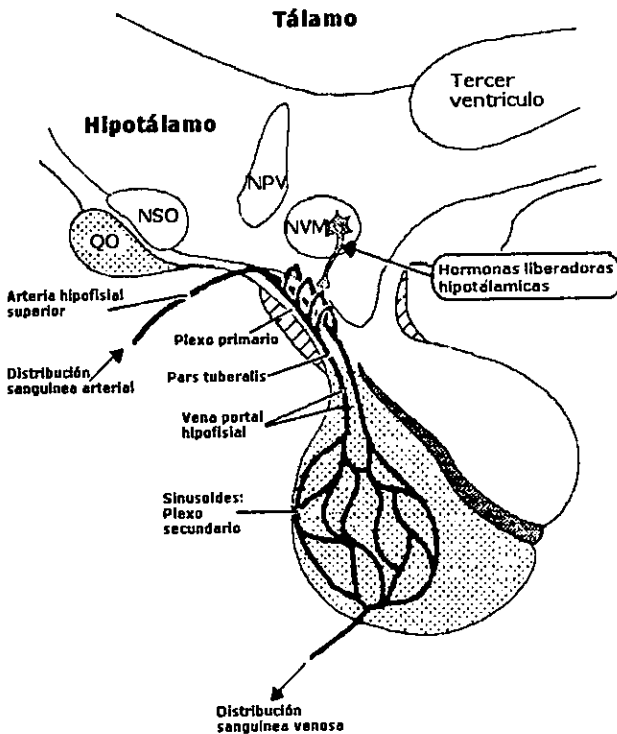


Fig 3. Conexiones entre el hipotálamo y la adenohipófisis. Las hormonas liberadoras hipotálamicas son secretadas por células neurosecretoras en el núcleo ventromedial (NVM) y otras áreas del hipotálamo. Los axones de esas células neurosecretoras se proyectan hacia el plexo primario en la eminencia media del hipotálamo. Las venas portales hipofisiarias llevan los factores hipotálamicos desde el plexo primario a través de la *pars tuberalis* del tallo hipofisial hacia el plexo secundario en la adenohipófisis. NPV=Núcleo paraventricular, NSO=Núcleo supraóptico y QO=Quiasma óptico (Brown, 1994).

El sistema neurosecretor magnocelular secreta las hormonas oxitocina y vasopresina, las cuales posteriormente pasan a la *pars nervosa* donde son almacenadas en terminales nerviosas y liberadas a la arteria hipofisial inferior a través de la cual entran a la circulación, ambas hormonas se encuentran presentes en los NSO y NPV pero son sintetizadas por diferentes neuronas. Además de los axones de las células neurosecretoras hipotálamicas, el lóbulo neural contiene una población propia de células llamadas pituicitos, que al parecer no son secretoras; estas células tienen prolongaciones delgadas que se unen entre sí y forman una red que envuelve a los elementos neuronales. Sus prolongaciones citoplasmáticas llevan un curso tortuoso entre los grupos de axones secretores preterminales y muchas veces envuelven directamente sus expansiones terminales repletas de granulos, ocupando del 25 al 30% del total del lóbulo neural (Fawcett y Bloom, 1992; Everett, 1994).

Irrigación sanguínea.

La irrigación sanguínea de la hipófisis, esta directamente implicada en el control de la actividad secretora de la glándula, consta de dos arterias hipofisiarias inferiores procedentes de la carótida interna, se arboriza en la cápsula de la glándula y envía ramas al lóbulo posterior y, en menor medida, se extienden hasta los sinusoides del lóbulo anterior. Varias arterias hipofisiarias superiores, nacidas de la carótida interna y en la arteria comunicante posterior del polígono de Willis, se anastomosan en la región de la eminencia media del hipotálamo y de la base del tallo pituitario, de esos vasos salen capilares que constituyen el plexo primario (fig. 3), los cuales se extiende por la eminencia media y regresan después a la superficie, donde confluyen en venas que se dirigen hacia abajo rodeando al tallo hipofisiario e irrigan los sinusoides de la adenohipófisis. Las vénulas que enlazan los capilares sinusoides del lóbulo anterior forman el sistema hipofisoportal, el drenaje venoso de la hipófisis se realiza fundamentalmente por vasos que pasan por la capa vascular de la cápsula, se dirigen hacia el diafragma de la silla turca y de allí hacia los senos duros vecinos. Los factores hipotálamicos liberados por los nervios de la eminencia media del hipotálamo son transportados en la sangre por el sistema hipofisoportal hacia la adenohipófisis, donde estimulan a las células para que liberen sus hormonas específicas (Leeson y Paparo, 1987; Fawcett y Bloom, 1992).

HISTOLOGÍA DE LA ADENOHIPÓFISIS.

Las células glandulares, dentro de las cuales se encuentran las células de la adenohipófisis, se clasifican de acuerdo a la tinción en cromófilas y cromófobas debido a su avidez o falta de afinidad para los colorantes comunmente utilizados para visualizar las células de los cortes histológicos.

Células cromófilas

Las células cromófilas de la hipófisis anterior son divididas en acidófilas y basófilas, dependiendo de la coloración de sus gránulos específicos en los cortes teñidos con hematoxilina y eosina o con otras combinaciones de un colorante ácido y otro básico.

Las células acidófilas son las más numerosas, se encuentran en las regiones posterolaterales y se caracterizan por ser células pequeñas, redondeadas, de 14-19 μm de diámetro, con un aparato de Golgi bien desarrollado y mitocondrias pequeñas en forma de bastoncillos. Se distinguen 2 tipos de células acidófilas:

1. Células somatotropas (células de somatotropina), que secretan a la hormona del crecimiento (GH) y contienen numerosos gránulos esféricos de 300-350 nm de diámetro.
2. Células mamotropas (células de prolactina), que tienden a distribuirse de una en una por el interior de los cordones celulares. Secretan a la hormona prolactina y contienen muchos gránulos pequeños con 200 nm de diámetro.

Las células basófilas se dividen en 3 tipos:

1. Células tirotropas (basófilas beta o células de tirotropina), las cuales secretan a la hormona TSH, son alargadas o poligonales y están dispuestas en grupos en la región anteromedial del lóbulo anterior. Tienden a situarse en la profundidad de los cordones celulares, alejados de los sinusoides, sus gránulos son los más pequeños y se congregan en la periferia de la célula.
2. Células corticotropas (células adrenocorticotrópicas), secretan la hormona ACTH y la hormona lipotropina (LPH), son redondas u ovals, aparecen distribuidas por la porción anteromedial, generalmente invaden de manera ligera el lóbulo posterior y los gránulos tienen un tamaño de 200-250 nm. En roedores las células tienen una forma estrellada irregular, con prolongaciones celulares que se extienden entre las células vecinas y terminan junto a los sinusoides. Estas células sintetizan también la pro-hormona glicoproteica pro-opiomelanocortina (POMC) es sintetizada en la *pars distalis* y la *pars intermedia*, así como en el cerebro. Este polipéptido es fragmentado por enzimas que se encuentran tanto en el lóbulo anterior como en el intermedio dando como consecuencia 7 hormonas activas: ACTH, α -MSH, β -MSH, γ -MSH, CLIP (péptido del lóbulo intermedio semejante a corticotropina), β -LPH y β -endorfina (Fanjul, 1995).

3. **Células gonadotropas** (basófilas delta o células FSH/LH), son células redondas que se sitúan junto a los sinusoides, secretan a las hormonas FSH y LH, tienen un aparato de Golgi grande, un retículo endoplasmico bien desarrollado y cisternas tortuosas, frecuentemente dilatadas por un contenido homogéneo de baja densidad. Los gránulos son esféricos y su diámetro varia de 200 a 400 nm (Fawcett y Bloom, 1992).

En el estudio de la síntesis y secreción de la FSH y de la LH se obtuvieron resultados contradictorios; en algunos estudios se encontró que la síntesis de ambas hormonas se presenta en el mismo tipo celular (Smelser, 1944; Giround y Martinet, 1948; Purves y Griesbach, 1951; Halmi, 1952 y Costoff, 1973) y otros estudios reportaron que es en células diferentes (Saveringhaus, 1937; Romeis, 1940 y Farquhar, 1955).

No se ha demostrado que la FSH y LH sean sintetizadas y secretadas en gonadotropos diferentes, por el contrario estudios recientes *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la síntesis y liberación de la FSH y de la LH se lleva a cabo en la misma célula, donde son almacenadas en diferentes gránulos secretores y su liberación se encuentra regulada de forma independiente, pero estrechamente coordinada (Chappel y cols., 1983; Haisenleder y cols., 1994). Por lo que se ha postulado que ambas gonadotropinas se sintetizan en la misma célula y no en gonadotropos separados.

Células cromófobas

Las células cromófobas (células de reserva) son células pequeñas, situadas en grupos en el interior de los cordones celulares y que contienen poco citoplasma. Las células cromófobas son una población de reserva no homogénea, se encuentra formada por células relativamente indiferenciadas capaces de diferenciarse ya sea a acidófilas o a basófilas. Al parecer hay un grado considerable de especialización citológica entre las células cromófobas, algunas tienen un aparato de Golgi característico de las acidófilas, mientras en otras es más parecido al de las basófilas.

HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA FSH

La FSH es una glicoproteína heterodimérica (fig. 4), con peso molecular aproximado de 30,000 daltones es sintetizada y secretada por los gonadotropos de la adenohipófisis. Las cadenas monoméricas están unidas por varios enlaces no covalentes que estabilizan la estructura terciaria de la molécula. Ambas subunidades contienen dos cadenas de oligosacáridos del tipo complejo, cada una unida covalentemente al grupo amino de la cadena lateral de la asparagina. La subunidad α de la FSH (α FSH) está constituida, en la rata por 96 aminoácidos que presentan dos sitios de N-glicosilación en los residuos de asparagina 56 y 82 y dos sitios más en su subunidad β (β -FSH) formada por 111 aa, en los residuos 7 y 24. Los oligosacáridos de la FSH de rata terminan en ácido siálico al igual que la humana a diferencia de las FSH ovina y bovina que tienen terminaciones mixtas de ácido siálico y sulfatos (Rathaman y Saxena, 1984; Green y Baenzinger, 1988a y Green y Baenzinger, 1988b).

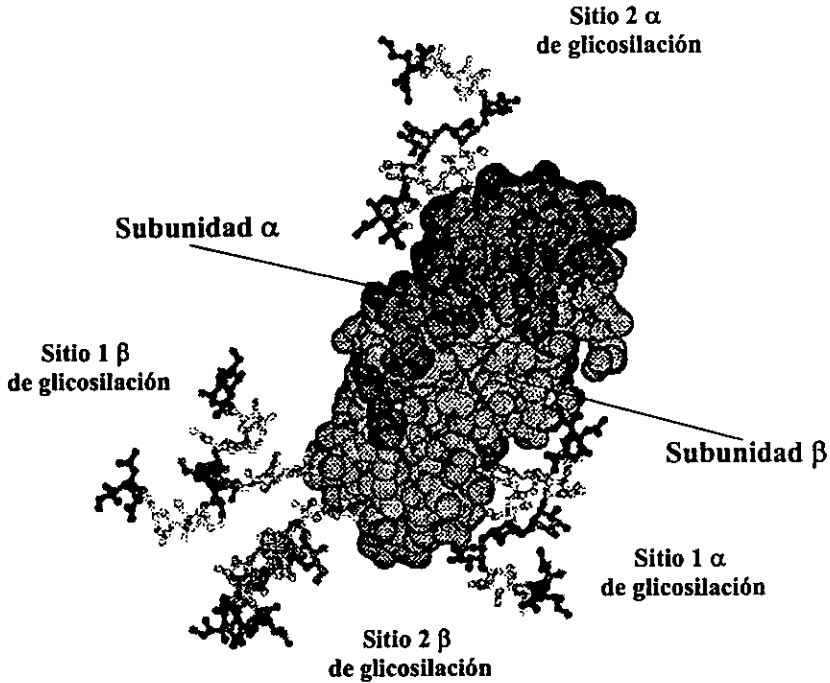


Fig 4. Esquema de la hormona foliculo estimulante humana (FSHh). La subunidad α se observa en color oscuro y la subunidad β esta en color claro, ambas subunidades con sus 2 cadenas de oligosacaridos N-unidos (Ulloa-Aguirre y cols. 1999).

La FSH ha sido la glicoproteína más difícil de aislar en forma pura (sin contaminantes de la LH) debido a su alta inestabilidad y la concentración tan pequeña encontrada en la hipófisis anterior, siendo la FSH humana la primera que fue purificada y secuenciada. Han sido encontradas múltiples formas de la FSH tanto en la adenohipófisis como en la circulación, siendo atribuida esta microheterogeneidad principalmente a las variaciones en el grado de glicosilación (Chappel y cols., 1982; Ulloa-Aguirre y cols., 1995).

La subunidad α es común para otras glicohormonas, mientras sus subunidades β son específicas para cada hormona y también varía de especie a especie, la LH y la FSH presentan oligosacáridos bi-, tri- y tetraramificados con terminaciones que difieren entre sí debido a que la LH presenta principalmente una terminación sulfatada [SO_4 -4GalNAc β (1-4)GlcNAc β (1-2)Man], mientras que la FSH presenta una terminación principalmente sializada [AS α -Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2)Man]. El espectro de estructuras presentes en la FSH y la LH indican que la síntesis de oligosacáridos sulfatados y sializados está fuertemente regulada y puede tener una importancia funcional (Green y Baenzinger, 1988a, Green y Baenzinger 1988b).

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA FSH.

La FSH, actúa conjuntamente con la LH, para llevar a cabo efectos regulatorios y mantener procesos reproductivos esenciales sobre las gónadas tales como la gametogénesis, el desarrollo y maduración de los folículos ováricos, el desencadenamiento de los procesos de ovulación, la esteroidogénesis ovárica y el control del ciclo estral (ratas) y menstrual (humanos), así como el proceso espermatogénico y de la actividad hormonal del testículo en el macho (Peters y cols., 1975; Padmanabhan y cols., 1991).

Durante la fase folicular muy temprana del ciclo ovulatorio, el tejido ovárico responde a bajas concentraciones circulantes de la LH y la FSH; la estimulación por las gonadotropinas activa las enzimas mitocondriales presentes en células especializadas de los folículos ováricos primarios (células de la granulosa) para inducir el rompimiento de la cadena lateral de moléculas de colesterol intracelular y así producir pregnenolona, éste es el paso limitante de la esteroidogénesis, que provee del sustrato a la célula de la granulosa en desarrollo para manufacturar esteroides androgénicos (Gore-Langton y Armstrons, 1994). Bajo la influencia de la FSH, precursores androgénicos (por ejemplo androstendiona) son biotransformados (aromatizados) a estrógenos, dando como resultado el crecimiento folicular. Las células de la granulosa proliferan como resultado del estímulo de la FSH y de estrógenos locales, por lo que producen más estrógenos que son vertidos a la circulación

sanguínea. Cuando la concentración sérica de estradiol es sostenido por un intervalo de tiempo específico, un evento neuroendócrino se desencadena dentro del eje hipotálamo-adenohipófisis para promover un incremento en la liberación de la LH y la FSH desde la adenohipófisis, lo cual a su vez induce una serie de eventos bioquímicos dentro del ovario que resultan en la ruptura del folículo y finalmente la ovulación (Chappel y cols., 1983; Espey y Lipner, 1994).

La FSH estimula el desarrollo folicular principalmente en las células de la granulosa del folículo ovárico que, en conjunto con la LH, lo preparan para la luteinización y la ovulación. En machos la FSH actúa sobre las células de Sertoli de los túbulos seminíferos del testículo, mientras que la LH actúa sobre las células intersticiales y, en hembras, principalmente en las células de la teca del folículo. La FSH estimula específicamente la producción de progesterona y la producción de aromatasas, enzimas que catalizan la conversión de la testosterona en estrógenos (Hsueh y cols., 1984), así como también estimula la producción de las enzimas relacionadas con la activación del plasminógeno que es la enzima clave en el rompimiento folicular durante la ovulación (Beers y Strickland, 1978; Galway y cols., 1990a; Galway y cols., 1990b).

GLICOSILACIÓN.

Los oligosacáridos que se transfieren a las proteínas en el retículo endoplasmático están, en la mayoría de las veces, unidos al residuo de asparagina (Asn) de la proteína llamados oligosacáridos **N-ligados** a diferencia de otros oligosacáridos que, con menor frecuencia, se unen a un residuo de serina (Ser), treonina (Thr) o hidroxilisina (OH-Lys), denominados oligosacáridos **O-ligados** (fig. 5).

Esta glicosilación inicial la realiza la enzima glicosiltransferasa en el retículo endoplasmico (fig. 6) y es selectiva solo para la secuencia: $H_2N-Asn-[X]-(Ser/Thr)-COOH$, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (fig. 5 y 6), lo que le confiere una alta especificidad a este proceso (Alberts y cols., 1994; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998).

Esta transferencia se lleva a cabo en el lado expuesto hacia el lumen de la membrana del retículo endoplasmático rugoso y se ha observado que el oligosacárido es fabricado en su totalidad antes de ser transferido al residuo "blanco" de Asn en la proteína, todo esto en un solo paso enzimático, tan pronto como el residuo de Asn emerge a la luz del retículo endoplasmático. El oligosacárido debe de estar presente en el lumen del retículo endoplasmático en forma "activa", es decir, unido a la molécula donadora, el lípido dolicol (fig. 6), vía un enlace de alta energía, un puente de pirofosfato. El oligosacárido es construido adicionando monosacárido tras monosacárido sobre esta molécula lipídica unida a la membrana, por lo que es anclado fuertemente a la superficie luminal del retículo endoplasmático donde se lleva a cabo la glicosilación (Kornfeld R y Kornfeld S, 1985; Alberts y cols., 1994 y Kim y Arvan, 1998).

Secuencia del procesamiento de glicosilación.

La síntesis inicia en la superficie citosólica de la membrana del retículo endoplasmático con la adición al dolicolfosfato de uno a uno de los azúcares, iniciando con la adición de 2 N-acetilglucosaminas y 5 manosas y de esta manera el oligosacárido es trasferido hacia el lumen de la membrana adicionandose 7 azúcares más y quedando como Glu3Man9GlcNAc2 y es transferido del dolicol al residuo de Asn ubicado en el polipéptido naciente durante su transporte a través de la membrana del retículo endoplasmático (reacción 1, Fig. 7). Inmediatamente es removido el residuo de glucosa terminal por una α 1,2-glucosidasa I específica (reacción 2).

Los 2 residuos de glucosa internos son trasladados (reacción 3) por la α 1,3-glucosidasa II específica, mientras la α -manosidasa cataliza la remoción del residuo de manosa α 1,2-unido (reacción 4).

Cuando las proteínas llegan al aparato de Golgi atraviesan las pilas de las cisternas Cis pasando por la cara media hasta la cara Trans por medio de transporte vesicular.

Los oligosacaridos ricos en manosa de glicoproteínas no lisosomales pueden ser modificados por la Golgi α 1,2 manosidasa (Golgi manosidasa I) para dar una estructura Man5GlcNAc2 (reacción 5). Esta reacción puede llevarse a cabo tanto en la cisterna Cis como en la Media.

En la cisterna Media las cadenas de oligosacaridos destinadas a dar las estructuras complejas son procesadas por adición de residuos de N-acetilglucosamina, catalizados por N-acetilglucosaminiltransferasa I (reacción 6), seguida por la remoción de dos residuos de manosa por

la Golgi α -manosidasa II (reacción 7) y la subsecuente adición de otras cadenas externas de residuos de N-acetilglucosamina, catalizada por la N-acetilglucosaminiltransferasa II (reacción 8).

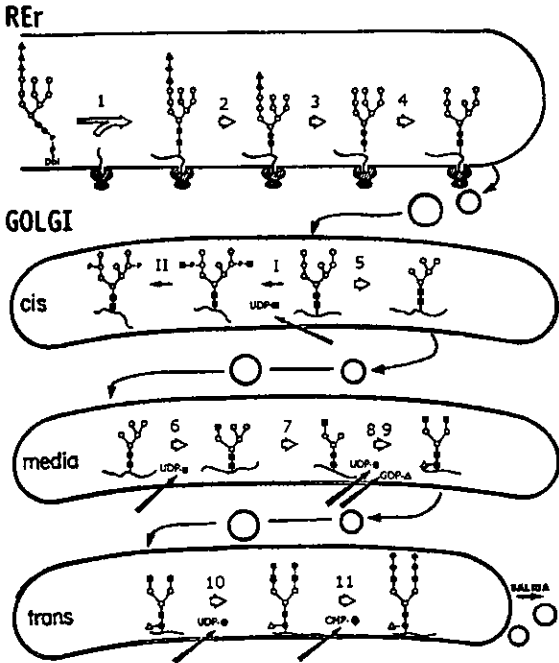


Fig. 7. Procesamiento de las glicoproteínas a través del RER y del AG. Las reacciones se encuentran catalizadas por las enzimas: 1) oligosacáridotransferasa, 2) α -glucosidasa I, 3) α -glucosidasa II, 4) α -1,2-manosidasa del RE, 5) N-acetilglucosaminil fosfotransferasa, 6) N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster- α -N-acetilglucosaminidasa, 7) α -manosidasa I del AG, 8) N-acetilglucosaminiltransferasa I, 9) α -manosidasa II del AG, 10) N-acetilglucosaminil-transferasa II, 11) fucosiltransferasa, 12) galactosiltransferasa, 13) sialiltransferasa. Los símbolos representan: =N-acetilglucosamina; =manosa; =glucosa; Δ = fucosa; \bullet =galactosa; \blacklozenge =ácido siálico. Las flechas horizontales abiertas indican el proceso que regularmente siguen las glicoproteínas durante su maduración, las flechas horizontales en negro representan una vía alternativa de fosforilación y las flechas largas e inclinadas señalan la entrada de precursores donadores de azúcares para la síntesis de los oligosacáridos (Kornfeld R y Kornfeld S, 1985).

En este estado la fucosiltransferasa puede actuar para transferir un residuo de fucosa al interior de un residuo de GlcNAc en el oligosacárido (reacción 9). Los pasos finales de la síntesis del oligosacárido complejo se lleva a cabo en la cisterna Trans y consiste en la adición en la cadena externa de residuos de Galactosa y de ácido siálico catalizados por galactosil y sialil transferasas respectivamente (reacciones 10 y 11). Otra adición de azúcares terminales puede ocurrir en este estado tardío. Las glicoproteínas recién sintetizadas salen del aparato de Golgi y son transportadas a su destino final en vesículas secretoras. (Kornfeld R y Kornfeld S, 1985; Kim y Arvan, 1998; Helenius y Aebi, 2001).

La presencia de diferentes estructuras, en cantidades variables, de los residuos terminales de carbohidratos en las gonadotropinas les confiere características aún más especiales, ya que una misma glicohormona puede presentar diversas formas moleculares (microheterogeneidad) que le proporcionan características bioquímicas y fisiológicas únicas para cada isoforma, incluyendo la vida media plasmática, la capacidad de unión a sus respectivos receptores y la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* (Kornfeld R y Kornfeld S, 1985).

ISOFORMAS DE LA FSH.

MICROHETEROGENEIDAD DE LA FSH

De las modificaciones sucesivas en las cadenas de oligosacáridos que ya están incorporadas en la FSH, la más notoria para esta glicohormona es la adición de ácido siálico, y en menor proporción galactosa, en posiciones terminales de las cadenas de carbohidratos de acuerdo a diferentes condiciones fisiológicas (Chotigeat y cols., 1994; Zerfaoui y Ronin, 1996). En la figura 7 se observa la vía del procesamiento de las glicoproteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático y las modificaciones sucesivas hasta su maduración y secreción en el aparato de Golgi (Kleene y Berger, 1993). Esta característica ha sido empleada para poder separar isoformas de la FSH con base en la carga neta de la molécula a diferentes pH (punto isoeléctrico, pI), ya que el ácido siálico presenta una carga neta negativa que, en un efecto aditivo, se refleja en la hormona. Así, cuando la FSH presenta una menor cantidad de ácido siálico (pI menos ácido) tiene una mayor afinidad por su receptor e induce una mayor respuesta hormono-específica, pero su vida media plasmática decrece notablemente al compararla con isoformas más ácidas (con mayor contenido de ácido siálico), por lo que se ha establecido una relación inversamente proporcional entre la vida circulante y la bioactividad en función del grado de sialización de los oligosacáridos. Estas variaciones en la estructura y distribución de los oligosacáridos sializados dan como resultado las diferentes isoformas moleculares de la FSH y son responsables de la gran heterogeneidad por carga que la caracteriza (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., 1994); sin embargo, el efecto neto *in vivo* de las diferentes isoformas de la 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 (Padmabhan y cols., 1991; Ronin, 1992; Valove y cols., 1994).

Se han usado diferentes metodologías para la separación de las distintas formas moleculares de la FSH, como son el isoelectroenfoque (Reichert LE Jr, 1971) 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 su pI. De esta forma 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 (isoformas menos ácidas).

DISTRIBUCIÓN DE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA FSH.

Las isoformas de la FSH han sido aisladas a partir de extractos de hipófisis anterior, suero y orina en diferentes especies de animales, incluyendo al humano. Su número y cantidad relativa dependen de la técnica utilizada en su separación, la muestra de extracción, el sexo del individuo, estado de desarrollo sexual y el estado fisiológico del donador al momento de la obtención de la muestra (Wide, 1986; Wide, 1989; Robertson y cols., 1991; Ulloa-Aguirre y Timossi 2000).

Las isoformas circulantes son más ácidas que las intrahipofisarias (Wide y Albertson-Wikland, 1990; Ulloa-Aguirre y cols., 1992b; Zambrano y cols., 1995) y esta diferencia se puede deber a la mayor vida media circulatoria de las formas más ácidas. Los estudios en orina se han llevado a cabo en muestras de mujeres postmenopáusicas (Cook y cols., 1988; Ulloa-Aguirre y cols., 1992b; Simoni y cols., 1993) donde la mayor proporción de isoformas urinarias fueron isoformas más ácidas (Ulloa-Aguirre y cols., 1992b). Al comparar la distribución de las isoformas de FSH, se observó que la FSH urinaria contiene una mayor cantidad de formas más ácidas que las hipofisarias y las séricas. La mayor abundancia de isoformas sializadas en muestras de orina puede ser el resultado de los métodos de purificación empleados o al hecho de que la hipófisis de mujeres postmenopáusicas secreten formas más ácidas en comparación con las secretadas por mujeres en edad reproductiva (Wide, 1982; Wide, 1989).

Las concentraciones de la FSH, así como la distribución por carga de las isoformas de la FSH hipofisaria y circulante, cambian durante el desarrollo sexual en humanos. Se ha visto que en niños hay concentraciones de la FSH hipofisaria más ácidas que en los hombres adultos; sin embargo, está es mayor que la presente en las niñas de edad similar. Por el contrario, la carga media de la FSH hipofisaria es similar entre niñas prepúberes y mujeres jóvenes (Wide, 1989). Con respecto a la FSH circulante, los estudios realizados también demuestran que las niñas tienen isoformas menos ácidas que los niños de la misma edad (Phillips y Wide, 1994). La bioactividad de la FSH circulante de las niñas durante la pubertad es similar a la que presentan las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual, sin embargo, tienen una menor potencia biológica que las isoformas de la FSH de las mujeres durante la fase preovulatoria, probablemente debido a que la maduración sexual se acompaña de cambios en las características fisicoquímicas y biológicas de la FSH almacenada y secretada (Wide, 1989).

Durante la edad reproductiva se han encontrado una mayor proporción relativa de isoformas menos ácidas en el suero de mujeres durante la fase folicular tardía y el medio ciclo (Padmanabhan

y cols., 1988; Zambrano y cols., 1995). La vida media de la FSH secretada de 2 a 3 días antes de la ovulación es menor que la de FSH en la fase folicular temprana y media (Booth y cols., 1994).

CONTROL ENDÓCRINO DE LA SÍNTESIS DE ISOFORMAS DE LA FSH.

En varios estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando la FSH, se ha encontrado que la aparición de las isoformas de la FSH hipofisarias y circulantes se encuentran reguladas por los esteroides gonadales y la GnRH (Padmanabhan y cols., 1988; Dahl y Stone, 1992), y que este tipo de regulación endócrina puede variar dependiendo de la etapa de desarrollo y de la especie estudiada. Tanto en el roedor como en el humano el perfil de distribución de las isoformas de FSH hipofisarias se modifican significativamente durante la pubertad (Ulloa-Aguirre y cols., 1990); pero casi no se detectan cambios en el bovino, lo que sugiere que la distribución relativa de las isoformas de la FSH está modulada por los cambios en el ambiente endócrino (Stupf y cols., 1992).

Los estrógenos se encuentran involucrados en la producción y secreción de las diferentes isoformas de la FSH (Galle y cols., 1983; Chappel y cols., 1984; Ulloa-Aguirre y cols., 1995). La administración de 17β -estradiol favorece la aparición de isoformas menos ácidas de la FSH y de manera natural, en las ratas hembra adultas en el día del Proestro (día cuando la concentración de estrógenos es relativamente alta) se incrementan las formas menos ácidas (Ulloa-Aguirre y cols., 1995). Un incremento similar de estas formas de FSH puede observarse en hámsters y monos ovariectomizados tratados con estradiol (Galle y cols., 1983; Chappel y cols., 1984).

Algunos estudios en humanos apoyan la importancia del estradiol en la regulación de la heterogeneidad de la FSH. En mujeres ovariectomizadas o con hipogonadismo, la exposición prolongada a estrógenos sintéticos conduce a un aumento en la proporción de isoformas menos ácidas. Por otro lado, después de la menopausia (estado hipoestrogénico natural) es posible observar un incremento de las formas más ácidas, mientras que el tratamiento con estrógenos a estas mujeres ocasiona cambios en la distribución de las isoformas de la FSH hacia formas relativamente menos ácidas (Wide y Naesspen, 1994; Wide y cols., 1995).

Las evidencias en roedores y humanos sugieren que los andrógenos también favorecen la producción de formas más ácidas ya que la FSH hipofisaria de roedores es invariablemente más ácida en machos que en hembras (Foulds y Robertson, 1983; Ulloa-Aguirre y cols., 1995). En la rata y el carnero la castración incrementa el contenido de isoformas menos ácidas (Keel y Schanbacher 1987; Simoni y cols., 1992), mientras que en el hámster y el mono macho ocurre lo opuesto (Ulloa-Aguirre y Chappel, 1982). La potencia biológica neta de la FSH se modifica en

paralelo con los cambios de las concentraciones de testosterona (Urbam y cols., 1992; Harsch y cols., 1993). Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a testosterona en células hipofisarias en cultivo ocasiona un incremento de la secreción de formas más ácidas de la FSH (Kennedy y Chappel, 1985).

Por otro lado, la GnRH juega un papel importante en la regulación de la heterogeneidad por carga de la FSH. Durante la pubertad en roedores y humanos, se incrementa la secreción de la GnRH y se presentan alteraciones en el perfil de la distribución por carga de las isoformas de la FSH (Chappel y cols., 1983; Ulloa-Aguirre y cols., 1986). Los estudios sugieren que la GnRH tiene un efecto en la secreción de formas menos ácidas, ya que el inducir la pubertad a ovejas con la GnRH exógena, ocasiona un cambio en el incremento de formas menos ácidas en la circulación (Padmanabnan y cols., 1992). Aunque todo indica que la GnRH juega un papel importante en la determinación de la heterogeneidad por carga de la FSH, es difícil poder discriminar entre los efectos directos de la GnRH y los inducidos por los esteroides sexuales.

La influencia de los péptidos gonadales en la distribución de las isoformas de la FSH parece ser menos pronunciada que la que ejercen los esteroides sexuales y la GnRH (Bogdanove y cols., 1974). Para analizar el efecto de la activina en la heterogeneidad de la FSH se realizó un estudio *in vitro* (Ulloa-Aguirre y cols., 1992b) en donde células hipofisarias de rata fueron incubadas con activina-A humana recombinante, con lo que se indujo la síntesis y secreción de la FSH, pero sin alterar la distribución del perfil del pI tanto en la FSH intracelular como en la secretada. Sin embargo, el hallazgo de que la activina-A modula la secreción de la GnRH en la línea neural celular GTi-7 (González-Manchon y cols., 1991) abre la posibilidad de que este factor pueda regular indirectamente *in vivo* la producción de isoformas de la FSH al modular la producción y/o secreción de la GnRH. En cuanto a la inhibina, el hecho de que las concentraciones circulantes de este péptido gonadal se incrementen durante la fase lútea del ciclo menstrual (McLachlall y cols., 1987; Le Nestour y cols., 1993), podría asociarse con la disminución de formas menos ácidas de la FSH durante esta fase (Padmanahan y cols., 1988; Zambrano y cols., 1995).

SIALIZACIÓN

La importancia biológica de la sialización ha sido estudiada en diferentes hormonas, y se ha demostrado que la hLH, la hCG y la hFSH se unen a sus respectivos receptores, pero su bioactividad varía según el grado de sialización que presenten. Se ha descrito la secuencia de los oligosacáridos N-ligados de la FSH y de la LH de bovino, ovino, rata y humano, siendo para estas especies una relación aproximada de diez veces mayor cantidad de oligosacáridos sulfatados en la

LH que en la FSH, y en esta última existen exclusivamente las estructuras sializadas en el humano (Baenziger y Green, 1988).

En general, se ha observado que la sialización es una modificación postraduccional de muchas glicoproteínas, incluyendo a hormonas como la FSH, para regular procesos tan diversos como la endocitosis mediada por un receptor, la adhesión celular, el reconocimiento viral de la célula huésped y como señal hormonal de transducción (Fayos y Bartles, 1994). La remoción del AS de la hormona disminuye específicamente la capacidad de interacción con su receptor, pero sin abatirla totalmente (Ryan y cols., 1987; Stanton y cols., 1996); la bioactividad es afectada por la presencia de mayor o menor cantidad de AS en las posiciones terminales (Ronin, 1992; Flack y cols., 1994; Simoni y cols., 1994).

La familia a la que pertenece el ácido siálico está compuesta por diferentes monosacáridos cargados negativamente, siendo el ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico, Neu 5 Ac, NANA, SA ó Sia) el miembro más común de esta familia, y probablemente sirva como precursor biosintético de otros miembros de la misma familia. Debido a su carga negativa, el ácido siálico también puede inhibir interacciones célula-célula, servir como ligandos para el reconocimiento celular, ser parte del ligando de inmunoglobulinas, ayudar en la adhesión de leucocitos a células epiteliales mediadas por selectinas y en la depuración de asialo glicoproteínas de la circulación entre otras funciones (Kornfeld R y Kornfeld S, 1985).

Las enzimas que se encargan del procesamiento final, en el que se adicionan monómeros de ácido siálico a los residuos de galactosa principalmente, usando como sustrato donador al ácido neuroamínico-citosín monofosfato (CMP-NeuAc) se conoce como sialiltransferasas. Cada enzima se puede distinguir por su especificidad en el reconocimiento de la secuencia del oligosacárido aceptor y el enlace anomérico formado entre el ácido siálico y el azúcar al cual es adherido (Nemansky y cols., 1992, Kitagawa y Paulson, 1994b; Baenzinger, 1994; Tsuji y cols., 1996).

Las sialiltransferasas son una familia de por lo menos 15 enzimas altamente específicas relacionadas entre sí por su función común de transferir ácido siálico a las posiciones terminales de los oligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos (Gillespie y cols., 1992; Kitagawa y Paulson JC, 1994a; Kitagawa y Paulson, 1996).

En el caso de la FSH, la sialización la realiza específicamente la Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (2,3-STasa, fig. 8) debido al tipo de unión que presentan los residuos de ácido siálico terminales con las galactosas de sus oligosacáridos.

Esta enzima forman parte de la familia de las glicosiltransferasas, siendo proteínas transmembranales tipo II que se encuentran en la membrana de la cisterna trans del aparato de Golgi (Datta y cols., 1997). La topología de membrana de algunas sialiltransferasas consiste, como se observa en la figura 8A de 4 regiones o dominios principales.

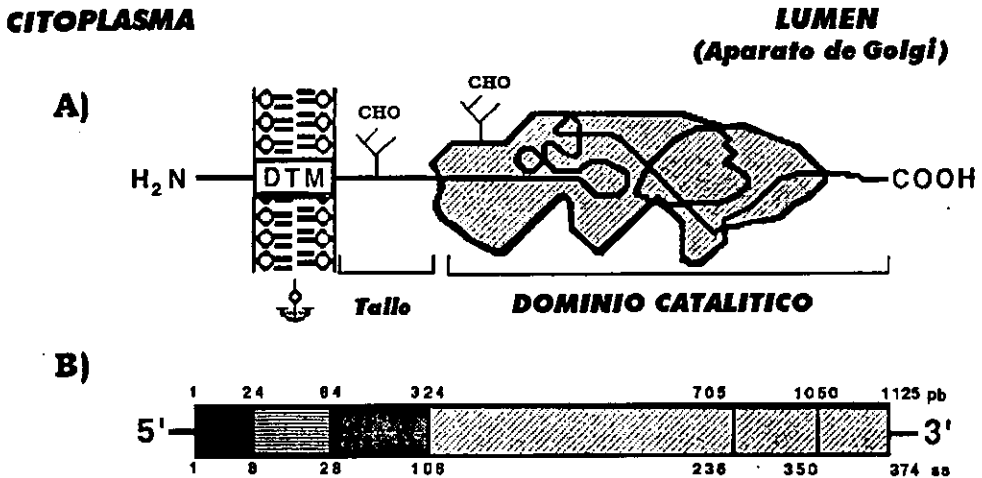


Fig. 8. Representación esquemática de la enzima Gal B1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa (2,3 STasa). A) Dominios estructurales de la enzima y su probable distribución topológica con respecto a la membrana del Aparato de Golgi: el dominio transmembranal (DTM, que le sirve como anclaje) está unido al dominio catalítico por un tallo que puede ser cortado enzimáticamente; Y=sitios de N-glicosilación, CHO=oligosacáridos. B) Diagrama de la enzima con base en el modelo propuesto por Kleene R y Berger EG, 1993; con las regiones de los dominios correspondientes: una región de 9 aa en el amino terminal se encuentra en la porción citoplasmática, mientras que el resto de la molécula (~370 aa) encara el lumen del AG.

1. Una región corta del extremo amino terminal hacia el citoplasma (dominio citoplasmático) compuesto de 9 aminoácidos.
2. Dominio de anclaje transmembranal (secuencia hidrofóbica de anclaje) de 17 aminoácidos.
3. Una región "tallo" o llamada región luminal tallo, sensible a proteólisis (Kitazume-Kawaguchi y cols., 1999) de 35 aminoácidos.
4. Un dominio catalítico que se proyecta hacia el lumen del aparato de Golgi y que presenta una longitud variable, (Kleene y Berger, 1993).

Además, se han identificado secuencias homólogas de aminoácidos en la región catalítica de diferentes sialiltransferasas, con grados variables de similitud (Ma J y cols., 1999; Chen y cols., 2000; Kurosawa y cols., 2000), por lo que se ha etiquetado esta región como la región homóloga de sialización (sialil motif) de 48-49 aminoácidos, y ha sido utilizada en la caracterización y el análisis del funcionamiento de otras sialiltransferasas (Gillespie y cols., 1992; Wen y cols., 1992; Livingston y Paulson, 1993). Esta región participa en la unión del CMP-NeuAc a la cadena de oligosacáridos aceptora (Datta y Paulson, 1995). Se han descrito en algunas sialiltransferasas dos regiones de homología, el "L-sialilmotif" y el "S-sialilmotif", esta última participa en la interacción tanto con el donador como del aceptor, lo cual ha generado subgrupos de esta familia de enzimas aisladas de diferentes especies y tejidos (Datta y cols., 1998; Kurosawa y cols., 2000).

Hasta 1987 solamente se había aislado la Gal β 1,4GlcNAc α 2,6-sialiltransferasa (ST6N) (Weinstein y cols., 1987). La siguiente fue la Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialiltransferasa (ST3O) en 1992, que es responsable de la síntesis de la secuencia: SA α 2,3 Gal β 1,3GalNAc- encontrada en oligosacáridos O-ligados y también como secuencia terminal de ciertos ganglósidos. Se observó que esta enzima presenta dos formas, una de 47-49 KDa y otra de 45 KDa (Gillespie y cols., 1992). En ambas enzimas encontradas en el hígado de la rata se observa una región de homología de 45 aa con 65% de identidad (Wen y cols., 1992).

A finales de 1992 se detectó en el hígado y la placenta humanas, actividad de la CMP-NeuAc: Gal β 1,4 GlcNAc-R α 2,3-sialiltransferasa (2,3-STasa) y de la Gal β 1,4 GlcNAc-R α 2,6-sialiltransferasa (2,6-STasa), donde se apreció como actividad predominante en el hígado de la 2,3-STasa, mientras que en la placenta la mayor actividad la presentó la 2,6-STasa (Nemansky y cols., 1992). Posteriormente se aisló el ADNc de la Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa en hígado de rata (ST3N) (Wen y cols., 1992) y en placenta humana (ST3N, HP-1) (Kitagawa y Paulson, 1993).

Análisis de otros tejidos en desarrollo, como la retina de rata, han revelado cambios en la distribución del ARNm de la 2,6-STasa durante el proceso de desarrollo postnatal de este tejido (Uehara y cols., 1993). Kitagawa y Paulson reportaron la clonación y expresión del ADNc de la Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialiltransferasa humana a partir de tejido placentario, comparando con el ADNc de la 2,3-STasa previamente reportada por ellos mismos. El gene se expresa en niveles bajos en la placenta humana, pero mantiene una expresión abundante en el músculo esquelético y otros tejidos fetales humanos. También reportaron al gene (STZ) que codifica para la sialiltransferasa que

identifica las secuencias Gal β 1,3GalNAc y Gal β 1,4GalNAc aislado a partir de tejido placentario humano (Kitagawa y Paulson, 1993).

Se ha demostrado que la expresión de ST6N analizada en cultivo celular de tirocitos es regulada por tiroxina, sin que ésta afecte la expresión de ST3N (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 la expresión de otras dos glicosiltransferasas, (la β 1,4-galactosiltransferasas 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).

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; Hame 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 Baenzinger, 1993) y posiblemente otras hormonas ováricas como progesterona (Nelson y cols., 1975; Nelson y cols., 1977), las cuales pueden regular a las sialiltransferasas en forma directa por medio de mecanismos de regulación pretranscripcional de las sialiltransferasas (Svensson y col., 1990; Svensson y cols., 1992) o indirectamente.

Los genes de las diferentes sialiltransferasas presentan longitudes variables, y algunas de las estructuras de los axones son significativamente similares; razón por la cual se ha sugerido que estos genes provienen de un ancestro común (Takoshima y Tsuji, 2000). Además se ha observado que en forma semejante a las sialiltransferasas de mamíferos, la enzima viral V-ST3GalI contiene las secuencias homólogas características, es decir el sialil motif L y el S localizadas en su dominio catalítico y que se correlaciona con la ST3Gal IV de mamífero (Sujino y cols., 2000).

PATRONES DE SECRECIÓN DE FSH, LH Y ESTRADIOL DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA.

La rata de laboratorio presenta características reproductivas especiales que han sido ampliamente estudiadas, son mamíferos de ovulaciones espontáneas, no estacionales y presentan estros durante todo el año, además son la única especie cuyo ciclo reproductivo está caracterizado por una fase lútea corta.

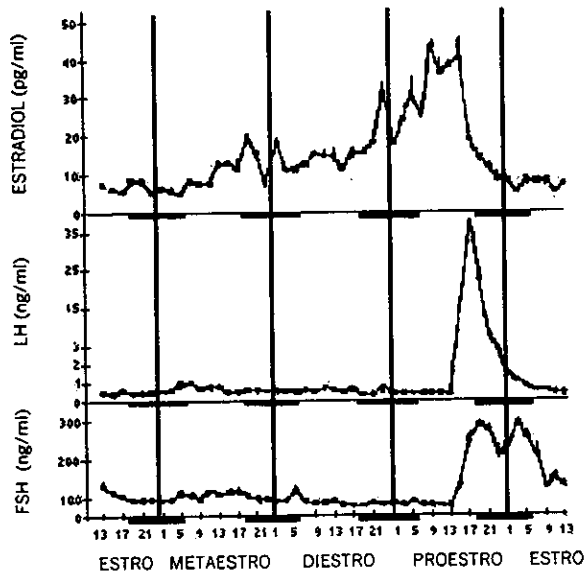


Fig. 9. Concentraciones de estradiol, LH y FSH en plasma obtenido a intervalos de 2 horas a través de cada día del ciclo estral de ratas con ciclos de 4 días. Cada punto representa la concentración hormonal promedio (+ SE) de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad y las líneas punteadas la separación entre cada día del ciclo. (Smith y cols., 1975 Freeman, 1994).

Durante el ciclo estral de la rata, los patrones de secreción de la FSH y la LH son muy similares (fig. 9, Smith y cols., 1975 y Freeman, 1994) y los mecanismos que regulan su síntesis y secreción actúan de manera coordinada.

Las concentraciones de la FSH se mantienen bajas (menores de 150 ng/ml) durante la noche del E, en M, D y hasta el medio día del P, incrementándose por la tarde del P (14:00-15:00), alcanzando sus concentraciones máximas entre las 17:00 y las 19:00 horas para después disminuir.

Durante la madrugada del E se observa un segundo incremento, el cual decrece hacia la tarde de este día (Daane y Parlow, 1971). Ambos incrementos de la secreción de la FSH son regulados por diferentes mecanismos (Freeman, 1994). Un comportamiento muy similar se observa en la LH a excepción de que aquí no se presenta el segundo incremento.

Por otro lado, las concentraciones de estradiol se mantienen bajas en E y M, presentándose un incremento en la noche del D, la máxima concentración se presenta durante la mañana y tarde del P.

EXPRESIÓN DEL ARNm-2,3-STasa DURANTE EL CICLO ESTRAL.

En un estudio preliminar, del análisis de la expresión del ARNm-2,3-STasa por Northern Blot durante el ciclo estral (Damián-Matsumura y cols., 1999), se observó un incremento en la concentración relativa del ARNm de la enzima durante la mañana y parte de la tarde (10:00- 14:00 h) del día del M, disminuyendo significativamente hacia la fase del D, hasta alcanzar los niveles basales en la etapa del P y manteniéndose bajo durante el E, (figura 10a).

El patrón de distribución de las isoformas de la FSH a través del ciclo estral en extractos hipofisarios es muy particular, en la fase del P hay una mayor concentración de isoformas con menos ácido siálico y posteriormente (E, M y D) estas isoformas disminuyen y se elevan las isoformas con más ácido siálico (fig. 10c).

Haciendo una correlación con las concentraciones de estradiol en suero en este mismo período (fig. 10b), se observa que en particular las concentraciones de estradiol están relacionadas con el patrón de distribución de las isoformas de la FSH y con la expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa (ARNm-2,3-STasa).

Los cambios en las concentraciones del ARNm de la 2,3-STasa a través del ciclo estral de la rata, como se observa en la figura 10, tienen una correlación inversa con las concentraciones de estradiol sérico, ya que cuando se encuentran niveles altos de la expresión del ARNm, la concentración de estradiol es baja y se incrementan conforme se disminuye la expresión del ARNm de la enzima. También existe una correlación inversa entre la concentración del ARNm de la enzima y la abundancia relativa de isoformas de la FSH ya que por la mañana de la fase del P se presenta mayor cantidad de isoformas menos ácidas y una expresión relativa baja de ARNm-STasa, aunque en la fase del D se presenta una baja expresión relativa del ARNm de la STasa y una elevada concentración de isoformas más ácidas.

Esto indica que los mecanismos de regulación de la síntesis y liberación de isoformas de la FSH por parte de la hipófisis se encuentran altamente controlados, dando como resultado los patrones de distribución de estas isoformas a través del ciclo estral de la rata. Por otro lado, la aparición de estas isoformas se encuentran a su vez reguladas por varios factores endócrinos como podrían ser los estrógenos y la GnRH, que llevan a la aparición de isoformas muy potentes que presentan una vida media muy corta, simultáneamente con isoformas con poca actividad biológica y vida media más larga.

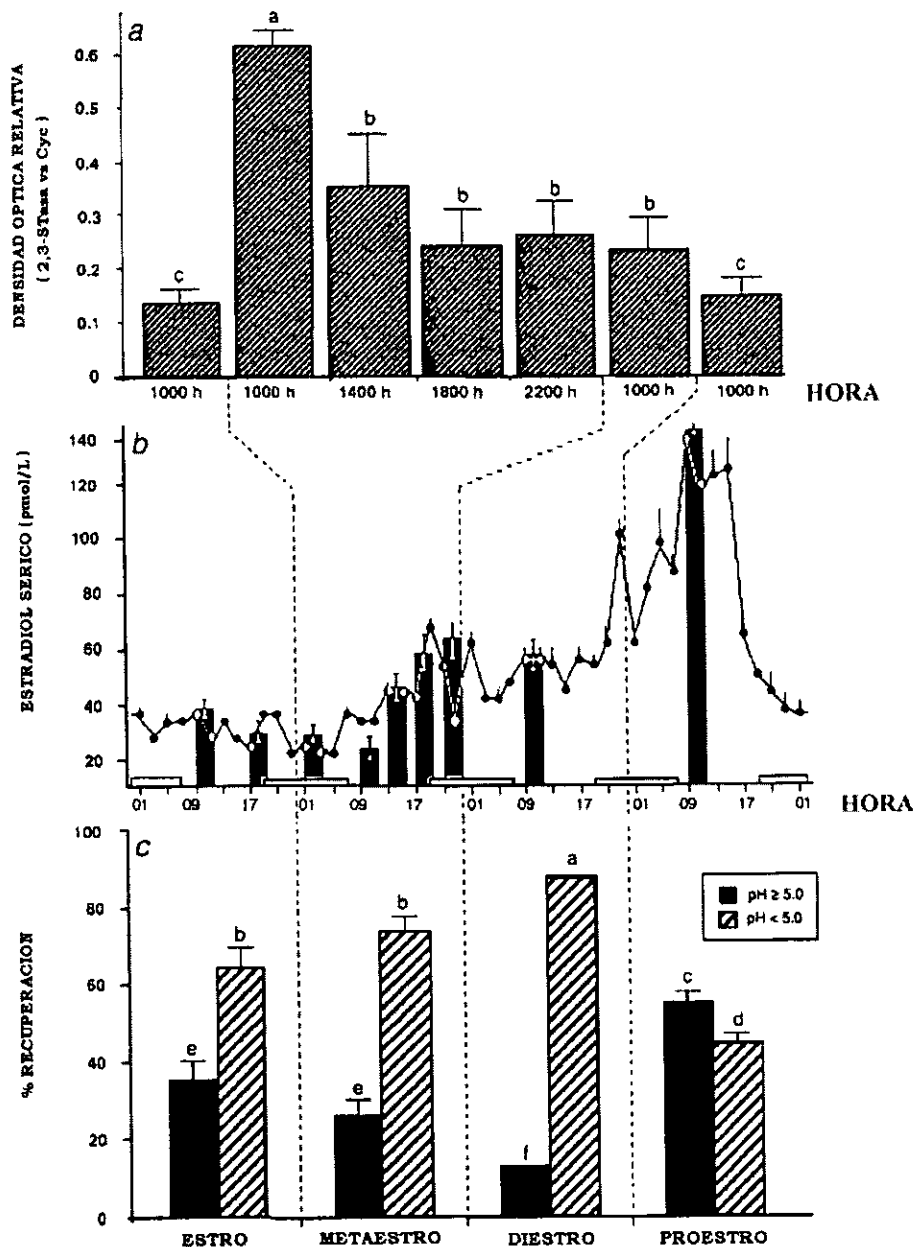


Fig. 10. Expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa comparado con las concentraciones de estradiol y de las isoformas de FSH a través del ciclo estral de la rata. a) Expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa a las 10:00h de los días del D, P, E y M a las 10:00, 14:00, 18:00 y 22:00h. b) Niveles de Estradiol 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 blancas horizontales representan los periodos de oscuridad en que se mantuvo a los animales y las barras negras verticales representan las mediciones realizadas en nuestro laboratorio. c) Distribución de isoformas moleculares de FSH a través del ciclo estral. En barras ralladas se muestran las isoformas más ácidas y las barras sólidas las isoformas menos ácida

HIPÓTESIS.

Si la expresión del ARNm que codifica para la enzima 2,3-STasa en la adenohipófisis de la rata hembra adulta se encuentra regulada por factores endócrinos (principalmente estrógenos), entonces ésta variará en función del estado endócrino del animal y se observará una correlación con las concentraciones de estradiol presentes durante el mismo período.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Corroborar que la expresión del gen que codifica a la enzima 2,3-STasa se encuentra regulada por estrógenos, generando así las diferentes isoformas de la hormona estimulante de los folículos (FSH) en la rata hembra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estandarizar las técnicas de hibridación *in situ* para la detección del ARNm de 2,3-STasa e inmunohistoquímica para la subunidad β FSH en cortes histológicos de hipófisis de ratas hembra.
- 2) Cuantificar, mediante las técnicas de hibridación *in situ* y Northern blot, los cambios en la síntesis del ARNm-2,3-STasa en adenohipófisis de ratas intactas en cada uno de los días del ciclo estral, en animales ovariectomizados, en ratas intactas tratadas con benzoato de estradiol y en animales tratados con el antiestrógeno ICI 182,780.
- 3) Correlacionar los cambios en la síntesis del ARNm-2,3-STasa, en la adenohipófisis de ratas hembra bajo diferentes condiciones fisiológicas y experimentales, con el sitio de la expresión de la FSH (gonadotropo) determinada por inmunohistoquímica.

HIPÓTESIS.

Si la expresión del ARNm que codifica para la enzima 2,3-STasa en la adenohipófisis de la rata hembra adulta se encuentra regulada por factores endócrinos (principalmente estrógenos), entonces ésta variará en función del estado endócrino del animal y se observará una correlación con las concentraciones de estradiol presentes durante el mismo período.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Corroborar que la expresión del gen que codifica a la enzima 2,3-STasa se encuentra regulada por estrógenos, generando así las diferentes isoformas de la hormona estimulante de los folículos (FSH) en la rata hembra.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estandarizar las técnicas de hibridación *in situ* para la detección del ARNm de 2,3-STasa e inmunohistoquímica para la subunidad β FSH en cortes histológicos de hipófisis de ratas hembra.
- 2) Cuantificar, mediante las técnicas de hibridación *in situ* y Northern blot, los cambios en la síntesis del ARNm-2,3-STasa en adenohipófisis de ratas intactas en cada uno de los días del ciclo estral, en animales ovariectomizados, en ratas intactas tratadas con benzoato de estradiol y en animales tratados con el antiestrógeno ICI 182,780.
- 3) Correlacionar los cambios en la síntesis del ARNm-2,3-STasa, en la adenohipófisis de ratas hembra bajo diferentes condiciones fisiológicas y experimentales, con el sitio de la expresión de la FSH (gonadotropo) determinada por inmunohistoquímica.

MATERIAL Y MÉTODOS.

MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES.

Se utilizaron ratas hembra adultas (60 ± 5 días de edad) de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*, del bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, México D. F.), se mantuvieron bajo condiciones de luz controlada (luz de 05:00 a 19:00 h) y alimentación *ad libitum* con agua potable y comida para ratas de laboratorio (Purina Lab Chow, Purina, México) hasta el momento de ser sacrificadas. Se usaron solamente los animales que presentaron al menos 4 ciclos estrales consecutivos de 4 días cada uno, determinado por medio de frotis vaginales diarios. Se hicieron grupos al azar de por lo menos 4 animales para cada grupo.

EXPERIMENTOS.

CICLO ESTRAL (CE).

Ratas adultas con ciclos estrales regulares se sacrificaron a las 10:00 h de los diferentes estadios del ciclo estral: proestro (P), estro (E), metaestro (M) y diestro (D), se obtuvieron las hipófisis de cada rata en forma individual, se lavaron con solución salina, se guardaron en papel aluminio, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70 C hasta el momento de su procesamiento. La sangre obtenida de cada animal se centrifugó a 3000 rpm a 4 C, se separó el suero de cada muestra, y se guardó a -20 C hasta el momento de la cuantificación de rFSH, rLH y estradiol por radioinmunoensayo (RIA).

RATAS OVARIECTOMIZADAS (OVX).

Grupos de ratas con ciclos regulares se ovariectomizaron bilateralmente por incisión abdominal, bajo anestesia de Ketamina/Rompun (50 y 6.7 mg/kg de peso corporal respectivamente; Ketalin®, Laboratorios Galén, México y Rompun, Bayer de México,) en el día del proestro entre las 9:00 y las 10:00 h (Tapper y cols., 1972) y se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo: 7, 14, 21 y 28 días post-castración; debido a que en experimentos previos se demostró que la operación simulada ("sham") no tiene ningún efecto en la expresión del ARNm de la enzima 2,3STasa, ya no se incluyó en este protocolo. Las hipófisis se almacenaron a -70 C en forma individual. Se tomaron muestras de sangre de cada uno de los animales sacrificados y los sueros se almacenaron a -20 C para la determinación de hormonas por RIA.

ANIMALES OVX (28 d) + BE.

A los 28 días después de ser ovariectomizadas, las ratas fueron inyectadas con una dosis única de 10 µg de benzoato de estradiol (BE; Sigma Co), en 100 µl de aceite de maíz comercial (Mazola®), en tanto el grupo control solo recibió el vehículo (Vh). Ambos grupos se sacrificaron 24 horas después del tratamiento, las hipófisis y los sueros se manejaron de la manera antes descrita.

ANIMALES INTACTOS (D) + ICI

Grupos de animales intactos fueron inyectados a las 10:00 h del día del M con 2 mg/kg de peso corporal del antagonista del receptor de estrógenos ICI 182,780 (ICI; Zeneca Farma, México), en 100 µl de propilén glicol usado como vehículo. Los animales se sacrificaron 24 horas después y las hipófisis y sueros se procesaron en la forma antes mencionada.

ANIMALES INTACTOS (M) + BE.

El grupo de ratas intactas se trataron con 10 µg de BE en 100 µl de aceite de maíz a las 10:00 h del día del E. Los animales se sacrificaron 24 horas después, las hipófisis y los sueros se almacenaron en la forma descrita.

SÍNTESIS DE LAS SONDAS DE 2,3-STasa y CICLOFILINA (Cyc).

EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE CEREBRO E HIPÓFISIS DE RATA HEMBRA.

El ARN total fue extraído del lóbulo anterior del cerebro o de la hipófisis de ratas hembra adultas, mediante la técnica reportada por Chomcynski y Sacchi en 1987, se homogenizaron 100 mg de tejido con 1 ml de TRIZol™ (Gibco BRL Gaithersburg, MD, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El ARN se resuspendió en 20 µl de agua con dietil etil pirocarbonato (H₂O-DEPC) se cuantificó la concentración de cada muestra por espectrofotometría a 260 nm (Beckman DU®650) y se determinó la pureza por medio del cociente 260/280 nm, considerándose puras cuando la relación fue mayor de 1.8. Las muestras se guardaron a -20 C hasta el momento en que se realizó la electroforesis para visualizar la integridad de los ARN.

RT-PCR.

La sonda usada para el análisis de la expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa, se sintetizó mediante las técnicas de retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se empleó el ARN total de cerebro de rata. Con base en la estructura primaria del ADNc previamente reportado (Wen y cols., 1992) se sintetizaron dos oligonucleótidos de 20 bases cada uno (Gibco BRL, MD), cuyas secuencias se determinaron mediante el programa computacional 'Oligos' versión 4.0 de Wojciech Richlijk, donde se toma en cuenta la temperatura de hibridación óptima, una adecuada relación de bases GC/AT, y además se evita que se formen enlaces inter e intracatenarios.

Las secuencias de los oligonucleótidos son:

1. oligonucleótido superior o sentido (2,3-STasa-S)

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

Posiciones 704 al 723.

2. oligonucleótido inferior o antisentido (2,3-STasa-A)

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

Posiciones 1050 al 1035.

Por otra parte, se utilizó el ADNc de ciclofilina (Cyc) de rata como sonda de normalización (Danielson y cols., 1988) para demostrar que las muestras usadas para la hibridación por Northern blot contienen la misma cantidad de ARN o, dado el caso, hacer el ajuste de la concentración correspondiente. Al igual que la sonda de ADNc-2,3-STasa, la síntesis de ADNc- Cyc se realizó por medio de RT-PCR a partir del mismo ARN total de cerebro de rata hembra, empleándose el estuche de amplificación "Gene Amp® RNA kit" (Perkin Elmer, CA).

Para la RT se empleó 1µg de ARN total y se incubó con 1mM de cada uno de los dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 5mM de MgCl₂, 2.5µM de oligo d(T)₁₆, 1U del inhibidor de RNasas, 2.5U de la retrotranscriptasa MuLV y 2µl de 10X PCR buffer II, se ajustó hasta un volumen final de 20µl. La incubación de la muestra para RT se realizó a temperatura ambiente por 60 minutos, seguido de una incubación a 42 C por 20 minutos, 5 minutos a 99 C y 5 minutos a 5 C, se usó un termociclador Perkin Elmer modelo 9600.

Inmediatamente después de la RT, se adicionaron 80µl de la mezcla que contenía 2.5U de AmpliTaq®DNA polimerasa, 15mM de cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido), 2mM MgCl₂ y 8µl 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 dos

temperaturas (95 C por 30 segundos y 60 C por 30 segundos) y un segmento final de elongación de 7 minutos a 72 C.

La purificación de los productos de RT-PCR se realizó mediante un gel de agarosa al 1.2%, donde se depositaron los productos de RT-PCR para separarlos por electroforesis, se cortaron los fragmentos de gel que contenía al ADN de interés según su peso molecular y se purificaron mediante columnas de exclusión molecular (Gleen TC y Gleen SJ, 1994). El ADN se precipitó con etanol absoluto, se secó por aspiración con vacío y se resuspendió la pastilla en la solución TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Se determinó la concentración y pureza por el método espectrofotométrico y se visualizó en un gel de agarosa.

Las secuencias de los ADNc's se determinaron empleando el estuche de secuenciación "AmpliTaQ® Sequencing kit" (Perkin Elmer, CA) que emplea el método enzimático (Sanger y cols., 1977).

HIBRIDACIÓN POR LA TÉCNICA DE NORTHERN BLOT.

SEPARACIÓN DE ARN EN GELES DE AGAROSA.

Los ARN's obtenidos de hipófisis se separaron en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes (6% de formaldehído, Sigma) usando MOPS como solución amortiguadora.

Se usaron 15µg de ARN total de cada muestra, ajustando los volúmenes a 10µl con H₂O_{dd}-DEPC. El estándar de peso molecular (escalera de ARN de 1.24 a 9.4 Kb; Gibco BRL) se manejó igual que las muestras empleando 3µg por gel. Se le adicionó a cada muestra 20µl de la solución desnaturizante FMF (50% formamida, 1X MOPS, 6.5% formaldehído), se calentaron a 75 C por 5 minutos en un termoblock (Boekel Industries Inc. Modelo 110003, USA), se enfriaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron brevemente. Finalmente se les adicionó a cada muestra 3µl de la solución de carga para ARN ("loading buffer": 30% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y 0.1% xilencianol) y 0.3µl de una solución de bromuro de etidio (2.5mg/ml). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 150 V por 2.5 horas.

TRANSFERENCIA POR CAPILARIDAD (BLOTTING).

Transcurrido el tiempo de la electroforesis, se observó el gel en el transiluminador con la finalidad de visualizar la integridad del ARN, se montó el dispositivo para la transferencia y se dejó transfiriendo por capilaridad toda la noche con 10X SSC (SSC: 15mM de citrato de sodio, 150mM de NaCl).

Se fijó el ARN a la membrana por entrecruzamiento con luz ultravioleta (UV-crosslink, Stratagene, CA). Se guardó la membrana a temperatura ambiente en una bolsa de plástico sellada con calor para ser hibridada posteriormente con las sondas de ADNc-STasa y Cyc.

PREHIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA DE NYLON.

Se usó el protocolo estandar descrito por el fabricante de la membrana de Nylon Zeta-Probe GT[®]. Para cubrir homogéneamente la superficie de la membrana y bloquear las uniones inespecíficas, se empleó una solución de prehibridación (0.25M Na₂HPO₄, pH 7.2, y 7 % SDS). Se incubó a 65 C en incubador metabólico Dubnoff (Precision, USA) con agitación constante (140 rpm) por un mínimo de 3 horas.

MARCAJE DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR (2,3-STasa-³²P y Cyc-³²P).

Se empleó el protocolo de marcaje al azar ("RadPrime DNA Labeling System[®]", Gibco BRL, USA) usando 100ng del ADNc a marcar. La muestra se desnaturalizó previamente a 95 C por 5 minutos y se mezcló con 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 [125mM Tris-acetato, pH 6.8, 2.5mM

Acetato de magnesio, 25mM 2-mercaptoetanol, 50µg/ml

cebadores oligodesoxirribonucleótidos (octámeros al azar)].

5 µl de [³²P]-dCTP.

1 µl del fragmento de Klenow [4 U/µl].

Se incubó a 37 C por lo menos 1 hora. Al finalizar el periodo de incubación se agregaron 5µl de la solución para detener la reacción (Stop buffer; 0.2M EDTA, pH 7.5).

Con la finalidad de purificar las sondas de ADN de los nucleótidos no incorporados se empleó una cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Sephadex[®] G-50 super fino, (Pharmacia LKB Biotechnology) en STE (100mM de Tris-HCl, 1mM EDTA, 100 mM NaCl).

La muestra purificada se denaturalizó a 95 C por 5 minutos y se mantuvo en hielo hasta el momento de la hibridación.

HIBRIDACIÓN.

Se hibridó con la solución de hibridación (0.25M Na₂HPO₄, pH 7.2, y 7 % SDS) a 65 C con agitación constante toda la noche.

Posteriormente se lavó la membrana a temperatura ambiente por 20 minutos, 2 veces con la solución de lavado (40mM Na₂HPO₄, pH 7.2, 5 % SDS) y se secó el exceso de solución de la membrana, se colocó en una bolsa y se selló. Se puso en un cassette para autorradiografía junto con una o dos placas de autorradiografía X-OMAT-AR (Eastman Kodak) el tiempo necesario en función de la intensidad de la señal y se revelaron las placas.

ANÁLISIS DEL ARNm POR HIBRIDACIÓN *in situ* (HIS).

TRATAMIENTO DE PORTAOBJETOS.

Portaobjetos nuevos fueron lavados con H₂O-DEPC (0.1%) en agitación por 10 minutos, se colocaron en rejillas y se hornearon a 200 C para secarse. Se recubrieron con una solución de γ -metacriloxi propil trimetoxisilano (Sigma, Co) al 2% en acetona por 2 horas. Posteriormente se eliminó el exceso, se secaron a 200 C y se guardaron a temperatura ambiente en un lugar seco y libre de polvo hasta el momento de su uso.

PREPARACIÓN DE LA SONDA PARA HIS.

La amplificación de la sonda de 2,3-STasa usada para hibridación *in situ* se realizó por RT-PCR de igual manera y bajo las mismas condiciones que la usada para el análisis por Northern blot. Para el marcaje de la sonda se empleó digoxigenina (DIG) mediante un estuche comercial (DIG-HighPrime Boheringer Mannheim, ROCHE). Se usó 1 μ g de ADN que fue previamente desnaturalizado a 95 C por 10 minutos, se incubó por 20 horas a 37 C y la reacción se detuvo agregando 2 μ l de EDTA 0.2M pH 8.0. La sonda marcada se purificó por precipitación con etanol y se resuspendió en 50 μ l de TE.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Después de extraer las hipófisis se lavaron con solución salina, se congelaron a -20 C y se montaron en la platina con medio de inclusión (Tissue-tek®, Sakura). Las hipófisis se cortaron en un criostato (Leica CM 1850) a una temperatura de -20 C , con un espesor de $5\mu\text{m}$. Los portaobjetos con las muestras se sumergieron por unos minutos en etanol absoluto y se guardaron a 4 C hasta el momento de ser procesados.

Antes de la hibridación se dejó que los tejidos llegaran a temperatura ambiente, se rehidrataron, se desproteinizaron con 0.1N HCl por 5 minutos y se lavaron con $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ por 10 minutos a temperatura ambiente. La prehibridación se realizó por 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda, con la solución de hibridación (50% Formamida, 4X SSC, 1X Denhard's, 5mg DNA sperm, 10% dextran de sulfato).

Transcurrido el tiempo de prehibridación se quitó el exceso de la solución y se agregó la solución de hibridación con 0.6mg/ml de la sonda 2,3-STasa-DIG, previamente desnaturalizada a 95 C por 10 minutos, incubándose en cámara húmeda a 37 C toda la noche.

Para eliminar el exceso de sonda que no hibridó se hicieron los siguientes lavados: 2x SSC 15 minutos a temperatura ambiente con agitación, 1x SSC 15 minutos con agitación, 0.5x SSC 15 minutos a 37 C con agitación y 0.5x SSC 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente se lavó 1 minuto con la solución 1 (100mM Tris-HCl , 150mM NaCl) a temperatura ambiente, se incubó con 2% BSA- 0.3% Tritón X-100 a temperatura ambiente por 30 minutos; se quitó el exceso de la solución y se agregó el anticuerpo anti-DIG (1:1000), el cual se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con la solución 1 por 10 minutos con agitación orbital a temperatura ambiente y 10 minutos con la solución 2 (100mM Tris-HCl , 100mM NaCl , 50mM MgCl_2 ; pH 9.5). Se aplicó el cromógeno (NBT [NitroBlueTetrazolium]/BCIP [Bromo-Chloro-indolyl-Phosphate]) en cámara húmeda en ausencia de luz hasta que se desarrolló el color. Se lavó con la solución 3 (10mM Tris-HCl , 1mM EDTA , pH 8.0) por 10 minutos a temperatura ambiente para detener la reacción y finalmente se tñieron los núcleos por 5 minutos con Rojo Rápido Nuclear para contrastar. Se pusieron los cubreobjetos y se realizó el análisis al microscopio, contándose por campos las células marcadas positivamente e identificándose el sitio en el corte de la hipófisis.

INMUNOHISTOQUÍMICA PARA β -FSH.

Cortes adyacentes a los usados para hibridación *in situ* se trataron con 0.3 % H_2O_2 en metanol por 30 minutos con la finalidad de inactivar las peroxidasas endogenas. Se lavaron con PBS, se incubaron por 30 minutos con la solución de bloqueo (0.1M Tris-HCl, 0.1% BSA y 0.1M Tween 20), se quitó el exceso y se adicionó el primer anticuerpo anti- β FSH 1:500 (anti rata inducido en cobayo, NIADDK, Bethesda MD, USA), y se incubó toda la noche en cámara húmeda a 37 C.

Al día siguiente se eliminó el exceso del anticuerpo lavando con PBS, se quitó el exceso con gasa, se adicionó el segundo anticuerpo 1:50 (anticobayo inducido en conejo-peroxidasa conjugada; Boheringer Mannheim, Roche) y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 1h. El segundo anticuerpo se removió lavando con PBS, se secó y se agregó la solución 1X DAB (DAB Substrate; Boheringer Mannheim, Roche) y se incubó en cámara húmeda por 10 minutos. Se detuvo la reacción lavando con H_2O_{dd} los núcleos se tiñieron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron con etanol absoluto y finalmente con xilol; se secó con gasa, se montó y se realizó el análisis al microscopio, se usaron portaobjetos adyacente a los que se utilizaron para la hibridación *in situ*; en ambos portaobjetos se localizó la misma región en un analizador de imágenes, ambas imágenes se empalmaron y se contaron manualmente solo las células identificadas como gonadotropos por medio de inmunohistoquímica y que presentaron síntesis de ARNm de la 2,3-STasa detectada por hibridación *in situ*.

RADIOINMUNOENSAYOS.

El radioinmunoensayo (RIA) se realizó con los estuches proporcionados por el programa nacional de adenohipófisis (National Pituitary Program, Bethesda MD, USA), según lo descrito (Ulloa-Aguirre y cols., 1988a), utilizando rFSH-RP-2 (NIADDK) para construir las curvas estándar (los resultados se expresaron en ng/ml de FSH-RP-2) y anti-rFSH (conejo vs. Rata NIADDK-A-RAT-FSH 11) como anticuerpos policlonal a una dilución de trabajo 1: 30,000. El extracto purificado de rFSH (rFSH-I-8, NIADDK, Bethesda MD, USA) fue radiomarcado con I^{125} -Na por el método de la Cloramina T. Para evitar variaciones interensayo, se analizaron todas las muestras de cada experimento en una misma determinación.

Para la cuantificación de LH se radiomarcó la preparación LH-I-6 para ser usado como ligando marcado, la preparación de referencia empleada para la elaboración de la curva estándar fue rLH-RP2 y el antisuero policlonal anti-rLH (conejo vs. rata; NIADDK-A-RAT LHS-8) la dilución

final de trabajo fue de 1:40,000. La determinación de las concentraciones de FSH y LH de rata se realizó en alícuotas de 100 μ l del suero obtenido de la sangre de cada animal, por duplicado y repitiendo la determinación de las muestras cuyo coeficiente de variación fue mayor del 25%.

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.

ANÁLISIS DE DATOS.

Las autorradiografías obtenidas de la cuantificación de los ARNm para la 2,3-STasa y Cyc se sometieron a un análisis densitométrico semicuantitativo en un sistema de análisis de imágenes "Eagle Eye II" (Stratagene, La Jolla, CA); los resultados se expresaron 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 la sonda de 2,3-STasa, 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.

Los portaobjetos se evaluaron para ver los cambios cuantitativos, esta evaluación fue realizada usando un fotomicroscopio Leica, colocándose tanto el portaobjetos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en la platina del microscopio. En ambas preparaciones se localizaron regiones análogas, utilizándose los límites entre la adenohipófisis, neurohipófisi, bordes y los vasos sanguíneos principalmente; una vez localizada una región en común en ambas preparaciones se procedió a determinar las señales positivas para 2,3-STasa por hibridación *in situ* y se correlacionaron con las células positivas para β -FSH por inmunohistoquímica. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico, para determinar la significancia estadística entre grupos se utilizó el análisis de varianza de una vía.

RESULTADOS.

EXTRACCIÓN DE ARN total.

Con la finalidad de determinar la integridad y homogeneidad en las concentraciones del ARN total, se procedió a separar 5µg de cada muestra en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes. Como se observa en la figura 11 se consideró que el ARN se encuentra en buen estado cuando aparecen las bandas de los ARN ribosomales (28S y 18S).

Una vez que se corroboró la integridad de los ARN, éstos fueron usados para la síntesis de las sondas (ARNm de cerebro) o para el análisis por Northern blot (ARNm de hipófisis)

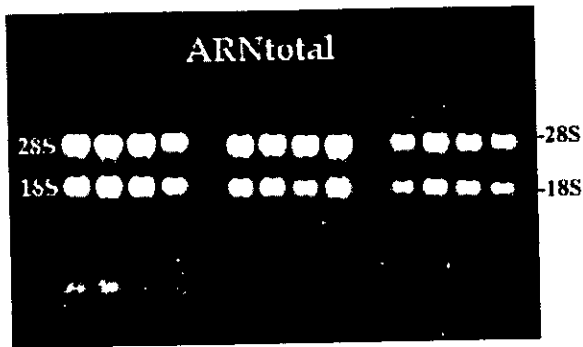


Fig. 11. ARN total separado electroforéticamente en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes en donde se pueden apreciar las 2 bandas de ARN ribosomal; 28S banda superior y 18S banda inferior.

SÍNTESIS DE LAS SONDAS 2,3-STasa y Cyc.

Para la síntesis de la sonda 2,3-STasa se usaron los oligonucleótidos de 20 pb diseñados para tal efecto (previamente descritos en material y métodos), mediante la técnica de RT-PCR y el producto resultante se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (figura 12A), se purificó por columnas de exclusión molecular y por precipitación en etanol. Para verificar su pureza e integridad se separó en geles de agarosa al 1%, figura 12B, y se marcó la sonda con digoxigenina (DIG) para hibridación *in situ* o con ^{32}P para el análisis por Northern blot.

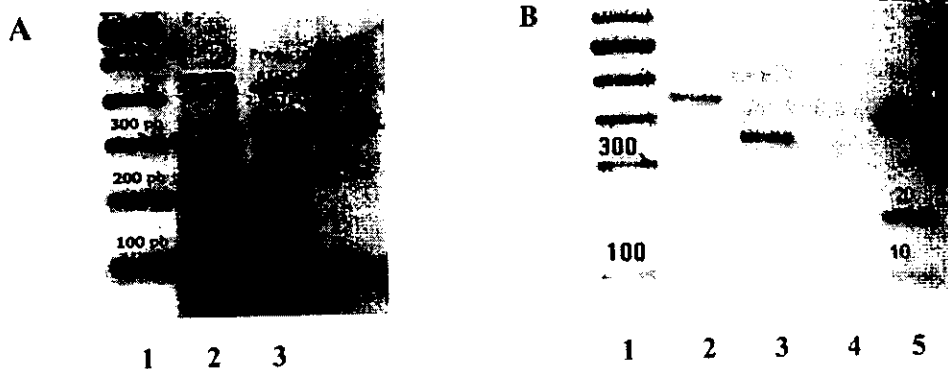


Fig 12. Separación electroforética de los productos de RT-PCR de las sondas de STasa de 346 pb y Cyc de 453 pb. A) Gel de agarosa preparativo, teñido con bromuro de etidio, para su posterior purificación por precipitación etanólica. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, en carril 2 ADNc de Cyc, carril 3 ADNc de STasa. B) En gel de agarosa al 1% después de ser purificadas, en carril 1 marcador 100 pb, carril 2 ADNc de Cyc, carril 3 ADNc de STasa y carril 5 Marcador de peso molecular y masa de ADN.

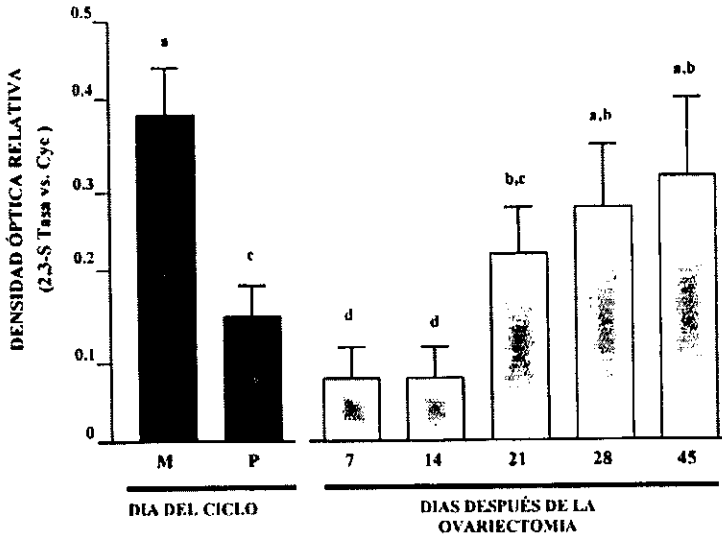
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE 2,3-STasa POR NORTHERN BLOT.

EXPRESIÓN DEL ARNm-2,3-STasa EN RATAS OVX.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos de la expresión del ARNm de la 2,3-STasa en ratas ovariectomizadas (OVX) y sacrificadas a diferentes tiempos (7, 14, 21, 28 y 45 días). Con el fin de obtener una comparación directa se incluyeron en las gráficas la fase del ciclo en la cual se encuentra una mayor expresión de la enzima, (M 10:00h) y en la cual se llevó a cabo la ovariectomía (P 10:00h). En la figura 13 se observa que la expresión del ARNm-2,3-STasa en AH de ratas OVX no excede la expresión del ARNm de la enzima observada en la fase del M en ratas intactas, ya que estadísticamente no hay diferencias significativas entre la expresión del ARNm de la enzima en ratas sacrificadas después de 28 y 45 días post-OVX con respecto a las sacrificadas en la fase del M; en tanto que su expresión es mayor en ratas sacrificadas en P que los valores encontrados en ratas sacrificadas a los 7 días e incluso a los 14 días post-OVX, con una diferencia significativa a los 21 días y valores máximos a los 28 días después de la ovariectomía, mientras que después de 45 días el incremento no es significativo con respecto a los 21 y 28 días de castración; sin embargo estos valores máximos encontrados fueron en promedio menores que los encontrados en la mañana de la fase del M.

El hecho de que en ratas OVX después de 7 y 14 días no se presente el incremento esperado en la expresión del ARNm de la STasa indica que aparte del estradiol, probablemente hay otros factores de origen ovárico como pudieran ser progesterona, activina, folistatina e inhibina que se encuentren regulando dicha expresión.

A)



B)

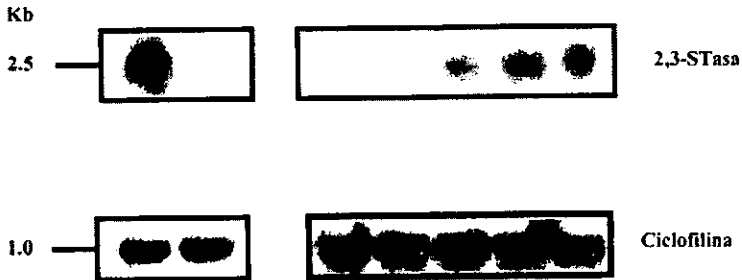


Fig. 13 A) Expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa intrahipofisiaria de ratas ovariectomizadas y sacrificadas a diferentes tiempos post-ovarectomía 7, 14, 21, 28 y 45 días. Los resultados muestran la relación entre la expresión del ARNm-2,3-STasa y la sonda de normalización de Cyc. Diferencias significativas entre grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridó con la sonda 2,3-STasa.

OVARIECTOMIZADAS + BE.

Con el fin de determinar la influencia del estradiol sobre la expresión del ARNm-STasa en la adenohipófisis de rata hembra castradas por 28 días, se les inyectó benzoato de estradiol (BE) intraperitoneal. Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa que hay un decremento del 60% en las concentraciones del ARNm en las hipófisis de ratas tratadas con BE en comparación con los animales tratados con el vehículo (Vh) o sea que el benzoato de estradiol contrarresta el incremento de la expresión del ARNm-STasa observada en los animales castrados por 28 días y a los que se les administro el Vh.

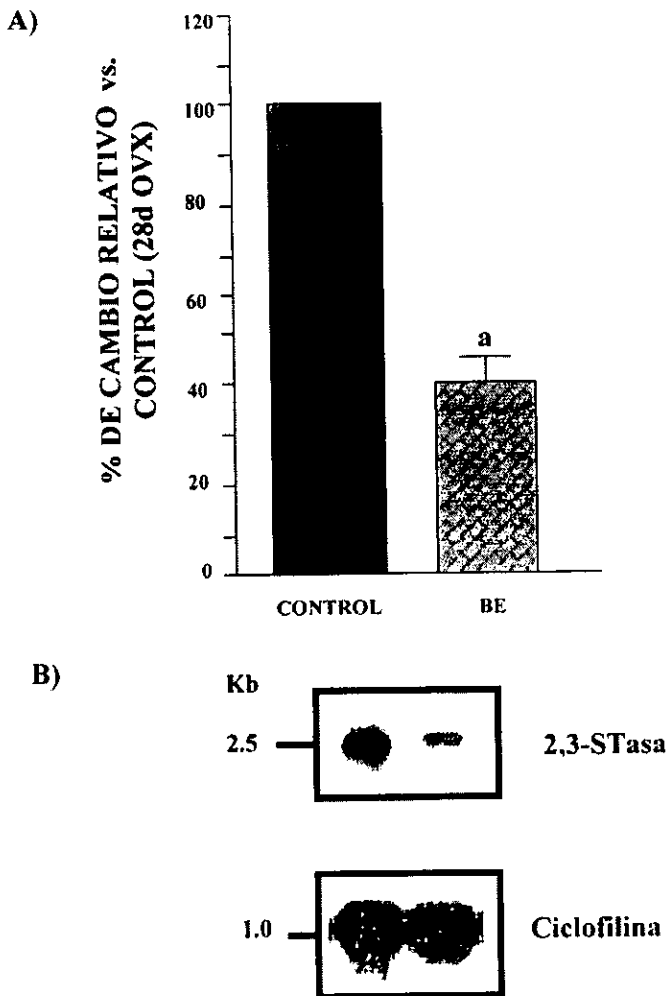


Fig. 14 Influencia del estrógeno en la expresión del ARNm de la 2,3-STasa en la rata ovariectomizada por 28 días e inyectadas con aceite de malz (control) o BE (10µg/Kg de peso) y sacrificadas 24 horas después. A) Los resultados se expresan con relación a la concentración promedio del ARNm de 2,3-STasa de hipófisis de ratas tratadas con Vh (máximo incremento), que constituye el 100%. Las diferencias entre grupos se denota con un asterisco, $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridó con la sonda 2,3-STasa

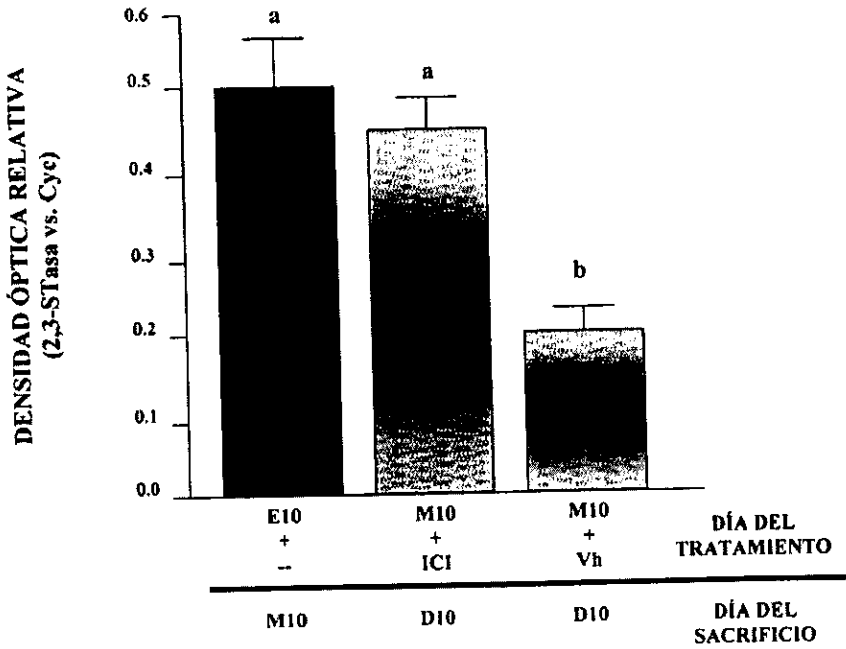
INTACTAS + ICI (antiestrógeno ICI 182,780).

Animales en el día del M, fase del ciclo en el que la expresión del ARNm de la enzima se encuentra más elevada, fueron inyectados con el antiestrógeno puro ICI 182,780 para inhibir la actividad fisiológica del estrógeno endógeno. Los resultados se muestran en la figura 15, en donde se observa que en la hipófisis de animales tratados con ICI y sacrificados 24 horas después se presenta un incremento en las concentraciones del ARNm-STasa en comparación con los que se les inyectó el Vh (propilén glicol), lo cual indica que se está revirtiendo el efecto inhibitorio de los estrógenos endógenos sobre la expresión del ARNm de la enzima.

INTACTAS + BE.

A ratas que se encontraban en el día del E, se les inyectó benzoato de estradiol o aceite de maíz (Vh) y se sacrificaron 24 horas después (en la mañana del M), observándose una disminución significativa en las concentraciones del ARNm-2,3-STasa con respecto a los animales control, cuya expresión es semejante a la expresión en animales sacrificados en la mañana del M (figura 16A). En esta figura se muestran las concentraciones del ARNm durante la mañana del ciclo estral y los animales tratados con benzoato de estradiol y Vh en el día del E, en el cual se expresa el porcentaje de cambio con respecto al promedio de la concentración en la fase del E (la cual representa el 100%). En este caso, el benzoato de estradiol bloqueó la expresión del ARNm de la enzima STasa en la adenohipófisis de ratas hembra justo en la fase en la que la expresión de la enzima se incrementa en condiciones fisiológicas (M+Vh). Por otro lado la expresión del ARNm de la enzima tuvo un comportamiento semejante al observado en los animales castrados y tratados con benzoato de estradiol en los cuales también se bloqueó la expresión a consecuencia de la inyección del benzoato de estradiol.

A)



B)

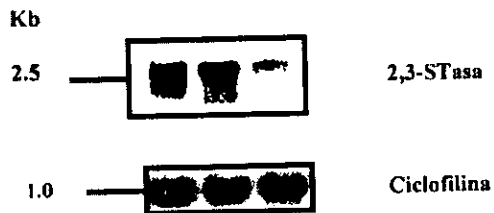
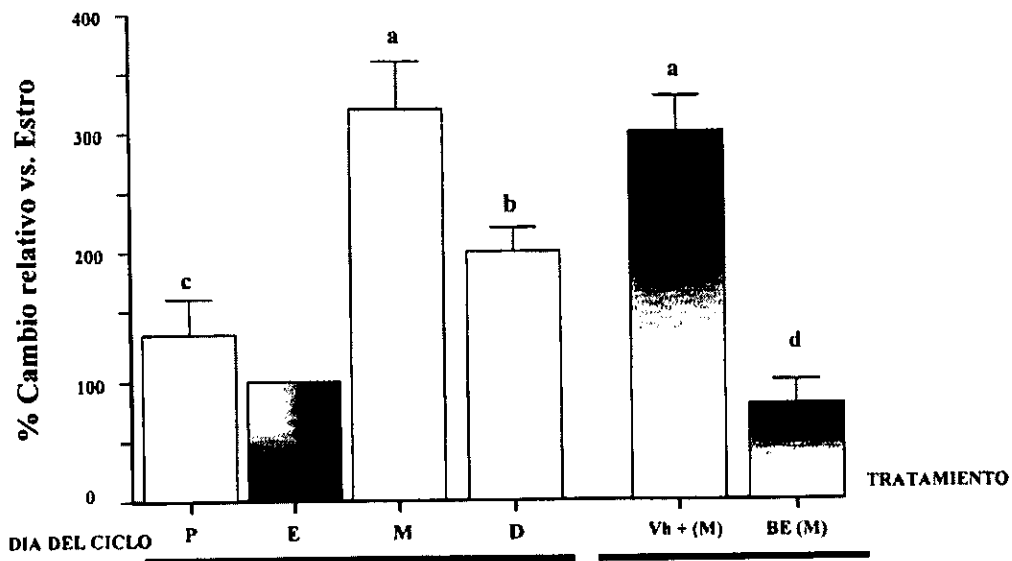


Fig. 15 A) Efecto del antiestrogeno ICI sobre la expresión del ARNm-STasa en ratas intactas. Inyección de propilén glicol (Vh) o de 2 mg de ICI 182,780/Kg de peso corporal (ICI) a ratas en el día del M a las 10:00 h y sacrificadas 24 h después. Las diferencias significativas entre grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridó con la sonda 2,3-STasa.

A)



B)



Fig. 16 A) Efecto del estradiol sobre la expresión del ARNm de la 2,3-STasa en ratas adultas. Inyección aplicada en la mañana del E de BE o Vh y sacrificadas 24 h después. Los resultados se expresan en relación a la concentración promedio del ARNm-2,3-STasa durante el E (expresión baja del ARNm-2,3-STasa), la cual constituye el 100%. Las diferencias significativas entre grupos se denotan con distintas letras. B) Autorradiografía representativa de un experimento donde se hibridó con la sonda 2,3-STasa.

EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA 2,3-STasa POR ANÁLISIS POR

Hibridación *in situ*.

Con la finalidad de demostrar que la expresión del ARNm-2,3-STasa detectada por Northern blot se realiza principalmente en los gonadotropos se llevó a cabo el análisis por hibridación *in situ* en cortes de hipófisis de ratas hembra en las diferentes condiciones y con los diferentes tratamientos, siguiendo la lógica utilizada en el análisis de la expresión por Northern blot. Todos los resultados obtenidos por Hibridación *in situ* fueron relacionados con los obtenidos por inmunohistoquímica, en la cual se buscaba localizar a los gonadotropos sinterizadores de la FSH y que expresaron al ARNm-STasa.

CICLO ESTRAL.

Las concentraciones del ARNm de 2,3-STasa obtenidos por hibridación *in situ* en este grupo de animales coincide con los resultados obtenidos por Northern blot, previamente reportados (Damián-Matsumura y cols., 1999), en donde se observa que la mayor expresión del ARNm de la enzima en gonadotropos de hipófisis de ratas es en la mañana del M (10:00h) y posteriormente la expresión de la enzima disminuye progresivamente en D, P y E (fig. 17). En la figura 18, se muestra por HIS la expresión del ARNm de la enzima en los gonadotropos en hipófisis de rata a través del ciclo estral; (fig. 18A) ratas en P, (fig. 18B) en E, (fig. 18C) en M y (fig. 18D) en D, observándose la mayor expresión del ARNm de 2,3-STasa en la mañana del M (la localización positiva se encuentra señalada con flechas).

Cortes adyacentes a los usados para Hibridación *in situ* fueron usados para inmunohistoquímica, en donde se realizó la inmunolocalización de gonadotropos con el anticuerpo contra la subunidad β -FSH, esto se hizo con el fin de correlacionar la expresión de la enzima con los gonadotropos positivos para la subunidad β -FSH.

En la figura 19A se muestra un corte de hipófisis de rata sacrificada en la mañana del M y que fué utilizado como control negativo para Hibridación *in situ*, y un corte de hipófisis de rata sacrificada en la mañana del P en el cual se realizó la inmunolocalización por Inmunohistoquímica de los gonadotropos positivos a la subunidad β -FSH (19B), en este caso la señal se observa en color marrón y se indica por medio de flechas.

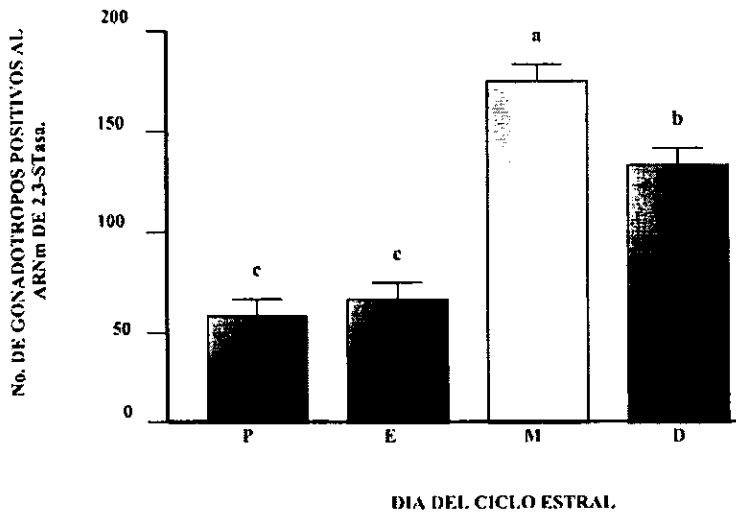


Fig. 17 Número de gonadotropos positivos al ARNm de la 2,3-STasa e inmunoreactivos al antisuero anti- β FSH (promedio \pm D.E. 3 animales por grupo y 10 cortes por hipófisis). Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

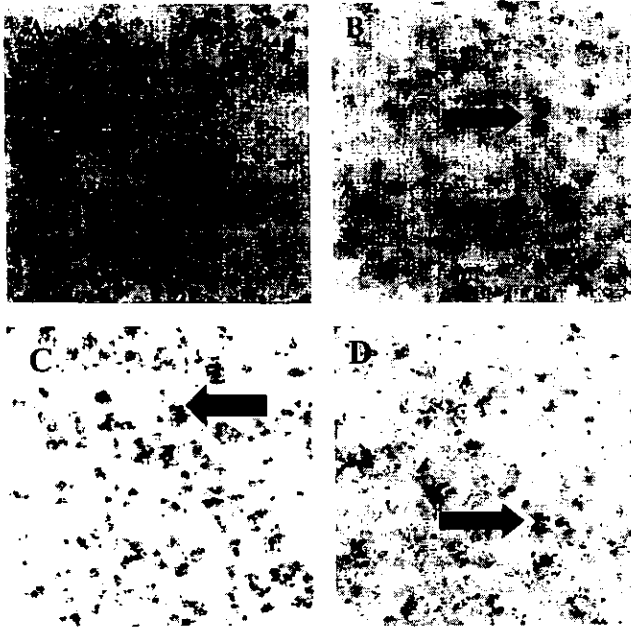


Fig. 18 Hibridación *in situ* de hipófisis de ratas adultas intactas sacrificadas en la mañana del P (A), E (B), M (C) y D (D). La localización positiva del ARNm de la 2,3-STasa puede observarse en color azul oscuro, señaladas con flechas (400X); la señal de hibridación más intensa para 2,3-STasa se detectó en gonadotropos de ratas sacrificadas en la mañana del M.

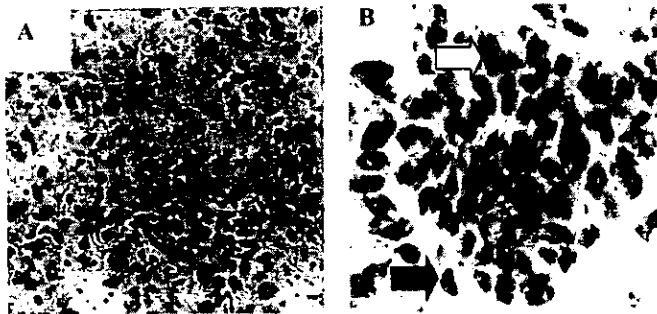


Fig. 19 Control negativo de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica de hipófisis de ratas adultas. A) HIS en corte de hipófisis de rata sacrificada en M B) IHQ en corte de hipófisis de rata sacrificada en P, la localización positiva de la subunidad β -FSH puede observarse en color marrón (flecha en color amarillo) mientras que los núcleos se observan en azul (flecha en color negro) amplificación 400X con zoom.

ANIMALES OVX.

En animales castrados (fig. 20) se observó que la detección de gonadotropos positivos a la enzima tuvo un comportamiento similar al esperado, donde a los 7 días la expresión se encontró muy disminuida, incluso por debajo de la fase del E y P en animales intactos y esta expresión se incrementó estadísticamente significativo después de los 28 días de castración. Se observó que, de acuerdo con lo reportado, el número de gonadotropos se incrementó y se hipertrofiaron como resultado de la ovariectomía a largo plazo.

ANIMALES OVX + BE.

Después de 28 días de ovariectomía se observó que la expresión de la enzima se incrementó significativamente en comparación con la expresión en ratas ovariectomizadas a corto plazo (7 días). La administración de BE disminuyó significativamente la expresión de 2,3-STasa como puede observarse en la figura 20, en comparación con los controles tratados con Vh. Esto mismo puede ser observado en la figura 21 donde se muestran los cortes de hipófisis de ratas a los 7 (A), 28 días post-ovariectomía (B), 28d OVX + Vh (C) y 28d +BE (D). De aquí se demuestra que la castración a largo plazo incrementa la expresión del ARNm de la 2,3-STasa, mientras que el BE disminuye el número de células positivas al ARNm-STasa.

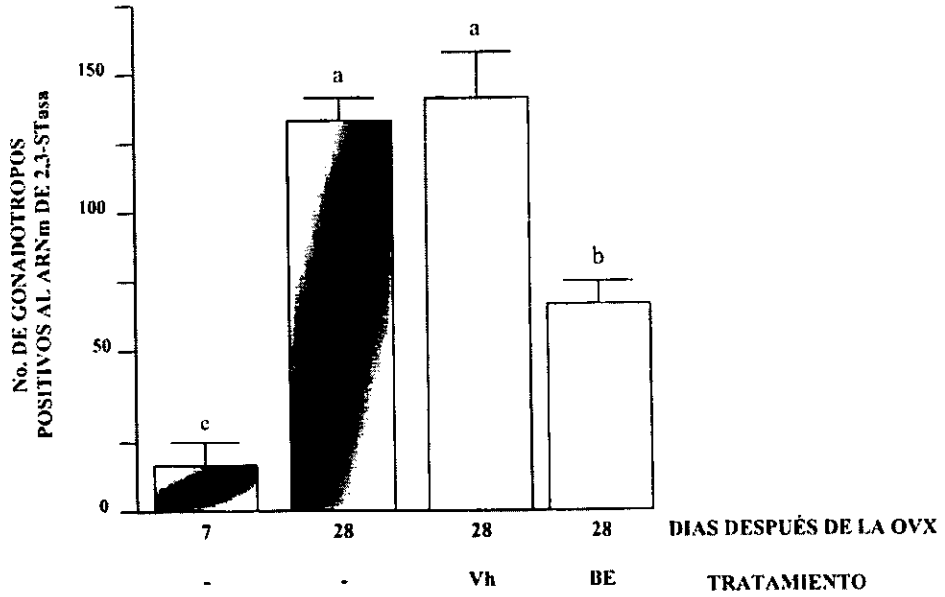


Fig. 20 Número de gonadotropos positivos al ARNm de la 2,3-STasa e inmunoreactivos al antisuero anti- β FSH (promedio \pm D.E. 3 animales por grupo), en animales OVX y OVX + BE. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

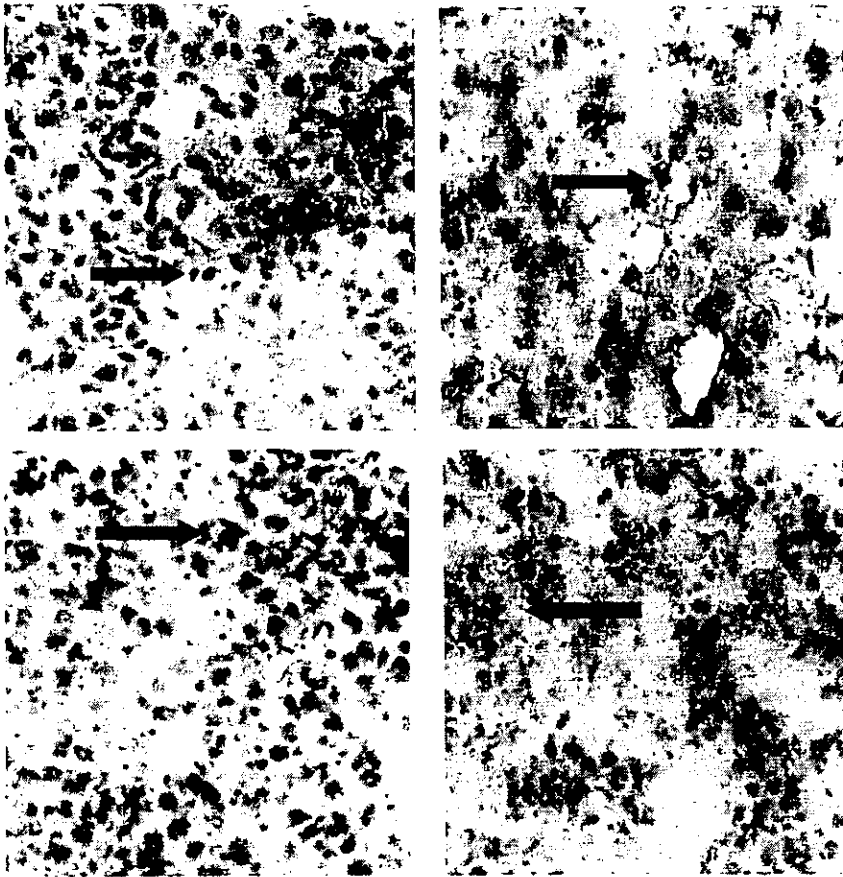


Fig. 21 Expresión del ARNm de la 2,3-STasa en gonadotropos, después de la castración y con la inyección de BE. Las hipófisis fueron obtenidas después de 7 (A) y 28 días de castración (B) y después de la inyección con Vh (C) o de 10 µg de BE (D) a animales OVX por 28 días. Aumento 400X.

INTACTOS (M) + BE.

La administración de BE por la mañana del E a ratas intactas y sacrificadas 24 horas después provocó el bloqueo del incremento fisiológico en la expresión del ARNm-STasa que se lleva a cabo por la mañana del M. En la gráfica 22 se observa el número de gonadotropos positivos al ARNm de la 2,3-STasa en donde se muestra que la inyección de BE disminuye la expresión del ARNm con respecto al vehículo y en la figura 23 se muestran las fotografías de la Hibridación *in situ* (fig. 23A y 23B)

INTACTOS (D) + ICI.

En este grupo se usaron animales intactos y en la mañana del M se les inyectó el antiestrógeno ICI, sacrificados 24 horas después de la inyección los efectos producidos se observan en la gráfica 22. En las ratas tratadas con ICI se observó que este antiestrógeno inhibió la disminución en la expresión del ARNm ocurrido de manera natural en la mañana del D, presentándose señales positivas sin diferencia significativa igual que en animales en M y comparando con los tratados con Vh en los cuales si se observa este decremento natural por la mañana del D (figura 22) el BE por otro lado disminuye el número de células positivas a la 2,3-STasa (Fig. 23).

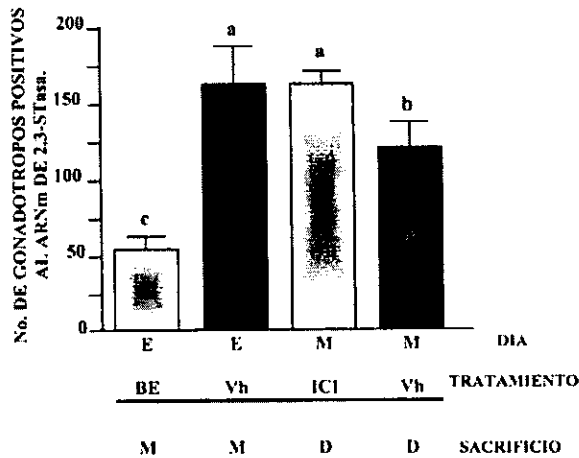


Fig. 22 Efectos del BE o ICI 182,780 (ICI) sobre la expresión del ARNm de la 2,3-STasa en gonadotropos de hipófisis de ratas intactas. Gonadotropos positivos al ARNm de la 2,3-STasa e inmunoreactivos al antisero anti-βFSH (promedio ± D.E. 3 animales por grupo). Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos.

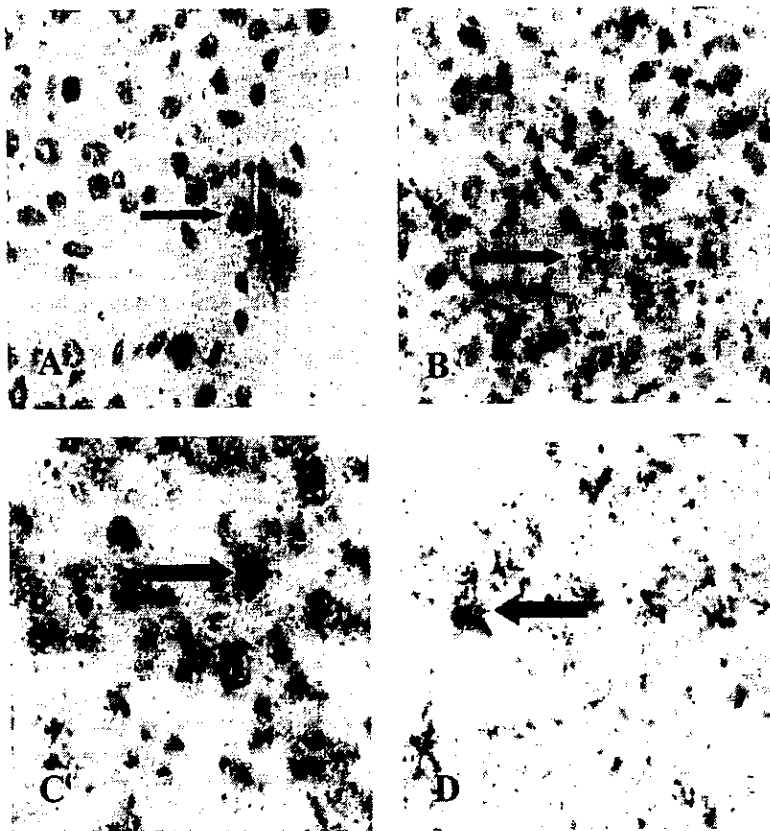


Fig. 23 Hibridación *in situ* para el ARNm de la 2,3-STasa en hipófisis de ratas intactas inyectadas con 10 μ g de BE (A) o de Vh (B) en la mañana del E y sacrificadas en la mañana del M. La inyección de ICI (C) en la mañana del M incrementa el número de células positivas en la mañana del D en comparación con los animales inyectados con el Vh (D). Aumento 400X.

CONCENTRACIONES HORMONALES.

En la figura 24 se muestran las concentraciones en suero de rFSH y de rLH determinadas por RIA de los animales sacrificados por la mañana de cada uno de los días del ciclo estral. La sensibilidad para ambas determinaciones fue de 0.1 ng/ml para FSH y 0.05 ng/ml para LH.

En la figura 25 se observan las concentraciones séricas de las gonadotropinas en hipófisis de ratas sacrificadas 7, 14, 21, 28 y 45 post-OVX, los resultados se compararon con respecto a las concentraciones encontradas en los animales sacrificados después de 7 días de castración. Las concentraciones de FSH y LH se incrementaron rápidamente a los 7 y 14 días post-OVX y después a los 21 y 28 días el incremento fue moderado y nuevamente a los 45 días el incremento fue rápido.

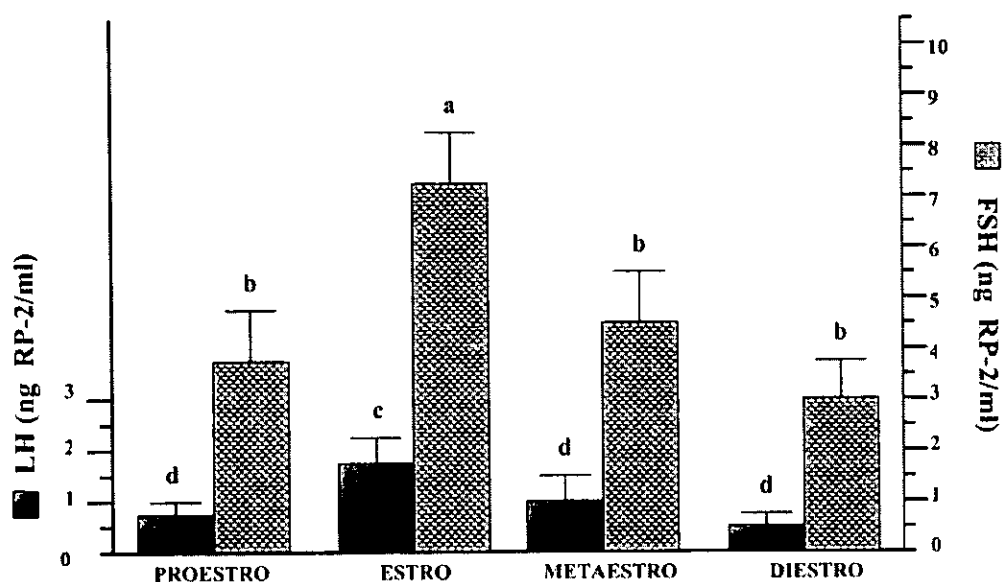


Fig 24 Concentraciones séricas de las hormonas de rata FSH y LH a través del ciclo estral. Las diferencias significativas entre grupos se denotan con distintas letras; $p < 0.05$.

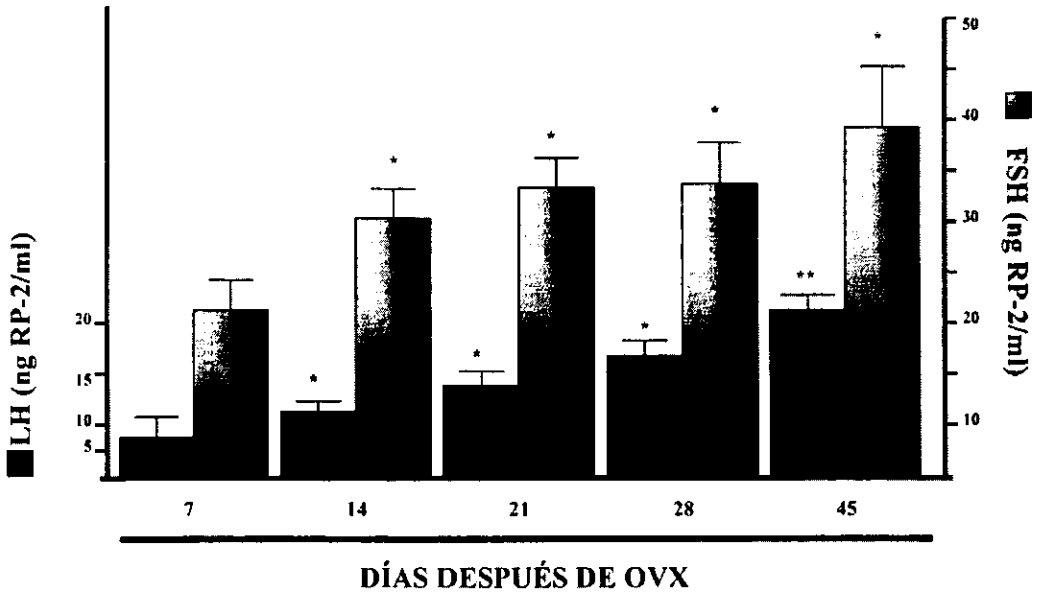
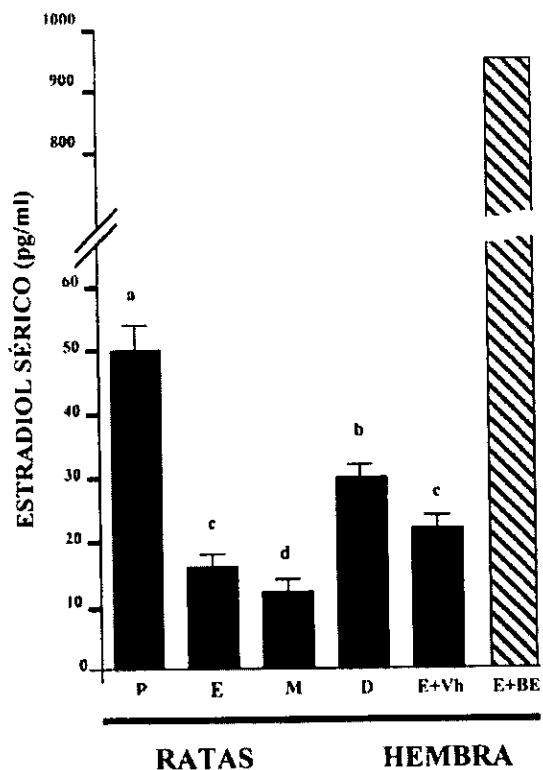


Fig 25 Concentraciones séricas de las hormonas de rata FSH y LH de animales ovariectomizados. Diferencias significativas con respecto a los animales sacrificados después de 7 días de castración se denotan con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.005$.

La máxima concentración en suero de estradiol detectada por RIA durante el ciclo estral en ratas intactas se presenta en la mañana del P, disminuyendo en la mañana del E, con concentraciones basales en el día de M y durante la mañana del D nuevamente se inicia el incremento (figura 26A). La sensibilidad para el estradiol fue de 10 ng/ml.

En la figura 26B se observa que después de 7 días de castración hay altas concentraciones de estradiol en suero, que disminuyen al 50% en animales después de 14, y 21 días post-ovariectomía y en 75% en ratas con 28 días de castración. La inyección del Vh a animales OVX no modificó su concentración de estradiol ($p > 0.05$).

A)



B)

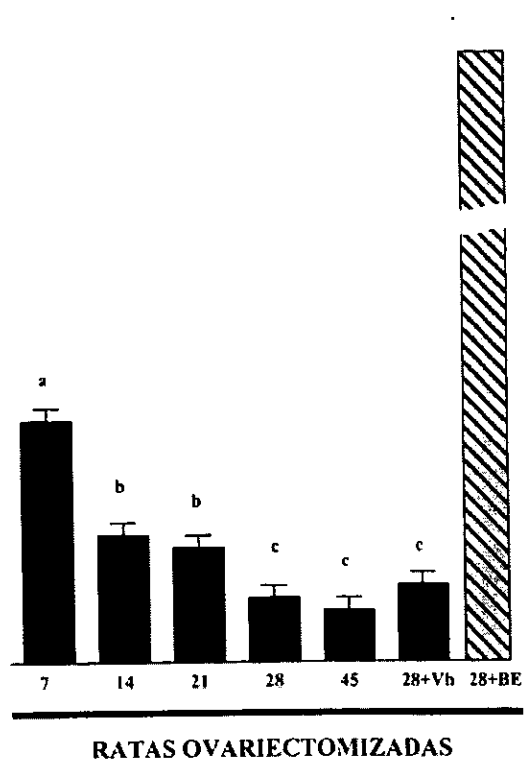


Fig 26 Concentraciones de 17β -estradiol sérico de animales sacrificados: A) en la mañana de los diferentes días del ciclo estral en comparación con aquellos inyectados con vehículo (Vh) o benzoato de estradiol (BE) y sacrificados en el día del E. B) Animales sacrificados a diferentes intervalos (7, 14, 21, 28 y 45 días) después de la castración en comparación con animales ovariectomizados por 28 días y tratados con Vh o con BE. Diferentes letras 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 (>>).

DISCUSIÓN.

La importancia del estudio de esta enzima es debido a que como la principal enzima responsable de la adición de residuos de ácido siálico a la molécula de la FSH y de los cambios en la cantidad de éste, se modifica la distribución por carga eléctrica de la hormona, generando de este modo las diferentes isoformas (Chappel y cols., 1983; Ulloa-Aguirre y cols., 1995; Padmanhaban y cols., 1999). Estas isoformas presentan propiedades biológicas diferentes, dependiendo de la cantidad de ácido siálico presente, ya que cuando la molécula de FSH contiene una menor cantidad de estos residuos se generan isoformas menos ácidas, lo que da una mayor afinidad por su receptor y una mayor respuesta hormono-específica. Por el contrario, la vida media plasmática de las isoformas más sializadas se incrementa disminuyendo su actividad biológica (Ulloa-Aguirre y cols., 1995).

En la presente tesis se estudió la expresión del ARNm por Northern blot y por hibridación *in situ* de la 2,3-STasa en rata hembra en diferentes condiciones fisiológicas y experimentales y se corroboró que esta expresión varía significativamente durante el ciclo estral de la rata y que los cambios en las concentraciones del ARNm de la enzima podrían estar asociados con variaciones en las cantidades de estradiol en suero (Damián-Matsumura y cols., 1999).

Por hibridación *in situ* se corroboró que el ARNm de 2,3-STasa en el ciclo estral de la rata se expresa de manera diferencial y su máxima concentración se encuentra durante la mañana del M, se encuentra relativamente baja en este momento la concentración de estradiol en suero; en tanto que en D y principalmente en P y E hay una disminución progresiva del ARNm y un incremento en las concentraciones de estradiol en suero.

Como ocurre en el M donde se presenta un incremento significativo en las concentraciones del ARNm de 2,3-STasa, cuando las concentraciones de estradiol son bajas, en los animales ovariectomizados se presenta este mismo comportamiento, ya que conforme aumenta el tiempo de castración (disminución las concentraciones de estrógenos) se incrementa la expresión del ARNm de la enzima, lo que sugiere que los cambios en las concentraciones de estradiol pueden influir en la síntesis o estabilidad de este ARNm.

Lo anterior es apoyado por los experimentos tanto de Northern blot como de hibridación *in situ* llevados a cabo en el presente estudio, en los cuales se inyectó benzoato de estradiol en la

mañana del E a animales intactos o después de 28 días post-ovariectomía, resultando en el bloqueo del incremento del ARNm que se presenta de manera natural en ambos casos, debido principalmente a las bajas concentraciones de estradiol en suero.

Pero no solo actúa el efecto inhibitorio del estradiol sobre la expresión del ARNm-STasa, ya que como se mostró; las concentraciones del ARNm de la enzima después de 7 y 14 días de ovariectomía permanecen bajas y es hasta los 21 días post-ovariectomía que se presenta un incremento significativo en la expresión del ARNm, además de que la respuesta al estradiol exógeno en animales castrados es menor con respecto al mostrado en animales intactos.

Y por otro lado, al inhibirse el mecanismo de acción de los estrógenos endógenos por el uso del antiestrógeno ICI 182,780 en ratas intactas, se observó que este compuesto fue capaz de bloquear casi por completo el efecto inhibitorio del estradiol endógeno; lo que provocó el incremento en la expresión del ARNm de 2,3-STasa.

Uno de los factores extraovarios que pudiera estar involucrado en el control de la expresión de 2,3-STasa es la GnRH. En algunos estudios se ha sugerido que la GnRH se encuentra involucrada en la regulación y en el grado de heterogeneidad tanto de LH como de FSH dependientes del ácido siálico (Ulloa-Aguirre y cols., 1992c, Phillips y Wide, 1994; Kaiser y cols., 1997). Pero se han tenido resultados contradictorios por lo que no se ha podido determinar de manera precisa que tanto se encuentra involucrada la GnRH en el control de la expresión del ARNm de la enzima 2,3-STasa.

Por otra parte se ha demostrado que otras glicosiltransferasas como lo son la 2,6-STasa, la N-acetil galactosamina transferasa, la α -manosidasa II (Helton y Magner 1994b), y las sialidasas (Cohen- Forterre y cols., 1992); están reguladas por diferentes factores hormonales como son los corticoesteroides (Coughlan y cols., 1996, Coughlan y Breen KC 1998; Magure y cols., 1998) en tejidos reproductivos (Nelson y cols., 1977; van Aswegen y cols., 1990): tomándose esto como base para continuar con los estudios que lleven a conocer el mecanismo de control de la expresión de la enzima, ya que podría ocurrir de manera similar con la enzima 2,3-STasa; para lo cual podrán usarse sialiltransferasas de origen recombinante (William y cols., 1995) o identificando regiones control en el promotor y los elementos de respuesta a diferentes hormonas presentes en las sialiltransferasas en general.

control en el promotor y los elementos de respuesta a diferentes hormonas presentes en las sialiltransferasas en general.

Los hallazgos de la presente tesis serán de gran utilidad en estudios posteriores para determinar los mecanismos que regulan la expresión de la enzima 2,3-STasa y conocer el papel de los factores hipotálamicos y ováricos en la regulación de la adición de ácido siálico a la molécula de FSH y por tanto la regulación de la aparición de las diferentes isoformas.

CONCLUSIONES.

- La expresión del ARNm-2,3-STasa cambia durante el ciclo estral de la rata.
- En base a la manipulación farmacológica, utilizando benzoato de estradiol y el antiestrógeno ICI se concluyó que la expresión (o estabilidad) del ARNm de la 2,3-STasa se encuentra regulada por mecanismos dependientes de estrógenos.
- Los resultados obtenidos por hibridación *in situ* e inmunohistoquímica confirman lo observado por Northern blot.
- Cambios fisiológicos y experimentales en las concentraciones de los estrógenos modifican la expresión del ARNm que codifica para la enzima 2,3-STasa lo cual pudiera correlacionarse con el grado de sialización de la FSH y por lo tanto la formación de múltiples isoformas.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD.** (1994). Molecular Biology of the Cell. 3ra. Ed. Garland Publishing, Inc. New York. USA. Chapter 12, 577-609.
- Baenzinger 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. 947:287-306.
- Baenzinger JU.** (1994). Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it!. FASEB J 8(13):1019-1025.
- Beers WH y Strickland SA.** (1978). A cell culture assay for follicle-stimulating hormone. J Biol Chem. 253:3877-3881.
- Bogdanove EM, Campbell GT y Peckham WD.** (1974). FSH pleomorphism in the rat: regulation by gonadal steroids. Endocr Res Commun. 1:87-99.
- Booth RA Witman JY, Yankov VI, Adams A, Garriott BA, Lynch A, Veldhuis JD, Rogol AD, Johnson ML y Evans WS.** (1994). Characterization of FSH secretory burst activity in normal women during the menstrual cycle. Program of the 76 Annual Meeting of Endocrine Society, Anaheim, CA, P 405 (Abstrac 819).
- Bousfield GR, Perry WM y Ward DN.** (1994). Gonadotropins. Chemistry and Biosynthesis. In: The Physiology of Reproduction, Second Edition. (Knobil & Neil JD, Eds.). Raven Press, Ltd, New York. Chapter 30, Vol. 2 1749-1792.
- Brown, R.** (1994). The pituitary gland and its hormones. In: Introduction to neuroendocrinology. 1st Edition. Cammbrige University Press. New York USA. Chapter 3, 30-39.
- Cohen-Forterre L, Andre J, Mozere G, Peyroux J y Sternberg M.** (1990). Kindey sialidase and sialyltransferase activities in spontaneously and experimentally diabetic rats. Influence of insulin and sorbinil treatments. Biochem Pharmacol. 408309:507-513.
- Cohen-Forterre L, Andre J y Sternberg M.** (1992). Sex and age dependence of rat kidney sialidase. Enzyme. 46(6):309-314.
- Cook AS, Webster BW, Terranova PF y Keel BA.** (1988). Variation in the biologic and biochemical characteristic of human menopausal gonadotropin. Fertil Steril. 49:704-712.
- Costoff A.** (1973). Gonadotropes. In: Ultrastructure of rat adenohypophysis. (Costoff Allen). Academic press, Ltd, New York and London Chapter 4, 26-63.

- Coughlan CM y Breen KC.** (1998). Glucocorticoid induction of the 2,6-sialyltransferase enzyme in a mouse neural cell line. J Neurosci Rev. 51(5):619-626.
- Coughlan CM, Seckl 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.
- Chappel SC, Bethea CL y Spies HG.** (1984). Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of Cynomolgus monkeys. Endocrinology. 115:452-461.
- Chappel SC, Coutifaris C y Jacobs SJ.** (1982). Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present within the anterior pituitary gland of ovariectomized hamster. Endocrinology. 110(3):847-854.
- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A y Coutifaris C.** (1983). Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. Endocr Rev. 4(2):179-211.
- Chen C, Ma J, Lazic A, Backovic M y Colley KJ.** (2000). Formation of insoluble oligomers correlates with ST6Gal I stable localization in the golgi J Biol Chem. 275(18):13819-13826.
- Chomczynski P y Sacchi N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162:156-159.
- 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.
- Daane TA y Parlow AF.** (1971). Periovarian patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrus cycle as revealed by radioimmunoassays: effects of pentobarbital. Endocrinology. 88(3): 653-663.
- Dahl KD y Stone MP.** (1992). FSH isoforms, radioimmunoassays, and their significance. J Androl. 13:11-22.
- Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Hernández-Sánchez C, Timossi C y Ulloa-Aguirre A.** (1999). Oestrogens regulate pituitary 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. J Mol Endocrinol. 23, 153-165.
- Danielson PE, Forss-Petter S, Brown 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.
- Datta AK y Paulson JC.** (1997). Sialylmotifs of sialyltransferases. Indian J Biochem Biophys. 34(1-2):157-165.
- Datta AK, Sinha A y Paulson JC.** (1998). Maturation of the sialyltransferase S- sialylmotif alters the kinetic of the donor and acceptor substrates. J Biol Chem. 273(16):9608-9614.

- Datta AK, y Paulson JC.** (1995). The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-Neu-Ac. J Biol Chem. 270(4):1497-1500.
- Dharmesh SM y Baenzinger JU.** (1993). Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides on lutropin. Proc Natl Acad Sci USA. 90(23): 11127-11131.
- Espey LL y Lipner H.** (1994). Ovulation. In: The Physiology of Reproduction, Second Edition. (Knobil E & Neil JD, Eds.) Raven Press, Ltd, New York. Vol.1 Chapter 13, 725-780.
- Everett JW.** (1994). Pituitary and hypothalamus: Perspectives and overview. In: The Physiology of Reproduction, Second Edition. (Knobil E & Neil JD, Eds.) Raven Press, Ltd, New York. Vol.1 Chapter 25, 1509-1526.
- Fanjul ML.** (1995). Hipótesis. En: Fisiología humana, endocrinología y metabolismo. 1ra. Ed. (Editor Lemus A). Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México D.F. Capítulo 2, 51-71.
- Farquhar MG.** (1955). Further evidence for the existence of two types of gonadotropes in the pituitary of the rat. Anat Rec. 121, 394.
- Fawcett DW y Bloom.** (1992). Hipótesis. En: Tratado de histología. 11va Ed. Editorial Interamericana. Capítulo 17, 485-506.
- Fayos BE y Bartles JR.** (1994). Regulation of hepatocytic glycoprotein sialylation and sialyltransferases by peroxisome proliferators. J Biol Chem. 269(3): 2151-2157.
- Flack MR, Froehlich J, Bennet AP, Anasti J y Nisula BC.** (1994). Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. J Biol Chem. 269(19):14015-14020.
- Foulds LM y Robertson DM.** (1983). Electrofocusing fractionation and characterization of pituitary follicle-stimulating hormone from male and female rats. Mol Cell Endocrinol. 31:117-130.
- Freeman ME.** (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: The Physiology of Reproduction, Second Edition. (Knobil E & Neil JD, Eds.) Raven Press, Ltd, New York. Vol. 2, Chapter 46, 613-658.
- 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.
- Galway AB, Lapolt PS, Tsafirri 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.

- Galle PC, Ulloa-Aguirre A, Chappel SC.** (1983). Effects of oestradiol, phenobarbitone and luteinizing hormone releasing hormone upon the isoelectric profile of pituitary follicle-stimulating hormone in ovariectomized hamsters. *J Endocrinol.* 99:31-39.
- Ganong WF.** (1988). *Fisiología médica*, 11a Ed. Editorial El Manual Moderno, SA, México.
- Gharib SD, Wierman ME, Shapnik MA y Chin WW.** (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev.* 11(1):177-199.
- 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.
- Giroud A y Martinet M.** (1948). Localisations de certaines fonctions dans le lobe antérieur de l'hypophyse. *Ann Endocrinol.* 9, 343.
- Gleen TC y Gleen SJ.** (1994). Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs). *Trends in Genetics.* 10, 344.
- González-Machon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL y Vale W.** (1991). Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology.* 54:373-377.
- Gore-Langton RE y Armstrong DT.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. (Knobil E y Neil JD, Eds.) Raven Press, Ltd, New York. Vol. 1 Chapter 11, 571-627.
- Green ED y Baenzinger 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.
- Green ED y Baenzinger JU.** (1988b). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin.II- Distribution of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* 263(1): 36-44.
- 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(15):3604-3609.
- Guyton CA y Hall JE.** (2000). Endocrinología y reproducción. En: *Manual del tratado de fisiología médica*, Tercera Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, España, S.A.U. Capítulo 14, 671-748.
- Haisenleder DJ, Dalkin AC y Marshall JC.** (1994). Regulation of gonadotropin gene expression. In: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. (Knobil E & Neil JD, Eds.) Raven Press, Ltd, New York. Vol.2 Chapter 31, 1793-181.

- Hame A, Delannoy P, Verbert A y Kolinska J.** (1997). The hydrocortisone-induced transcriptional down-regulation of beta-galactosyltransferase in the small intestine of suckling rats is suppressed by mifepristone. (RU-38,486). J Steroid Biochem Mol Biol. 60(1-2): 59-66.
- Harsch IA, Simon M y Nieschlag E.** (1993). Molecular heterogeneity of serum follicle-stimulating hormone in hypogonadal patients before and during androgen replacement therapy and in normal men. Clin Endocrinol. 39:173-180.
- Helenius A y Aebi M.** (2001). Intracellular functions of N-Linked glycans. Science. 291:2364-2369.
- Helton TE y Magner JA.** (1994a). Sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases in thyrotrophs of hypothyroid mice: *In situ* hybridization study. Endocrinology. 134(8): 2347-2353.
- 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.
- 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.
- Hirschberg CB y Snider MD.** (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Annu Rev Biochem. 56 63-87.
- Halmi NS.** (1952). Two types of basophils in the rat pituitary: Thyrotropes and gonadotropes vs. Beta and delta cells. Endocrinology. 50, 140.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC y Welsh TH.** (1984). Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulosa cells. Endocr Rev. 5(1): 76-127.
- Kaiser BU, Conn PM y Chin WW.** (1997). Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor expressing pituitary cell lines. Endocrine reviews. 18(1):46-70.
- Keel BA y Schanbacher BD.** (1987). Charge heterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in rams and steroid-treated wethers. Biol Reprod. 37:786-796.
- Kennedy J y Chappel S.** (1985). Direct pituitary effects of testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone: analysis by radioimmuno- and radioreceptor assay. Endocrinology. 116:741-746.
- Kim PS y Arvan P.** (1998). Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: Disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. Endocr Rev. 19(2): 173-202.

- Kitagawa H y Paulson JC.** (1993). Cloning and expression of human Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3-sialyltransferase. Biochem Biophys Res Commun. 194(1):375-382.
- 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.
- Kitagawa H y Paulson JC.** (1994b). Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. J Biol Chem. 269(27):17872-17878.
- Kitagawa HE y Paulson JC.** (1996). Genomic organization and chromosomal mapping of the Gal β 1,3GalNAc/Gal β 1,4GlcNAc α 2,3-Sialyltransferase. J Biol Chem. 271(2):931-938.
- Kitazume-Kawaguchi S, Dahmae N, Takio K, Tsuji S y Colley KJ.** (1999). The relationships between ST6Gal I Golgi retention and its cleavage-secretion. Glycobiology. 9(12): 1397-1406.
- Kleene R y Berger EG.** (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. Biochim Biophys Acta. 1154: 283-325.
- Kolinska J, Ivanov S y Chelibonova-Lorer H.** (1988). Efect 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.
- Kornfeld R y Kornfeld S.** (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem. 54:631-664.
- Kurosawa N, Takashima S, Kono M, Jkehara Y, Inove M, Tachida Y, Narimatsu H y Tsuji S.** (2000). Molecular cloning and genomic analysis of mouse a Gal NAc alpha 2,6-sialyltransferase (ST 6 Gal NaI). J Biochem. 127(5): 845-854.
- Leeson CR, Lesson TS y Paparo AA.** (1987). Sistema endocrino. En: Histología. 5ta. Edición. México D.F. Capitulo 14, 455-481.
- Le Nestour E, Marraoui J, Lahlou N, Roger M, de Ziegler D, Bouchard P.** (1993). Role of estradiol in the rise in follicle-stimulating hormone levels during the luteal-follicular transition. J Clin Endocrinol Metab. 77:439-442.
- 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.
- Ma J, Simonovic M, Qian R y Colley KJ.** (1999). Sialyltransferase isoforms are phosphorylated in the cys-medial Golgi on serine and threonine residues in the luminal sequences. J Biol Chem. 274(12):8046-8052.
- Magner JA, 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.
- Maguire TM, Coughlan CM, Seckel JR y Breen KC.** (1998). The effect of corticosteroids on serum sialyltransferase enzyme activities in the rat. Biochim Biophys Acta. 1379(1): 23-28.
- McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM.** (1987). Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 65:954-961.
- Nelson JD, Jato-Rodriguez JJ y Mookerjea S.** (1975). Effect of ovarian hormones on glycosyltransferase activities in the endometrium of ovariectomized rats. Arch Biochem Biophys. 169(1): 181-195.
- Nelson JD, Jato-Rodriguez JJ, Labrie F y Mookerjea S.** (1977). Glycosyltransferase and UDP-galactose pyrophosphatase activities in the endometrium during oestrus cycle of the rat. J Endocrinol. 73(1):53-58.
- Nemansky M, Schiporst WECM, Koeleman CAM y Van den Eijnden DH.** (1992). Human liver and human placenta both contains CMP-NeuAc: Gal β 1,4GlcNAc-R N- α 2,3- as well as α 2,6-sialyltransferase activity. FEBS 312(1):31-36.
- 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. 67:465-473.
- Padmanabhan V, Miceher CD, Borondy M, P'Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, y Beitins I.** (1992). Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. Endocrinology. 131:213-220.
- Padmanabhan V, Saram MR, Hassing JM, Brown MB 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.
- Padmanabhan V, Lee JS y Beitins IZ.** (1999). Follicle-stimulating isohormones: regulation and biological significance. Reprod Fertil Suppl. 54:87-99.
- Peters H, Byskov AG, Himelstein-Brawn R y Faber M.** (1975). Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. J Reprod Fertil. 45:559-566.

1. The Board of Directors of the Corporation shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

2. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

3. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

4. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

5. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

6. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

7. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

8. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

9. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

10. The Board of Directors shall have the authority to issue and sell shares of common stock of the Corporation, including the authority to make and alter the bylaws of the Corporation, and to do all such other acts and things as may be necessary or proper to carry out the purposes of the Corporation.

- 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. 79:814-819.
- Purves HD y Griesbach WE.** (1951). The site of thyrotropin and gonadotropin production in the pituitary studied by Mc Manus- Hotchkiss staining for glycoprotein. Endocrinology. 49, 244.
- Rathman P y Saxena BB.** (1984). Structure-Function relationships of gonadotropins. In: Hormone Receptors in Growth and Reproduction. (Saxena BB et al eds.) Raven Press, New York, 21-35.
- Reichert LE, Jr.** (1971b). Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins an studied by electrofocusing. Endocrinology. 88(4):1029-1044.
- Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT y Clarke I.** (1991). Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fractions of ovariectomized and intact ewes. Endocrinology. 129:1805-1813.
- Romeis B.** (1946). Inkretorische organe. In: Handbuch der mikroskopischen anatomie der menschen (F. Von Möllendorff, ed.) vol 6 Part 79. Springer-Verlag, Berlin and New York.
- Ronin C.** (1992). Glycosylation of pituitary hormones: a necessary and multistep control of biopotency. Glycoconj J. 9(6):279-283.
- Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, Mc Cormick DJ, Milius RP, Calvo FO y Vutyavanich T.** (1987). Structure-function relation ships of gonadotropins. Recent prog Horm Res. 43 383-429.
- Sanger F, Nicklens y Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74(12):5463-5467.
- Sanno N, JinL, Quian X, Osamura, Scheithaver BW, Kavacs K y Lloyd RU.** (1997). Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acids expression in nontumorous and neoplastic pituitaries. J Clin Endocrinol Metabol. 82(6):1974-1982.
- Saveringhaus AE.** (1937). Cellular changes in the anterior hypophysis with special reference to its secretory activities. Physiol Rev. 17, 556.
- 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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.**

Simoni M, Jochenovet F y Nischlag E. (1994). Polymorphism of human pituitary FSH: analysis of minor reactivity and in vivo bioactivity of different molecular species. J Endocrinol 141(2): 229-236.

Zaveringhaus AE. (1937). Cellular changes in the anterior hypophysis with special reference to its secretory activities. Physiol Rev. 17, 256.

Zaveringhaus AE. (1937). Cellular changes in the anterior hypophysis with special reference to its secretory activities. Physiol Rev. 17, 256.

Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74(12):2463-2467.

Zangerl F, Nicklens S y Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 74(12):2463-2467.

43 383-429.

Vutsvanich T. (1987). Structure-function relations of gonadotropins. Recent Prog Horm Res 43:383-429.

Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, Cormick DJ, Millar RP, Cervo FO y J. (1992). Glycosylation of pituitary hormones: a necessary and intricate control of biological activity. Endocrinology 130(6):279-283.

Ronia C. (1992). Glycosylation of pituitary hormones: a necessary and intricate control of biological activity. Endocrinology 130(6):279-283.

Roizis B. (1946). Inkretische organe. in: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen (F. von Mollendorff, ed.) vol 6 Part 79. Springer-Verlag, Berlin and New York.

Roizis B. (1946). Inkretische organe. in: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen (F. von Mollendorff, ed.) vol 6 Part 79. Springer-Verlag, Berlin and New York.

Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT y Clark I. (1991). Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary ablated and isolated factors of ovariectomized and intact ewes. Endocrinology 129:1832-1813.

Reichert LE, Jr. (1971b). Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins: an analysis of electrophoresis. Endocrinology 88(4):1029-1044.

Reichert LE, Jr. (1971b). Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins: an analysis of electrophoresis. Endocrinology 88(4):1029-1044.

Katman F y Saxena BB. (1984). Structure-function relationships of gonadotropins. In: Hormone Receptors in Growth and Reproduction (Saxena BB et al eds). Raven Press, New York, 21-32.

Purves HD y Griesbach WE. (1951). The site of thyrotropin and gonadotropin production in the development. J Clin Endocrinol Metab. 79:814-819.

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. 79:814-819.

- Simoni M, Weinbauer GF, Chandolia RK, Nieschlag E.** (1992). Microheterogeneity of pituitary follicle-stimulating hormone in male rats: differential effects of the chronic deprivation induced by castration or androgen blockade. J Mol Endocrinol. 9: 175-182.
- Simoni M, Weinbauer GF, y Nieschlag E.** (1993). Molecular composition of two different batches of urofollitropin: analysis by immunofluorimetric assay, radioligand receptor assay and in vitro bioassay. J Endocrinol Invest. 16:21-27.
- Smelser GK.** (1944). Differential centrifugation of hormones in the central and peripheral zones of the bovine anterior pituitary gland. Endocrinology. 34, 39.
- Smith MS, Freeman ME y Neill JD.** (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroids levels associates with resive of the corpus luteum pseudopregnancy. Endocrinology. 96 219-226.
- Smith PL, Kaetzel D, Nilson J y Baenzinger JU.** (1990). The sialylated oligosaccharides of recombinant bovine lutropin modulate hormone bioactivity. J Biol Chem. 265(2):874-881.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT y Robertson DM.** (1996). Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoform. Mol Cell Endocrinol. 125(1-2):133-141.
- Stumpf TT, Roberston MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima WN, Hejl K, Kittok RJ, Grotjan HE y Kinder JE.** (1992). A similar distribution of gonadotropin isohormones in maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. Biol Reprod. 46:442-450.
- Sujino K, Jackson RJ, Chan NW, Tsuji S y Palcic MM.** (2000). A novel viral α 2,3-sialyltransferase (V-ST3Gal I): Transfer of sialic acid to fucosylated acceptors. Glycobiology. 10(3): 313-320.
- Svensson EC, Conley PB y Paulson JC.** (1992). Regulation expression of α -2,6-sialyltransferase by the liver-enriched transcription factors HNF-1, DBP and LAP. J Biol Chem. 267(5): 3466-3472.
- 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 of terminal glycosylation. J Biol Chem. 265(34):20863-20868.
- Takoshima S y Tsuji S** (2000). Comparison of genomic structures of four members of beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferase genes in the mouse. Cytogenet cell Genet. 89(1-2):101-106.
- 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.

- Tsuji S, Datta AK, y Paulson JC.** (1996). Systematic nomenclature for sialyltransferases. Glycobiology. 6(7): v-vii.
- 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. 56:89-93.
- Ulloa-Aguirre A y Timossi C.** (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. Human Reprod. 4(3):260-283.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P y Dias JA.** (1999). Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. Endocrine. 11(3):205-215.
- Ulloa-Aguirre A y Timossi C.** (2000). Biochemical and functional aspect of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. RBMonline. 1(2):41-55.
- Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V.** (1992a). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. Human Reprod. 7:23-30.
- Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Jimenez M, Zambrano E, Díaz-Sánchez V.** (1992b). Biological characterization of the isoforms of urinary human follicle-stimulating hormone contained in purified commercial preparation. Human Reprod. 7:1371-1378.
- Ulloa-Aguirre A y Chappel SC.** (1982). Multiple species of follicle-stimulating exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. J Endocrinol. 95:257-266.
- Ulloa-Aguirre A, Damian-Matsumura P, Espinoza P, 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. 126:323-332.
- Ulloa-Aguirre A, Mejía JJ, Domínguez R, Guevara-Aguirre J, Díaz-Sánchez V y Larrea F.** (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. J Endocrinol. 110:539-549.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr, Beitinis IZ y Padmanabhan V.** (1995). Follicle-Stimulating Isohormones: Characterization and physiological relevance. Endocr Rev. 16 (6): 765-787.
- Ulloa-Aguirre A, Schwall R, Cravito A, Zambrano E y Damian-Matsumura P.** (1992c). Effects of gonadotropin-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. 134:97-106.

- Urbam RJ, Dahl KD, Lippert MC y Veldhuis JD.** (1992). Modulation of immunoradiometric and bioactive follicle-stimulating hormone secretion and clearance in young and elderly men during treatment with tamoxifen or flutamide. J Androl. 13:579-586.
- 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.
- 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.
- Weinstein J, Lee EU, McEntee K, Lai P-H 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 NH₂-terminal signal anchor J Biol Chem. 262(26): 17735-17743
- Wen DX, Livingston BD, Medzihradzky KF, Kelm S, Burlingame AL y Paulson JC.** (1992). Primary structure of Gal β 1,3(4) GalNAc α 2,3-Sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning. J Biol Chem. 267(29): 21011-21019.
- Wide L y Albertsson-Wikland K.** (1990). Change in electrophoretic mobility of human follicle-stimulating hormone in serum after administration of gonadotropin-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab. 70:271-276.
- 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.
- Wide L, Naessén T y Phillips DJ.** (1995). Effects of chronic oral administration of 17 β -oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. Clin Endocrinol. 42:59-64.
- Wide L y Naesspen T.** (1994). 17 β -estradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. Clin Endocrinol. 40:783-789.
- Wide L.** (1982). Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum. J Clin Endocrinol Metab. 55:682-688.
- Wide L.** (1986). The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone. Acta Endocrinol. 112:336-344.
- Wide L.** (1989). Follicle-stimulating hormones in anterior pituitary glands from children and adults differ in relation to sex and age. J Endocrinol. 123:519-529.

William MA, Kitagawa, 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.

Wilson CA, Leigh AJ y Chapman AJ. (1990). Gonadotrophin glycosylation and function. J Endocrinol. 125(1):3-14.

Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Díaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. (1995). Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoforms distribution throught the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 80:1647-1656.

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.