

## Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes<sup>#</sup>

A gonadotropin releasing hormone analogue decreases follicle stimulating hormone (FSH) secretion in prepubertal female sheep

S E Recabarren\*, P Muñoz, A Lobos, C Vilches, J Parilo

Laboratorio de Fisiología y Endocrinología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

### SUMMARY

LH and FSH secretions depend on the pulsatile secretion of GnRH from the hypothalamus. However, the grade of dependency as well as the relationship between pulses of GnRH and pulses of FSH secretion is less clear. Experiments in monkeys have shown that high GnRH pulse frequency favors LH secretion while low frequency of GnRH pulses preferentially stimulates the FSH secretion. The objective of the present work was to recognize the dependence of GnRH on the FSH secretion in prepubertal female sheep. A GnRH agonist analogue in slow release microcapsule preparation was used (Trp6-GnRH, (Decapeptyl®)) whose blocking effect on the LH release has been previously demonstrated. The analogue was injected intramuscularly every 4 weeks beginning at 20 weeks of age three times in five Suffolk ewe lambs. Another group of five lambs received the vehicle of Decapeptyl. Studies of FSH pulsatility were carried out at 20 (before the analogue agonist administration), 26 and 30 weeks of age. The CLUSTER program was used to identify characteristics of FSH secretion: transversal mean (ng/ml/5h), frequency of pulses (number of pulses/5h), amplitude of pulses (ng/ml) and nadir (ng/ml). In the control group, FSH secretion characteristics did not change between 20 and 30 weeks of age. In the experimental group, mean FSH concentrations decreased from  $3.4 \pm 0.3$  ng/ml/5h at 20 weeks of age to  $0.36 \pm 0.1$  ng/mL/5h at 30 weeks of age ( $P < 0.05$ ), which was also significantly lower than in the control group of the same age. Amplitude of FSH pulses in lambs of 30 weeks of age were significantly lower than in lambs of 20 weeks of age ( $4.4 \pm 0.5$  versus  $0.5 \pm 0.1$  ng/mL respectively,  $P < 0.05$ ), and lower than that exhibited by control ewe lambs of 30 weeks of age. FSH pulse frequency did not change between lambs of 20 and 30 weeks of age in either group. Results show that the GnRH analogue is able to block the FSH secretion suggesting that the FSH secretion is dependant on GnRH stimulation in prepubertal female sheep.

*Palabras clave:* FSH, ovejas prepúberes, GnRH, análogo de GnRH, Decapeptyl.

*Key words:* FSH, female prepubertal sheep, GnRH analogue, Decapeptyl.

### INTRODUCCION

La hormona folículo estimulante (FSH) es una glicoproteína de alto peso molecular secretada en pulsos desde los gonadotropos de la hipófisis. Está compuesta de dos subunidades, alfa y beta, codificadas por genes ubicados en cromosomas diferentes (Kraus y col 2001). La subunidad alfa es similar a la de la LH, TSH y HCG, mientras que la beta es diferente y le confiere su especificidad de acción biológica. El control de su secreción es complejo. En parte, su secreción depende de la estimulación ejercida por la GnRH secretada desde el hipotálamo y en parte por la acción de inhibinas, que inhiben su secreción, y de activinas que estimulan su secreción (Carroll y col 1991).

La regulación de la secreción de FSH inducida por la GnRH se inicia con la unión de la GnRH a los receptores acoplados a proteína G ubicados en el gonadotropo. Producto de la activación del receptor se activa una proteína ligante de GTP, lo cual resulta en un aumento en el reciclaje de fosfatidilinositol, activación de proteína kinasa C (Stojilkovic y Catt 1995), la activación de canales de  $Ca^{++}$  y liberación de  $Ca^{++}$  desde sus fuentes de almacenamiento intracelular (Naor 1990). Posteriormente se activa la transcripción del gen de la cadena beta de la FSH. La transcripción del gen que codifica para la subunidad beta de la FSH es mayor cuando los gonadotropos son estimulados con pulsos de GnRH de baja frecuencia que con pulsos de alta frecuencia (Leung y col 1987, Haisenleder y col 1991, Kaiser y col 1997). Esta observación podría explicar en parte la demostración *in vivo* en monos que pulsos de GnRH de baja frecuencia conducen a una mayor secreción de FSH que de LH. Por el contrario, pulsos de alta frecuencia facilitan la secreción de LH (Wildt y col 1981). En ovejas adultas ovariectomizadas inmunizadas contra GnRH, la secre-

Aceptado: 26.07.2005.

<sup>#</sup> Financiado por proyecto Fondecyt 1990389.

\* srecabar@udec.cl

ción pulsátil de LH se suprimió completamente, mientras que la secreción de FSH se redujo parcialmente. La administración posterior de un análogo de GnRH restauró los pulsos de LH pero no las concentraciones de FSH, y dependiendo de la frecuencia de estimulación aumentó la concentración de FSH en los gonadotropos (Molter-Gerard y col 1999), lo cual reafirma el concepto de la regulación diferencial de la LH y FSH basada en la frecuencia de estimulación. No obstante las evidencias que se dirigen a demostrar que la secreción de FSH-GnRH dependiente es regulada por la frecuencia de estimulación, se ha postulado además que la secreción de FSH depende de un factor liberador de FSH independiente de la GnRH (McCann y col 2001). Estudios en ratas con aplicación de estímulos en diferentes regiones del hipotálamo han conducido a secreción diferencial de FSH (Lumpkin y col 1989), y la destrucción de esas mismas regiones hipotalámicas ha detenido la secreción de FSH pero no la de LH (Lumpkin y col 1989, Marubayashi y col 1999), lo cual sugiere sitios de síntesis separados así como la presencia de un factor selectivo de la secreción de FSH. Más aún, recientemente se ha postulado que la GnRH-III sintetizada en lampreas sería el factor liberador de FSH de mamíferos ya que la administración de este péptido promueve la liberación diferencial de FSH en ratas *in vivo* e *in vitro* probablemente a través de su propio receptor (Yu y col 2002). La FSH secretada cumple diferentes funciones biológicas, entre las cuales se puede mencionar la proliferación y secreción de las células de Sertoli e indirectamente la espermatogénesis en machos (Kilgour y col 1998) y en hembras, reclutamiento, selección de folículos ováricos y síntesis de estradiol a partir de precursores androgénicos (Campbell y col 1990, Fortune y col 1991, Campbell y col 2004).

Estudios en ratas machos castrados muestran que la mitad de los pulsos de FSH se presentan en ausencia de pulsos de LH y solo una pequeña fracción de pulsos de ambas gonadotropinas son coincidentes (McCann y col 2001). Resultados obtenidos por Padmanabhan y col (1997) al medir las concentraciones plasmáticas de FSH en ovejas adultas ovariectomizadas muestran que un 93% de pulsos de FSH detectados en la sangre portal se asocian a pulsos de GnRH, en contraste con un 100% de coincidencia entre los pulsos de GnRH y LH. Además, estos autores encontraron que un 31,5% de pulsos de FSH no son coincidentes con pulsos de GnRH. Ellos interpretan este modo de secreción sugiriendo que la secreción de FSH es de tipo basal y episódica y que esta última es regulada por la secreción pulsátil de GnRH. Estudios que se enfoquen a reconocer la dependencia entre la secreción de GnRH y FSH en ovejas prepúberes son escasos. Una metodología empleada para estos objetivos en ovejas adultas es el uso de antagonistas de receptores de GnRH (Padmanabhan y col 2003). En este trabajo se utilizó un análogo agonista de GnRH cuya acción bloqueadora sobre la secreción de LH en ovinos se ha

demostrado previamente (Recabarren y col 2002) con el objetivo de reconocer la dependencia entre GnRH y la secreción de FSH en ovejas prepúberes.

## MATERIAL Y METODOS

*Manejo general de las ovejas prepúberes.* Se utilizaron 10 borregas de raza Suffolk, nacidas a fines de agosto, provenientes de la Unidad de Producción Ovina de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción; las borregas se destetaron a los tres meses de edad. Se mantuvieron en pradera, con suplementación diaria con concentrado peletizado (Novillina Champion®). A las 20 semanas de edad (fines de enero), se separaron al azar en dos grupos: un grupo control (n=5) y un grupo experimental, llamado grupo análogo de GnRH. Las borregas del grupo experimental (n=5) se inyectaron a las 20, 24 y 28 semanas de edad con implantes intramusculares (músculo glúteo) de triptorelina, un agonista análogo de GnRH (Trp-6-D-GnRH, Decapeptyl® Ferring, Alemania). El análogo agonista de GnRH se encuentra incorporado en microcápsulas de liberación lenta. El preparado comercial contiene una dosis de 3,5 mg de la hormona. Este esquema de aplicación asegura un efecto continuo por cuatro semanas. Las borregas controles recibieron el vehículo. Tres días antes de los estudios de pulsatilidad de FSH, las borregas se trasladaron a la sala de experimentación, donde se colocaron en bretes individuales. Las borregas se cateterizaron en la vena yugular, bajo anestesia local, utilizando catéteres de silastic Arrow 18 g, de acuerdo a lo descrito en Recabarren y col (1995). Se realizaron muestreos sanguíneos de acostumbramiento siguiendo el mismo protocolo del estudio de pulsatilidad por una hora, dos veces al día, previo al experimento con el fin de minimizar los riesgos de estrés.

*Estudio de pulsatilidad de FSH.* El estudio de pulsatilidad de FSH se realizó a las 20 (previo a la primera aplicación del análogo), 26 y 30 semanas de edad. Para ello se colectaron muestras de sangre (1 ml), a través del catéter yugular implantado anteriormente, a intervalos de 10 minutos por un período de 5 horas (10:00-15:00 horas).

*Procesamiento de las muestras de sangre.* Las muestras de sangre se depositaron en tubos heparinizados (10 UI de heparina/1 ml de sangre), posteriormente se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 minutos. El plasma se separó y se congeló a -20°C, hasta el posterior análisis de las concentraciones plasmáticas de FSH por radioinmunoensayo (RIA).

*Radioinmunoensayo de FSH.* El RIA de FSH se realizó con materiales donados por la NIADDK (USA) siguiendo el protocolo sugerido por A. F. Parlow de acuerdo a lo descrito anteriormente (Recabarren y col 2003). Brevemente, se incubaron 200 µl de FSH ovina estándar

(oFSHRP) en un rango de 0,02 a 25,6 ng / tubo o 200 µl de muestra desconocida con 100 µl de FSH iodada (oFSH I-1 AFP 5679 C) y 100 µl de antisero contra FSH ovina (AFP C 5228113) por 24 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100 µl de segundo antisero y se continuó con la incubación por 48 horas. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1.000 x g por 40 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se cuantificó la radioactividad del pellet en un gammaespectrómetro LKB. La concentración mínima detectable correspondiente al 90% del buffer control fue de 0,2 ng/ml. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 8 y 13%, con muestras controles en el rango de 1-2 ng/ml.

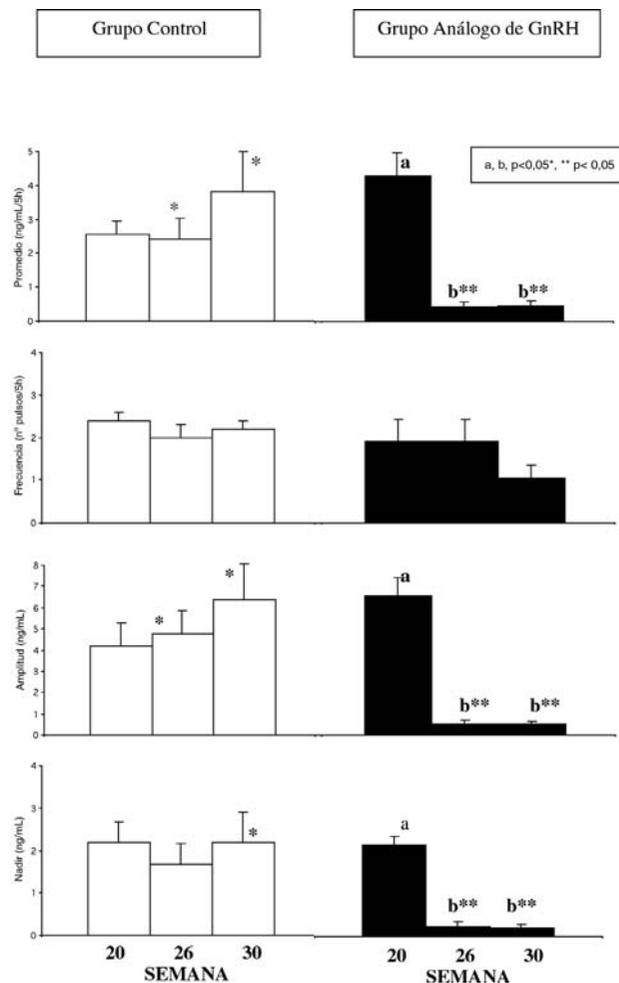
**Determinación de las características de la secreción pulsátil de FSH.** Las concentraciones plasmáticas de FSH de cada oveja se analizaron en forma individual, utilizando el programa computacional Cluster, desarrollado por Veldhuis y Johnson (1986), siguiendo el mismo procedimiento descrito en Recabarren y col (2003). Las siguientes variables se obtuvieron con el programa Cluster: promedio transversal (ng/mL/5h), frecuencia de pulsos (número de pulsos significativos/5h), amplitud de pulsos (ng/mL) y nadir (ng/mL).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos del programa Cluster se evaluaron con análisis de varianza para muestras repetidas con el tratamiento como factor principal y las edades como el factor de repetición, utilizando el programa computacional GbStat v6.5. Los promedios se compararon con el test de Newman Keuls. Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

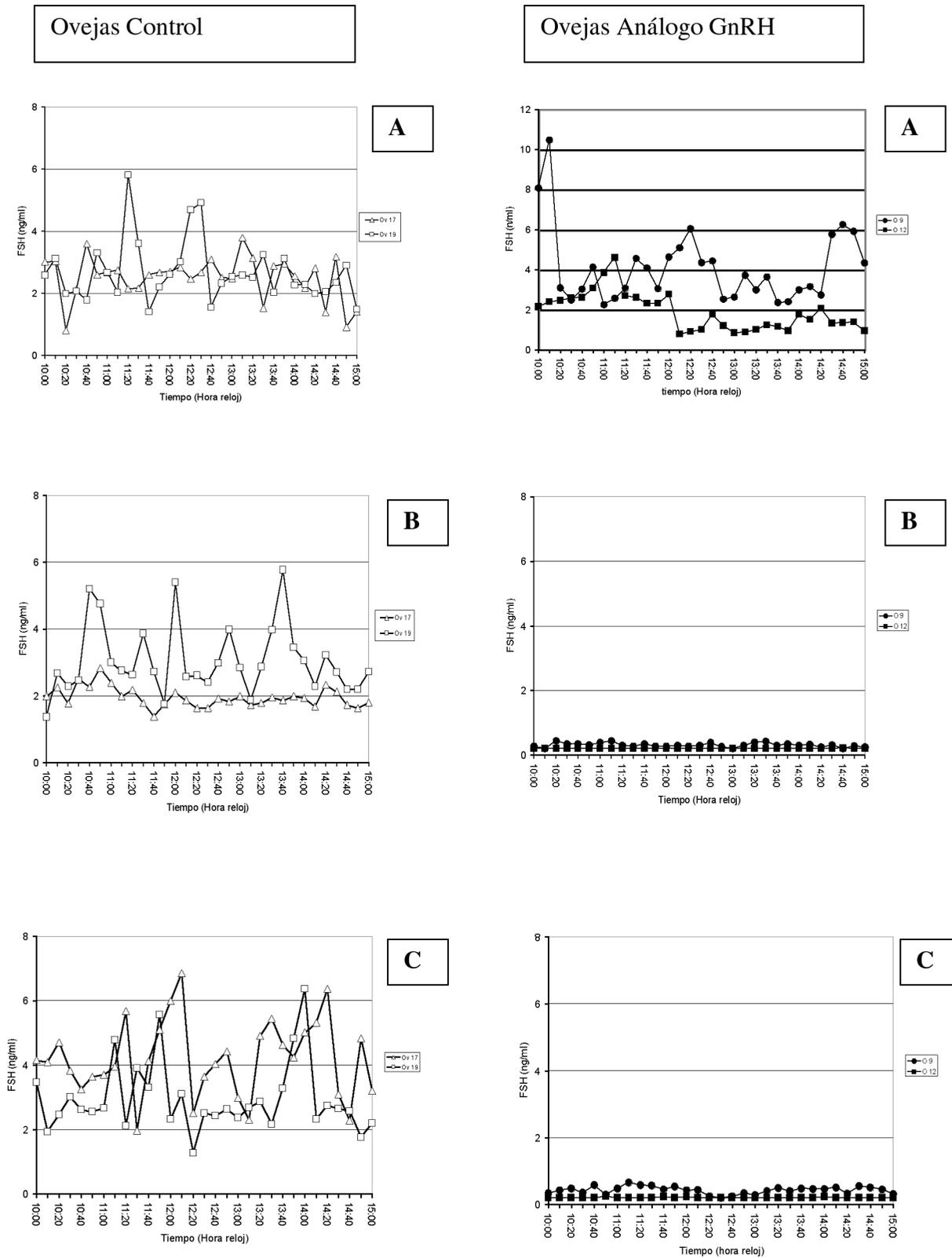
En la figura 1 se muestran las características de la secreción pulsátil de FSH en borregas controles y en borregas tratadas con el análogo de GnRH. En las borregas controles, el promedio transversal (ng/mL/5h), la frecuencia (número de pulsos significativos/5h), la amplitud de los pulsos (ng/mL) y el nadir (ng/mL) no cambiaron con la edad. En las borregas tratadas con el análogo de GnRH, el promedio transversal de la concentración plasmática de FSH y la amplitud de pulsos disminuyeron significativamente entre el inicio del experimento y las 26 y las 30 semanas de edad ( $p < 0,05$ ), no así la frecuencia de pulsos. Al comparar entre ambos grupos, se observó que la concentración promedio de FSH fue menor en las borregas tratadas con el análogo de GnRH que en las controles de 26 y 30 semanas de edad:  $2,42 \pm 0,6$  versus  $0,34 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) y  $3,81 \pm 1,2$  versus  $0,36 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) respectivamente. La amplitud de pulsos de FSH fue menor en las borregas tratadas con el análogo de GnRH que en las controles de 26 y 30 semanas de edad:  $4,79 \pm 1,1$  versus  $0,38 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) y  $6,38 \pm 1,7$  versus

$0,48 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) respectivamente. Individualmente, se reconoció que en una de cinco borregas tratadas con el análogo de GnRH, las concentraciones plasmáticas de FSH estuvieron por debajo del nivel de sensibilidad del RIA, y se le asignó ese valor con fines estadísticos. A las 30 semanas solo 1 borrega presenta dos “mini-pulsos” de FSH en 5 horas. En la figura 2 se muestran los perfiles individuales de dos borregas representativas de ambos grupos. Con la excepción de una borrega del grupo control (borrega número 20), las concentraciones



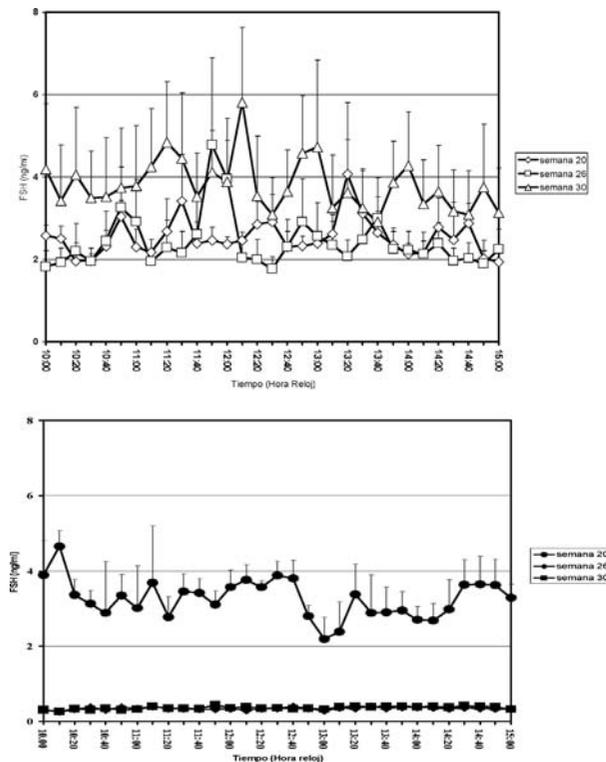
**Figura 1.** Características de la secreción pulsátil de FSH, promedio transversal: ng/mL/5h; frecuencia: número de pulsos/5h, amplitud de pulsos (ng/mL) y nadir (ng/mL) en borregas controles y en borregas tratadas con un análogo agonista de GnRH (Decapeptyl®). El análogo se inyectó intramuscularmente a las 20, 24 y 28 semanas de edad. El estudio de pulsatilidad de FSH se realizó a las 20 semanas (antes de la aplicación del Decapeptyl®), a las 26 y 30 semanas de edad.

Characteristics of the pulsatile FSH secretion horizontal mean: ng/mL/5h; frequency: number of significant pulses/5h; amplitude of pulses: ng/mL; nadir: ng/mL) in control ewe lambs and in ewe lambs treated with an agonist analogue of GnRH (Decapeptyl®). The analogue was injected intramuscularly at 20, 24 and 28 weeks of age. The FSH pulsatile study was performed at 20 (before Decapeptyl injection), 26 and 30 weeks of age.



**Figura 2.** Perfil de las concentraciones plasmáticas de FSH en dos borregas controles representativas de 20 (A), 26 (B) y 30 (C) semanas de edad y en dos borregas tratadas con un análogo agonista de GnRH (Decapeptyl®) de las mismas edades. El análogo se inyectó a las 20, a las 24 y a las 28 semanas de edad.

Profile of plasma FSH concentrations in 2 representative control ewe lambs of 20 (A), 26 (B) and 30 (C) weeks of age and 2 representative ewe lambs of the same ages treated with a GnRH agonist analogue (Decapeptyl®). The analogue was injected at 20, 24 and 28 weeks of age.



**Figura 3.** Concentraciones plasmáticas promedio en borregas controles (panel superior) y en borregas de 20, 26 y 30 semanas de edad tratadas con un análogo agonista de GnRH (Decapeptyl).

Mean plasma FSH concentrations in control ewe lambs (upper panel) and in ewe lambs of 20, 26 and 30 weeks of age treated with a GnRH agonist analogue (Decapeptyl®).

plasmáticas de FSH siguen un perfil irregular y sin una forma definida. En la figura 3 se muestra el promedio  $\pm$  error estándar de ambos grupos de borregas. En ambas figuras es claramente discernible el efecto del análogo de GnRH en la supresión de la secreción de FSH.

## DISCUSION

Los resultados del presente trabajo muestran que la secreción de FSH no se modifica entre las 20 y 30 semanas de edad en las borregas controles, período del desarrollo sexual de la oveja que se considera prepuberal. Por el contrario, en las borregas tratadas con el agonista de GnRH, la secreción de FSH se redujo significativamente, sugiriendo la dependencia entre la secreción de FSH y la estimulación con GnRH. Los resultados obtenidos en las borregas controles coinciden con aquellos obtenidos de otro estudio realizado en nuestro laboratorio, en el cual se comparó la secreción de FSH entre borregas controles y borregas sometidas a restricción alimenticia (Recabarren y col 2003), y con los de Padmanabhan y col (1992), en los cuales no se observó un aumento significativo en la secreción pulsátil de FSH durante el pe-

ríodo prepuberal en borregas con crecimiento normal. Estos resultados sugieren que la FSH tendría un rol secundario en el inicio de la pubertad de la oveja. Sin embargo, la demostración de varias isoformas de FSH ha llevado a postular que la FSH bioactiva sería un factor determinante en los eventos endocrinos que anteceden a la pubertad y que la FSH inmunorreactiva no sería un buen indicador de los cambios conducentes a la pubertad. McNatty y col (1998) compararon las concentraciones de FSH inmunorreactiva (medida por RIA) de aquella bioactiva desde el nacimiento al año de vida en ovejas, encontrando que en las hembras ovinas prepúberes la relación B/I de FSH se acerca a uno hasta la fecha promedio de inicio de la pubertad, pero que después la FSH inmunorreactiva desciende hasta el límite del ensayo, lo cual sugiere que la FSH bioactiva tampoco es un factor determinante en el inicio de la pubertad en la oveja.

Este estudio permite respaldar experimentalmente el uso del análogo agonista de GnRH Decapeptyl como una valiosa herramienta en estudios de la secreción de LH y FSH en ovinos, ya que su acción bloqueadora en la secreción de LH se ha demostrado en trabajos anteriores (Recabarren y col 2002), así como en otros animales de experimentación (Recabarren y col 1991). La ventaja de este recurso farmacológico es la frecuencia de uso. Basta una inyección intramuscular cada cuatro semanas para mantener bloqueada la secreción de gonadotropinas. El uso de antagonistas de receptores de GnRH no parece ser eficaz en disminuir la secreción de FSH, al menos en ovejas adultas. La aplicación de un antagonista de receptores de GnRH tiene poco efecto sobre la secreción aguda de FSH, mientras que suprime rápidamente la secreción de LH, calculándose que toma alrededor de 11 días con administración diaria del antagonista por cuatro días en provocar la disminución en la secreción de FSH (Campbell y col 1998). En vacas la aplicación de un antagonista de GnRH (Antarelix) no modificó el promedio de las concentraciones plasmáticas ni la frecuencia de los pulsos de FSH (Schneider y col 2002), por lo que se podría esperar que el uso de antagonistas no entregue resultados concluyentes sobre la secreción de FSH en ovejas prepúberes. Más aún, el antagonista de GnRH no impidió que un pulso de GnRH exógena estimulara la secreción de LH. Basándose en este antecedente y para evitar el efecto estimulador inicial de la acción del agonista de GnRH, los estudios de pulsatilidad se efectuaron dos semanas más tarde de su aplicación. La base fisiológica del efecto de agonistas de GnRH en la supresión de la secreción de gonadotropinas estaría en la desensibilización del gonadotropo que sigue a una estimulación más potente que la obtenida con el neuropéptido endógeno y que comprende pérdida de receptores, y disminución de la síntesis de mRNA del receptor de GnRH (Wu y col 1994, Viscarra y col 1997, Horvath y col 2002) y bloqueo de la síntesis de las ca-

denas beta de la LH y FSH (Aspden y col 1996, Turzillo y col 1998). En ratas se ha demostrado que el Decapeptyl disminuye la expresión del gen para los receptores de GnRH *in vivo* (Lerrant y col 1995). Estudios similares con Decapeptyl no se han realizado en ovinos; sin embargo, la administración de leuprolide, un análogo agonista de la GnRH, disminuyó el mRNA del receptor de GnRH en hipófisis de ovejas (Wu y col 1994). La administración de Decapeptyl redujo en más de un 50% la concentración del mRNA de la cadena beta de la FSH y LH en ratas (Lerrant y col 1995), lo cual explicaría la disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de FSH observada en el presente estudio.

El análisis de la secreción de FSH utilizando metodologías complejas como el muestreo directo de la sangre del seno cavernoso (Clarke y col 2002) o de la sangre portal que conduce a la hipófisis anterior (Padmanabhan y col 1997, 2003) en ovejas adultas ovariectomizadas muestra que la secreción de FSH es episódica y que algunos pulsos son sincrónicos con LH. En el estudio de Clarke y col (2002) un 13% de los pulsos son sincrónicos con los de LH, mientras que en el estudio de Padmanabhan y col (2003) se reconoció un 50% de concordancia. Estos resultados sugieren que un número variable de pulsos no depende de la secreción previa de GnRH y que otros mecanismos pueden dar cuenta de esta secreción no GnRH dependiente. En el presente estudio es difícil definir si cada pulso de FSH es la consecuencia de la secreción previa de un pulso de GnRH, ya que estos se presentan en forma irregular y aleatoria y sin un ritmo episódico, lo cual concuerda con resultados de Pincus y col (1998) en ovejas y mujeres. Este patrón de secreción es diferente del que presenta la hormona luteinizante y la GnRH con pulsos episódicos bien definidos. Sin embargo, el descenso significativo en las concentraciones promedio y en la amplitud de pulsos de FSH en las borregas tratadas con el agonista de GnRH sugiere fuertemente que la secreción de FSH es dependiente de GnRH.

En resumen, los resultados del presente estudio sugieren que la secreción de FSH es dependiente de la estimulación por GnRH en ovejas prepúberes.

## RESUMEN

La secreción de LH y FSH depende de la liberación pulsátil de GnRH desde el hipotálamo; sin embargo, el grado de dependencia así como la relación entre los pulsos de GnRH y la secreción de FSH es menos clara. Experimentos en monos han mostrado que altas frecuencias de liberación de pulsos de GnRH estimulan preferentemente la secreción de LH, mientras que bajas frecuencias de pulsos de GnRH favorecen la secreción de FSH. Estudios sobre el control de la secreción de FSH en ovejas prepúberes son escasos. Con el objetivo de reconocer la dependencia de la secreción de FSH por parte de la GnRH, se administró un análogo de GnRH en microcápsulas de liberación lenta (Trp6-GnRH, Decapeptyl®) y cuyo efecto bloqueador

sobre la secreción de LH ha sido demostrado. El análogo se administró intramuscularmente cada cuatro semanas a partir de las 20 semanas de edad a cinco borregas Suffolk por tres veces. Otro grupo de ovejas prepúberes de las mismas edades recibió el vehículo. Estudios de pulsatilidad de FSH se efectuaron a las, 20, 26 y 30 semanas de edad. Se utilizó el programa Cluster para reconocer las características de la secreción pulsátil de FSH. En las borregas del grupo control no hubo cambios en las características de la secreción pulsátil de FSH entre las 20 y 30 semanas de edad. En el grupo tratado con el análogo de GnRH, las concentraciones plasmáticas de FSH disminuyeron desde  $3,4 \pm 0,3$  ng/mL/5h a las 20 semanas de edad hasta los  $0,36 \pm 0,1$  ng/mL/5h a las 30 semanas de edad ( $p < 0,05$ ), concentración significativamente menor que en el grupo control. La amplitud de los pulsos disminuyó desde  $4,4 \pm 0,5$  a  $0,5 \pm 0,1$  ng/mL a las 30 semanas de edad ( $p < 0,05$ ), la cual fue menor que la exhibida por las borregas de la misma edad del grupo control. La frecuencia no cambió ( $2,5 \pm 0,5$  y  $2,4 \pm 0,2$  pulsos/5h). Los resultados permiten concluir que el análogo de GnRH de liberación lenta es capaz de bloquear la secreción de FSH, lo que sugiere que la secreción de FSH es dependiente de GnRH en ovejas prepúberes. La frecuencia de pulsos de FSH no se modificó con el análogo de GnRH.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr A. Parlow y a la NIADDK de Estados Unidos por su generosa donación de reactivos para el RIA de FSH de oveja.

## REFERENCIAS

- Aspden WJ, A Rao, PT Scott, IJ Clarke, TE Trigg, J Walsh, MJ D'Occhio. 1996. Direct actions of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, deslorelin, on anterior pituitary contents of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), LH and FSH subunit messenger ribonucleic acid, and plasma concentrations of LH and FSH in castrated male cattle. *Biol Reprod* 55, 386-392.
- Campbell, BK, GE Mann, AS McNeilly, DT Baird. 1990. The pattern of ovarian inhibin, estradiol and androstenedione secretion during the estrous cycle in the ewe. *Endocrinology* 127, 227-235.
- Campbell BK, H Dobson, RJ Scaramuzzi. 1998. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH-antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *J Endocrinol* 156, 213-222.
- Campbell BK, EE Telfer, R Webb, DT Baird. 2004. Evidence of a role for follicle-stimulating hormone in controlling the rate of preantral follicle development in sheep. *Endocrinology* 145, 18870-1879.
- Carroll RS, PM Kowash, JA Lofgren, RH Schwall, WW Chin. 1991. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology* 129, 3299-3304.
- Clarke I, L Moore, J Veldhuis. 2002. Intensive direct cavernous sinus sampling identifies high-frequency, nearly random patterns of FSH secretion in ovariectomized ewes: combined appraisal by RIA and bioassay. *Endocrinology* 143, 117-129.

- Fortune JE, J Sirois, AM Turzillo, M Lavoie. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J Reprod Fertil* 43, 187-198.
- Haisenleder DJ, AC Dalkin, GA Ortolano, JC Marshall, MA Shupnik. 1991. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*. *Endocrinology* 128, 509-517.
- Horvath JE, AM Bajo, AV Schally, M Kovacs, F Herbert, K Groot. 2002. Effects of long-term treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Decapeptyl and the LHRH antagonist Cetrorelix on the levels of pituitary LHRH receptors and their mRNA expression in rats. *Proc Nat Acad Sci* 99, 15048-15053.
- Kaiser UB, PM Conn, WW Chin. 1997. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 18, 46-70.
- Kilgour RJ, C Pisselet, MP Dubois, M Courot. 1998. Ram lambs need FSH for normal testicular growth, Sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. *Reprod Nutr Dev* 38, 539-550.
- Kraus S, Z Naor, R Seger. 2001. Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res* 32, 499-509.
- Lerrant Y, ML Kottler, F Bergametti, M Moumni, J Blumberg-Tick, R Counis. 1995. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitisation in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 136, 2803-2808.
- Leung K, AH Kaynard, BP Negrini, KE Kim, RA Mauer, TD Landefeld. 1987. Regulation of gonadotropin subunit gene expression by GnRH pulse frequency in ewes. *Mol Endocrinol* 1, 724-728.
- Lumpkin MD, JK McDonald, WK Samson, SM McCann. 1989. Destruction of the dorsal anterior hypothalamic region suppresses pulsatile release of follicle stimulating hormone but not luteinizing hormone. *Neuroendocrinology* 50, 229-235.
- Marubayashi U, WH Yu, SM McCann. 1999. Median eminence lesions reveal separate hypothalamic control of pulsatile follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release. *Proc Soc Exp Biol Med* 220, 139-146.
- McCann SM, S Karanth, CA Mastronardi, W Les Dees, G Childs, B Miller, S Sower, WH Yu. 2001. Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating, hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone and leptin. *Arch Med Res* 32, 476-485.
- McNatty KP, KL Isaacs, L Gentle, L Berry, NL Hudson, W Young, BJ McLeod. 1998. Bioactive and immunoreactive FSH concentrations in ewe and ram lambs over the first year of life. *Anim Reprod Sci* 51, 155-166.
- Molter-Gerard C, J Fontaine, S Guerin, C Taragnat. 1999. Differential regulation of the gonadotropin storage pattern by gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the ewe. *Biol Reprod* 60, 1224-1230.
- Naor Z. 1990. Signal transduction mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilizing hormones: the case of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 11, 326-353.
- Padmanabhan V, CD Miehler, M Borondy, H Ianson, RI Wood, TD Landefeld, DL Foster, IZ Beitins. 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, K Mcfadden, DT Mauger, FJ Karsh, A Rees Midgley Jr. 1997. Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion. I. Direct evidence for separate episodic and basal components of FSH secretion. *Endocrinology* 138, 424-432.
- Padmanabhan V, MB Brown, GE Dahl, NP Evans, FJ Karsch, DT Mauger, JD Neill, JD Van Cleeff. 2003. Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone (FSH) secretion: III. Is there a gonadotropin-releasing hormone-independent component of episodic FSH secretion in ovariectomized and luteal phase ewes? *Endocrinology* 144, 1380-1392.
- Pincus SM, V Padmanabhan, W Lemon, J Randolph, A Rees Midgley. 1998. Follicle-stimulating hormone is secreted more irregularly than luteinizing hormone in both humans and sheep. *J Clin Invest* 101, 1318-1324.
- Recabarren SE, R Ditttrich, W Jäger, L Wildt. 1991. Luteinizing hormone immunoactivity and bioactivity in ovariectomized rats treated with a long acting agonist of luteinizing hormone releasing hormone. *Hum Reprod* 6, 928-930.
- Recabarren SE, A Urrucelqui, M Robbiano, A Lobos, P Orellana, J Parilo. 1995. Efecto de la infusión endovenosa de L-arginina y L-ornitina sobre la secreción de hormona del crecimiento en ovejas prepúberes. *Arch Med Vet* 27, 99-104.
- Recabarren SE, A Lobos, C Vilches, P Muñoz, T Sir Petermann. 2002. Pulsatile leptin secretion is independent of LH secretion in prepubertal sheep. *Endocrine* 17, 175-184.
- Recabarren SE, Lobos A, Poblete O, Muñoz P, Parilo J. 2003. Secreción pulsátil de la hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes con y sin restricción alimenticia. *Arch Med Vet* 35, 151-158.
- Schneider F, A Bellmann, F Becker, S Bambang Poernomo, C Rehfeld, G Nurnberg, W Kanitz. 2002. Gonadotropin release in periovulatory heifers after GnRH analogs measured by two types of immunoassays. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110, 235-244.
- Stojilkovic SS, KJ Catt. 1995. Novel aspects of GnRH-induced intracellular signalling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Neuroendocrinol* 7, 739-757.
- Turzillo A.M, TE Nolan, TM Nett. 1998. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in sheep: Interaction of GnRH and estradiol. *Endocrinology* 139, 4890-4894.
- Veldhuis JD, ML Johnson. 1986. Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 250, E486-E493.
- Viscarra JA, RP Wettemann, DT Braden, AM Turzillo, TM Nett. 1997. Effect of gonadotropin-releasing hormone (gnRH) pulse frequency on serum and pituitary concentrations of luteinizing and follicle-stimulating hormone, GnRH receptors, and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in cows. *Endocrinology* 138, 594-601.

Wildt L, A Häusler, G Marshall, JS Hutchison, TM Plant, PE Belchetz, E Knobil. 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109, 376-385.

Wu JC, SC Sealfon, WL Miller. 1994. Gonadal hormones and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) alter messenger

ribonucleic acid levels for GnRH receptors in sheep. *Endocrinology* 134, 1846-1850.

Yu WH, S Karanth, CA Mastrorade, S Sealfon, C Dean, WL Dees, SM McCann. 2002. Lamprey GnRH-III acts on its putative receptor via nitric oxide to release follicle-stimulating hormone specifically. *Exp Biol Med* (Maywood) 227, 786-793.