

24
233



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLOGICA DE

LA FSH DEL RATON Mus musculus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Química Farmacéutica Bióloga

P R E S E N T A:

Dalia Yazmir Castro Gutierrez

México D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Prof. Guadalupe Vélez Pratt
Vocal	Dra. M. Irma Villalpando-Fierro
Secretario	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas
1er. suplente	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
2do. suplente	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruiz

Asesor del tema

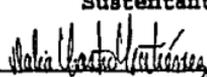


Dra. M. Irma Villalpando-Fierro



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

Sustentante



Dalia Yazmir Castro Gutiérrez

A LA MEMORIA DE MIS PADRES

PROFRA. BLANDINA GUTIERREZ TORREBLANCA

ACT. H. AVELINO CASTRO DOMINGUEZ

A MIS HERMANOS JORGE ALFONSO,

JAVIER, DERVY ANTONIO,

DAVID Y FIDEL

A MI ESPOSO, LIC. SERGIO MUÑIZ CHAVEZ.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,
y en especial a la Facultad de Química,
por haberme brindado la oportunidad de
realizar mis estudios profesionales

A TODOS MIS MAESTROS
Por su valiosa ayuda y consejos
otorgados.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Desarrollo en el Laboratorio de Embriología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Irma Villalpando Fierro.

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA por la beca otorgada para realizar esta tesis así como por el donativo IN20-4193 que sirvió para apoyar parcialmente el desarrollo de este trabajo.

A Marta Elizabeth Carranza del Instituto de Neurobiología de la UNAM por su invaluable ayuda, experiencia y asesoramiento en la purificación de la FSH de ratón.

A la Dra. Angélica Salas Valdés del Instituto de Neurobiología de la UNAM por las facilidades otorgadas durante la purificación de la hormona estimulante del folículo.

Al Químico Mario Cárdenas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Salvador Subirán por su ayuda y experiencia con el radioinmunoensayo para la FSH y LH.

Al fotógrafo Jorge Hernández Juárez por las excelentes reproducciones fotográficas

Al dibujante Rafael Maturano Avila por su excelente apoyo para elaborar las tablas y las gráficas de esta tesis.

A la Química Lourdes Arcos del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por su ayuda en los experimentos de autorradiografía.

Al Dr. Pedro Nicolás del Departamento de Histología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su enorme apoyo para realizar los experimentos de Cultivo Celular.

Al Dr. Damian Matsumara del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-Iztapalapa por su invaluable conocimiento y experiencia para marcar la FSH.

Al Dr. Alfredo Ulloa Aguirre del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto de la Nutrición Salvador Zubirán por todo el apoyo brindado para realizar el marcado de las gonadotropinas y los experimentos de radioinmunoensayo.

INDICE

I.	RESUMEN.....	3
II.	INTRODUCCION.....	4-5
1.	La glándula pituitaria.....	5-6
1.1.	Receptores a gonadotropinas.....	7
1.2.	Estructura de la hormonas hipofisarias.....	8
1.3.	Composición de aminoácidos de la FSH en mamíferos.....	9-10
2.	Purificación de la FSH en diferentes grupos de vertebrados..	10
	a). Peces, anfibios y reptiles.....	10-11
	b). Aves.....	10-11
	c). Mamíferos.....	11
2.1.	Métodos de estudio.....	11-12
2.2.	Potencia biológica de la FSH.....	12-14
2.3.	Peso molecular de la FSH en los mamíferos.....	14-16
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
IV.	OBJETIVOS.....	18
V.	MATERIAL y METODOS.....	19
1.	Material biológico.....	19
1.1.	Reactivos químicos.....	19
1.2.	Métodos.....	20-22
	a). Homogenización.....	20

b).	Diálisis.....	20
c).	Precipitación etanólica.....	22
d).	Diálisis II.....	22
e).	Diálisis III.....	22
f).	Liofilización.....	23
1.3	Cromatografía de intercambio iónico.....	24
2.	Cuantificación de proteínas.....	24-25
2.1.	Preparación y rango de la curva estándar para proteínas.....	24-25
2.2.	Caracterización Inmunológica de la FSH de Ratón.....	25-26
a).	SLOT-ELISA.....	28
b).	Electroforesis en SDS-PAGE.....	29
c).	Tinción del gel con azul de Coomasie.....	30
d).	Decoloración del gel.....	30
e).	Tinción con la técnica de plata.....	30
2.3.	Evaluación de la actividad inmunológica de la mFSH.....	31
a).	Marcado de la mFSH por el método de cloramina T..	35-36
b).	Determinación de la actividad específica de la hormona yodada.....	31
c).	Rango y preparación de la curva estándar de FSH.....	32
d).	Radioinmunoensayo.....	32
3.	Determinación del peso molecular de la mFSH.....	35
a).	Marcado de la mFSH por el método de lactoperoxidasa....	35

b). Autorradiografía.....	36
3.1. Actividad biológica de la mFSH.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
1. Extracción.....	37
1.1. Rendimiento de la mFSH.....	38
1.2. Cromatografía de intercambio catiónico.....	38-40
1.3. Movilidad electroforética de la mFSH.....	41-43
2. Grado de pureza.....	44
2.1 Actividad inmunológica	45
a). SLOT-ELISA.....	45-46
b). Radioinmuncensayo.....	45-49
2.3 Peso molecular de la.....	50-52
VII. DISCUSION.....	53-62
VIII. CONCLUSIONES.....	63
IX. BIBLIOGRAFIA.....	64-71
X. APENDICE.....	72-84

Abreviaturas

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases	NIDDK
Rat follicle stimulating hormone antiserum rabbit NIDDK	NIDDK-anti-rFSH-S-11 (AFP-CO972881)
Rat follicle stimulating hormone	NIDDK-rFSH-I-8 (AFP-11454B)
Rat follicle stimulating hormone	NIDDK-rFSH-RP-2 (AFP-4621B)
Rat luteinizing hormone	NIDDK-rLH-I-8 (AFP-11536B)
Rat luteinizing hormone	NIDDK-rLH-RP-3 (AFP-7187B)
Rat luteinizing hormone antiserum rabbit NIDDK	NIDDK-rLH-I-8 NIDDK- anti-rLH-S-10
Bovine serum albumine	BSA
Carboximetil	CM
Cromatografía líquida de alta presión	HPLC
Dietil amino etil	DEAE
Dodecil sulfato de sodio	SDS
Densidad óptica	D.O
Fenil metil sulfonil fluoruro	PMSF
Hormona estimulante del folículo	FSH
FSH de ratón	mFSH

FSH humana	hFSH
Filtración en gel	FG
Gonadotropina coriónica humana	HCG
Kilodaltons	Kd
Hormona luteinizante	LH
Hormona estimulante del tiroides	TSH
Hormona de crecimiento	GH
LH de rata del National Institute of Digestive and Kidney Diseases	NIDDK-rLH-RP2
Ultracentrifugación	ULT
Microcuries	μ Ci
Movilidad electroforética relativa	Rf
N,N,N,N, tetrametilandiamina	TEMED
Peso molecular	PM
Punto isoelectrico	PI
Prolactina	PRL

I. RESUMEN

En la presente investigación se describe la purificación de la mFSH y la caracterización parcial de la misma. La hormona se aisló por diálisis en una mezcla de etanol y acetato de amonio 6:4, pH 5.1 y cromatografía de intercambio iónico. Se determinó que el rendimiento de la hormona fue de 19.417 $\mu\text{g/g}$ de tejido y la actividad específica de la misma fue de 209 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de proteína. Se analizaron algunas propiedades bioquímicas de la mFSH como el Rf de esta hormona por electroforesis en SDS-PAGE y se determinaron dos bandas de 0.30 y 0.36, cuyo valor fue similar al de la FSH reportada en otras especies. La hormona demostró ser inmunológicamente reconocida en un RIA heterólogo y por SLOT-ELISA.

El PM probable de la mFSH determinado por electroforesis en SDS-PAGE en condiciones reductoras fue de 52, 134 Kd y el de las subunidades α , β , 20,176 y 14,052 Kd respectivamente. Lo cual sugiere que el PM de la mFSH es semejante al observado en otros vertebrados.

La potencia biológica de la mFSH fue de 9.43 comparada con la potencia del estándar NIDDK-rFSH RP-1. La actividad biológica de la mFSH fue evaluada en un microensayo *in vitro*. Esta hormona indujo la proliferación y la síntesis de 17- β estradiol a una concentración de 200 μg en células de la fracción F6 de pollo (homólogas a las foliculares de mamífero).

II. INTRODUCCION

El ciclo de vida de un organismo está determinado por su capacidad de integrar diversas funciones que dependen del sistema nervioso y del sistema endócrino. Cada uno de éstos se comunican con otros órganos a través de mensajes que son enviados hacia un órgano blanco, lo cual induce un aumento o disminución en la actividad o función del mismo. En el sistema nervioso los mensajes son transmitidos por impulsos eléctricos a través de la sinápsis de una neurona a otra, o entre una neurona y una célula no nerviosa. Se ha demostrado ampliamente que la transmisión sináptica es de carácter químico debido a que en este proceso se liberan mensajeros específicos como los neurotransmisores, los cuales desencadenan potenciales sinápticos y una respuesta inmediata. En el sistema endócrino los mensajeros son sustancias químicas llamadas hormonas que llevan información a otro órgano que normalmente se encuentra a cierta distancia. Las hormonas del sistema endócrino son vertidas al torrente circulatorio y de ahí se dirigen al órgano blanco. Este tipo de mensaje produce una respuesta más lenta que los impulsos nerviosos y ejerce su efecto sobre el sistema metabólico de la célula, induciendo

cambios en la síntesis y secreción de proteínas o enzimas que participan en diversas funciones (73).

El sistema endócrino esta constituido por glándulas endócrinas, una de éstas es la glándula pituitaria o hipófisis, la cual produce diferentes hormonas con múltiples funciones que mantienen la homeóstasis en el organismo (1,73).

1. La Glándula Pituitaria

La hipófisis, también llamada glándula pituitaria, está localizada inmediatamente por debajo de la base del encéfalo unida a éste por el tallo hipofisiario y está protegida por la silla turca del hueso esfenoides (26). La hipófisis está rodeada por una membrana de tejido conectivo llamada duramadre y anatómicamente está dividida en cuatro regiones: pars anterior, pars tuberalis, pars intermedia y pars posterior (26, 73). Desde el punto de vista embriológico es una glándula mixta, se divide en dos regiones: la adenohipófisis y la neurohipófisis. La primera se desarrolla a partir de una evaginación del ectodermo llamada bolsa de Rathke, mientras que el infundíbulo o tallo neural y el lóbulo posterior derivan del piso del cerebro anterior (26). La adenohipófisis está formada de diferentes tipos celulares los cuales sintetizan

hormonas que intervienen en diversas funciones en el organismo (1, 44, 73). El nombre de cada una de éstas y sus funciones se muestran en la tabla 1.

Entre las hormonas producidas por la adenohipófisis que juegan un papel determinante en la función reproductora, están las gonadotropinas, la FSH y la LH, las cuales reciben este nombre debido a que sus órganos blanco son las gónadas; el ovario y el testículo (44, 73)

1.1. Receptores a gonadotropinas

Se ha demostrado que las hormonas hipofisarias se enlazan a receptores membranales de las células de los órganos blanco, activando el sistema enzimático adenilato-ciclase (16,73), éste a su vez estimula el sistema de proteínas cinasas las cuales inducen la síntesis de RNAs mensajeros de enzimas que intervienen en la biosíntesis de hormonas esteroides. Los receptores para FSH están presentes en las células de la granulosa en el ovario (65). La FSH estimula la actividad de la aromatasa (enzima que convierte los andrógenos a estrógenos) e induce la síntesis de estrógenos; necesarios para la síntesis de receptores a LH y la citodiferenciación de las células de la granulosa en el ovario (15).

Hormonas Producidas en la Hipofisis

LOBULO ANTERIOR	FUNCIONES
HORMONA ESTIMULANTE DEL TIROIDES TIROTROPINA (TSH)	ESTIMULA EL CRECIMIENTO Y LA SECRECIÓN DE LA GLANDULA TIROIDES
HORMONA ADRENOCORTICOTROPICA ó CORTICOTROPINA (ACTH)	ESTIMULA LA SECRECIÓN Y EL CRECIMIENTO CORTICAL DE LA SUPRARRENAL.
HORMONA DE CRECIMIENTO SOMATOTROPINA (GH)	ACELERA EL CRECIMIENTO DEL CUERPO.
HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (FSH)	ESTIMULA EL CRECIMIENTO DEL FOLICULO EN EL OVARIO EN LA HEMBRA Y LA ESPERMATOGENESIS EN EL MACHO.
HORMONA LUTEINIZANTE (LH)	INDUCE LA OVULACION Y LUTEINIZACION DE LOS FOLICULOS OVARIOS EN LA HEMBRA Y LA SECRECIÓN DE TESTOSTERONA EN EL MACHO.
PROLACTINA U HORMONA LACTOGENA (PRL)	PROVOCA LA SECRECIÓN DE LECHE Y LA CONDUCTA MATERNA. MANTIENE EL CUERPO LUTEO EN LOS ROEDORES HEMBRAS, PERO NO EN OTRAS ESPECIES.
LOBULO INTERMEDIO	
HORMONAS ESTIMULANTES α y β DE LOS MELANOCITOS	EXPONEN LOS MELANOFOROS
LOBULO POSTERIOR	
VASOPRESINA U HORMONA ANTIURETICA (ADH)	PROMUEVE LA RETENCIÓN DE AGUA.
OXITOCINA	CAUSA LA LIBERACION DE LA LECHE.

Modificada del Libro de Fisiología Médica de
 Ganong F.1980

1.2. Estructura de las Hormonas Hipofisiarias

Las hormonas hipofisiarias son glicoproteínas que están formadas de proteínas y de diferentes tipos de carbohidratos. Desde el punto de vista estructural las hormonas glicoprotéicas están compuestas de dos subunidades, la subunidad α y la β y ambas están unidas por un enlace disulfuro. La subunidad α es idéntica en la FSH, LH y TSH, y la subunidad β es específica para cada una de estas hormonas y es la responsable de la actividad biológica de las mismas (44). Entre las gonadotropinas existe una sobreposición de la subunidad β de la LH y de la HCG, producida en el trofoblasto del blastocisto; debido a esto ambas tienen una actividad biológica similar (44). Se ha visto que si se combina una subunidad α de TSH y una subunidad β de FSH la hormona tiene actividad de FSH (44). Los carbohidratos que forman la FSH humana hFSH son hexosa, hexosamina y ácido siálico (59). La composición del tipo de carbohidratos que forman esta hormona, se ha comparado con la de otras especies y se ha visto que entre ellas, existe homología en el contenido de azúcares (9, 11, 17, 45, 47). La FSH bovina contiene fucosa (45) y posee dos veces más galactosamina y 66% de ácido siálico comparada con la FSH ovina (23) y la humana (59).

1.3. Composición de Aminoácidos de la FSH

La FSH humana tiene un contenido alto de ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, alanina, fenilalanina, lisina e histidina serina y menor cantidad de cisteína, prolina, valina y tirosina (59,67). Estudios hechos en filtración de geles y electroforesis muestran que la hFSH contiene 3.7 veces más ácido siálico y 2.9 veces más hexosamina que la hLH (59). Se ha visto que hay una homología alta entre en el contenido de aminoácidos de la FSH en los diferentes grupos de vertebrados (18,45, 47, 51, 68, 69, 82). Sin embargo, hay diferencias específicas de especie (9, 11, 17, 18, 31,32,33, 45, 51).

La FSH bovina tiene grandes cantidades de ácido aspártico, treonina, ácido glutámico y la mitad de cisteína, lisina y bajas cantidades de metionina, histidina y triptófano (23). Se sabe que la FSH equina es análoga a la hFSH excepto por la sustitución de 6 aminoácidos (18). La alta homología en la secuencia de aminoácidos de la subunidad β parece ser similar a nivel de interespecie, mientras que la unidad α parece variar en el contenido de aminoácidos en los diferentes grupos de vertebrados (18, 31, 32,

33,51, 69). Se ha visto que los determinantes antigénicos de la subunidad α de la hFSH son los residuos 21 -23 y 76-85 (3).

2. Purificación de la FSH en diferentes grupos de vertebrados

a). Peces, anfibios y reptiles

La purificación y aislamiento de la FSH se ha estudiado en diversos grupos de vertebrados. Sin embargo, hasta el presente hay pocas investigaciones realizadas en peces (2, 12), anfibios (31, 32, 33, 39) y reptiles (39, 40, 41).

b). Aves

En este grupo de vertebrados inferiores se ha investigado más sobre la purificación de hormonas hipofisiarias, la FSH de pollo de diferente pureza se ha aislado en varios grupos (8, 9, 17, 28, 37, 47, 83).

Los métodos utilizados para la separación de la FSH en esta especie son muy diversos. Algunos investigadores han hecho una extracción inicial con amortiguador de salina fosfatos (83), solución etanólica (9), fosfato de calcio (28,76), acetato de amonio

(9, 17, 28), fraccionamiento con sulfato de amonio (9, 17) y ácido metafosfórico (47, 83). Después de la extracción la FSH se ha separado por uno o varios métodos como cromatografía en columnas de fosfato de calcio (30,76), intercambio iónico con la resina C50 (9,17), CM-celulosa, (30, 76, 83), DEAE (9, 30, 47). Así como HPLC (37), cromatografía en columnas de hidroxiapatita (83), Sephadex G-75 (83), Sephadex G-100 (9,17) y G-150 (83).

c) Mamíferos

El grupo que más se ha estudiado en los vertebrados es el de los mamíferos; en éste la separación y purificación de las gonadotropinas se ha demostrado en el humano (10, 22, 28, 49, 55, 56, 58,59, 60, 61, 64, 66, 67, 68, 71), bovinos (23, 24, 52, 57, 64,82), ovinos (11, 23, 24, 36, 53, 56, 81), cerdos (54) caprinos (7, 18, 36, 77, 81,84), caninos (29,64), lagomorfos (64) y roedores (64, 78).

2.1. Métodos de Estudio

Las técnicas de purificación de las gonadotropinas en los mamíferos son también muy variadas e incluyen una extracción inicial de las glicoproteínas con una solución etanólica (60,77),

amortiguador de acetatos y alcohol (23, 29,36), agua de pH 5.5 a 7.5. (28,77), urea (11). Asi como por fraccionamiento a varios pHs (11), con ácido metafosfórico (23) y con diferentes concentraciones de sulfato de amonio (36, 64, 81,82).

Posteriormente la FSH se ha separado y caracterizado por DEAE Celulosa (30, 54, 64, 67,81), CM-Sephadex (7, 23), CM-celulosa (29), filtración en geles en Sephadex G-100 (7, 23), Sephadex G25 (11), G-50 (23), G-75 (23), G-100 (7, 82), Sephadex G-150 (63). electroforesis en discos preparativos a pH 8.9 (7, 23) y electroforesis zonal (11).

Asimismo, se ha visto que a pH 4.0 algunas proteínas activas pueden estar contaminando significativamente las preparaciones de gonadotropinas de ovinos y humanos. Sin embargo, no se han encontrado relaciones causales entre el grado de contaminación de la enzima y la pérdida de la actividad biológica de varias gonadotropinas (56).

2.2. Potencia Biológica de la FSH

La potencia biológica de la FSH se ha evaluado empleando diferentes estándares de FSH como: NIH-FSH-S1, 264-151X, y HMG-24. Los valores obtenidos en cada grupo de investigación son muy variables. Entre los

valores más bajos, están los de la FSH bovina (57), éstos resultados están de acuerdo con los determinados en dos fracciones de FSH ovina con un valor de 0.8 y 1.4 respectivamente (53). Sin embargo, estos difieren de los encontrados en la hFSH, la cual tuvo una potencia de 29 veces el estándar NIH-FSH-S1 (66). En la FSH bovina el valor demostrado es de 43 veces el del estándar NIH-FSH-S1 (11,23), en esta especie se determinaron tres fracciones cuya actividad biológica fue de 61, 25 y 29 veces el del estándar FSH-NIH-S1 (82). En la FSH ovina la potencia es de 45.7 veces mayor que el estándar del NIH-FSH-S1 (11,45). El valor más alto determinado en la FSH equina es de 90 mg por unidad de estándar (7) y el determinado en (66) de 150 a 200 veces la potencia del NIH-FSH-S1, estos resultados son semejantes a los demostrados en la FSH ovina (78).

Los estudios realizados con el estándar RMG-24 en la hFSH tuvieron un valor de 5820 veces mayor que el del estándar NIH-FSH-S1 (56).

Con respecto a la actividad biológica, la FSH purificada se ha evaluado de acuerdo al ensayo de en receptores membranales (79) o en un bioensayo a través del incremento del peso en el ovario, testículo, útero, próstata ventral y vesícula seminal en ratas

valores más bajos, están los de la FSH bovina (57), éstos resultados están de acuerdo con los determinados en dos fracciones de FSH ovina con un valor de 0.8 y 1.4 respectivamente (53). Sin embargo, estos difieren de los encontrados en la hFSH, la cual tuvo una potencia de 29 veces el estándar NIH-FSH-S1 (66). En la FSH bovina el valor demostrado es de 43 veces el del estándar NIH-FSH-S1 (11,23), en esta especie se determinaron tres fracciones cuya actividad biológica fue de 61, 25 y 29 veces el del estándar FSH-NIH-S1 (82). En la FSH ovina la potencia es de 45.7 veces mayor que el estándar del NIH-FSH-S1 (11,45). El valor más alto determinado en la FSH equina es de 90 mg por unidad de estándar (7) y el determinado en (66) de 150 a 200 veces la potencia del NIH-FSH-S1, estos resultados son semejantes a los demostrados en la FSH ovina (78).

Los estudios realizados con el estándar HMG-24 en la hFSH tuvieron un valor de 5820 veces mayor que el del estándar NHI-FSH-S1 (56).

Con respecto a la actividad biológica, la FSH purificada se ha evaluado de acuerdo al ensayo de en receptores membranales (79) o en un bioensayo a través del incremento del peso en el ovario, testículo, útero, próstata ventral y vesícula seminal en ratas

hipofisectomizadas (72,78). Asimismo la capacidad de la FSH para inducir la síntesis de estrógenos se ha ensayado en cultivos celulares (80).

2.3. Peso Molecular

El PM es una propiedad física fundamental para caracterizar bioquímicamente cualquier proteína. Este puede variar mucho, lo cual va a depender de la técnica analítica empleada. En la determinación del PM de las gonadotropinas se han empleado diversas técnicas, entre las más usuales se encuentra la ultracentrifugación. Empleando esta técnica se encontró un valor de 41,000 Kd en la hFSH (67), similares resultados se obtuvieron en la equina (7,77), ovina (11,45), bovina (23) y porcina (71).

En los estudios de filtración en geles se ha visto que el PM de la FSH bovina es de 45,000 Kd (82) aunque también se ha demostrado un valor de 68,000 Kd (22).

Un método muy empleado para evaluar el PM de las gonadotropinas involucra el análisis en geles de acrilamida en SDS. En este método se utiliza además un agente reductor como el β -mercaptoetanol

que disocia los puentes disulfuro de las proteínas, lo cual permite analizar el peso molecular de los componentes monoméricos (38).

En el análisis en SDS de la hFSH en condiciones reductoras (61) se observan dos bandas, una de PM de 24,000 y otra de 48,000 Kd en la FSH bovina. El tratamiento de la hormona con ácido propiónico aparentemente disocia la hormona y sólo se ve una banda de 24,200 Kd (61). El valor observado para la FSH por los grupos citados anteriormente, por técnicas tan diferentes, coinciden con los demostrados en otros grupos de vertebrados inferiores (12, 31, 32, 33).

La tabla 2 resume los valores de peso molecular obtenidos para la FSH con diferentes técnicas en los mamíferos.

TABLA 2. Peso Molecular de la FSH en los Mamíferos

Autor	Especie	Técnica	PM
Reichter, 1968	Humana	ULT	17,000-68,000
Roos, 1967	"	"	41,000
Grimeck, 1979	bovina	ULT	33,200
Steelman, 1959	porcina	"	29,000
Papkoff, 1967	ovina	"	21,500-72,100
Cahill y col. 1968	"	"	32,095
Sherwood y MacShan, 1970	"	"	33,000
Braselton y MacShan, 1970	equina	FG	47,900
Gray, 1967	Bovina	FG	17,000-68,000
Braselton y MacShan, 1970	equina	"	47,900
Wu, 1993	Bovina	"	45,000
Reichter y Lawson, 1973	bovina	SDS-PAGE	24,000-48,000

Valores de los pesos moleculares obtenidos con diferentes técnicas en las diversas especies de vertebrados estudiados.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los procesos más importantes del ciclo de vida de cualquier organismo es la perpetuación de la especie a través de la reproducción. En los vertebrados inferiores y superiores la FHS y LH desempeñan una función muy importante en la conducta reproductora.

La hFSH se ha aislado y purificado debido a la importancia que tiene en la investigación clínica y básica. Esta hormona tiene usos múltiples entre los que se pueden citar el tratamiento de disfunciones hipofisarias y ováricas, inducir la maduración folicular para realizar la fertilización in vitro entre muchas otras. En los mamíferos la FSH se ha purificado y caracterizado desde el punto de vista físico, químico, bioquímico y biológico en diferentes grupos de mamíferos: ovinos, bovinos, equinos, caninos, lagomorfos y roedores. En estos últimos se han realizado trabajos sobre el aislamiento, purificación y caracterización de la FSH en rata. Sin embargo, se carece de este tipo de información en el ratón. En el presente trabajo se pretende aislar, purificar y caracterizar parcialmente la mFSH. La información que se obtenga será de relevancia para aislar y purificar esta hormona a gran escala y emplearla en investigación biomédica básica, que requiera de estándares de referencia para poder realizar todo tipo de experimentos. La disponibilidad de la mFSH y la de otras especies en un banco de hormonas en el país, ahorraría los trámites que se tienen que realizar para poder obtener estas hormonas del extranjero.

IV. OBJETIVOS

1. Aislar, purificar y caracterizar parcialmente a la mFSH
2. Demostrar la actividad biológica de esta hormona con métodos bioquímicos y por RIA.
3. Determinar su potencia inmunológica con respecto a estándares obtenidos del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
4. Determinar el peso molecular de la mFSH.
5. Evaluar la actividad biológica de la mFSH Purificada en un microensayo in vitro, empleando células de ovario de pollo.

V. MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico

La obtención de la mFSH se realizó de acuerdo al método reportado (27) con ligeras modificaciones. Se obtuvieron 1543 ratones adultos de la cepa CDI del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se sacrificaron por dislocación cervical, se decapitaron y se realizó un corte en los temporales dejando al descubierto el cerebro. Las hipófisis se aislaron de la silla turca del hueso esfenoides, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, se congelaron en hielo seco o nitrógeno líquido y fueron almacenadas en un ultracongelador de Forma Scientifica.

1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos empleados en esta investigación fueron grado analítico y el agua empleada fue destilada o desionizada en un sistema de destilación Millipore (Milli-Q). La preparación de soluciones se detalla en el apéndice (página 72).

2. METODOS

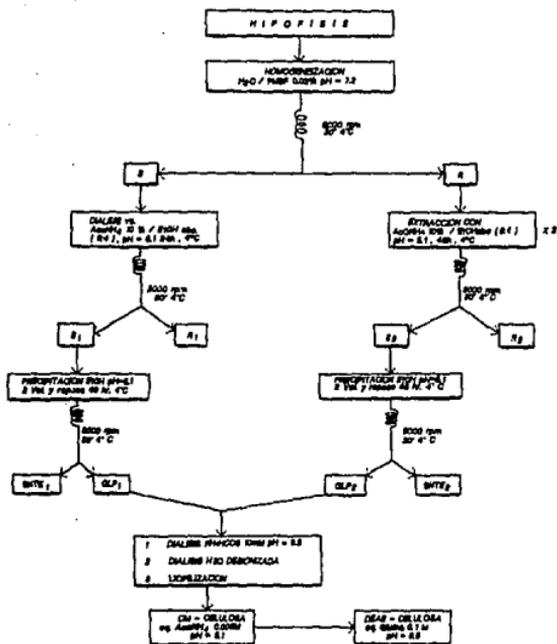
a). Homogenización

Las hipófisis se descongelaron a 4 °C, se pesaron en una balanza analítica Sartorius MC-1 y se obtuvieron 3.24145 g de peso húmedo. Debido al pequeño tamaño de las hipófisis no se pudo separar la neurohipófisis de la adenohipófisis. Las pituitarias se homogenizaron en un homogenizador Potter Elvehjen en 12 ml de una solución con PMSF al 0.02% P/V pH 7.2 con 10 golpes a temperatura ambiente. El volumen final del homogenado, (13.5) ml se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C, 30 minutos en una centrifuga Beckman modelo J-21B con un rotor de ángulo fijo J-A-2. Se obtuvo un precipitado y un sobrenadante los cuales se denominaron "S" y "R" respectivamente (figura 1).

b). Diálisis

Para purificar la FSH el sobrenadante "S" (11 ml) se dializó en 500 ml de acetato de amonio al 10% P/V y etanol absoluto 6:4 a pH 5.1, en agitación constante a 4 °C 24 horas. Después se centrifugó a 8000 rpm, 30 minutos a 4 °C. Se obtuvo un precipitado "S₁" y un sobrenadante "R₁", éste último se almacenó a -20 °C.

ESQUEMA DE EXTRACCION



B1B2 = BOMBARDANTE OBTENIDO A PARTIR DE LA PRECIPITACION ETANOLICA DEL DIALIZADO
 D1D2 = PRIMER EXTRACTO GLICOPROTEICO (14, PBL, TBL)
 D3D4 = SEGUNDO EXTRACTO GLICOPROTEICO (14, PBL, TBL)
 B3B4 = BOMBARDANTE OBTENIDO A PARTIR DE LA PRECIPITACION ETANOLICA DEL EXTRACTO

Figura. 1. Se ilustra el diagrama de flujo empleado en la homogeneización, extracción y purificación de la FSH de ratón y el nombre en cada una de las fracciones obtenidas.

c). Precipitación Etanólica

El sobrenadante "S₁" (12.4 ml) se precipitó con 2 volúmenes (25 ml) de etanol absoluto, agregado gota a gota en agitación constante. Se dejó reposar 48 horas a 4 °C y se centrifugó a 8000 rpm, 30 minutos a 4 °C. Se obtuvo un sobrenadante (SNTE₁), y un precipitado (GLP₁), éste se separó del sobrenadante por succión con vacío y se centrifugó 30 minutos a 8000 rpm a 4 °C.

d). Diálisis II

El precipitado GLP₁ se dializó con 500 ml de bicarbonato de amonio 10 mM pH 8.5, 36 horas a 4 °C. Durante este período se realizaron tres cambios de la solución cada 12 horas. Después se dializó con 500 ml de agua desionizada, 24 horas a 4 °C.

e). Diálisis III

Los extractos glicoprotéicos GLP₁ y GLP₂ se reunieron y se obtuvieron 8.90 mg. Se dializaron en 3 ml de bicarbonato de amonio 10 mM pH 8.5, durante 36 horas a 4 °C. Posteriormente se dializó con agua desionizada 12 horas a 4 °C. Se centrifugó a 5000 rpm, 4 minutos a temperatura ambiente en una microfuga "B" de Beckman. Se

colectaron 653 μ l de sobrenadante, se separó una alícuota de 53 μ l para cuantificar proteínas y los 600 μ l restantes se emplearon para realizar una cromatografía de intercambio catiónico.

f). Liofilización

Después de la diálisis la fase GLP₁ se liofilizó a - 70 °C y 8 micras de mercurio, 24 horas a temperatura ambiente en una liofilizadora LabConco 5. Se obtuvieron 5.85 mg de liofilizado. El sobrenadante (SNTE₁) se almacenó a -20°C para obtener otras glicoproteínas.

El precipitado "R" inicial se procesó de la misma forma que la fase "S" descrita antes, excepto que el tiempo de incubación fue de 48 horas. Se separaron dos fases intermedias una nombrada "S₁" y otra "R₂", la cual fue almacenada a -20 °C. La fase "S₁" se purificó por precipitación etanólica como se describe en las páginas anteriores. Se obtuvo un precipitado (GLP₂) y un sobrenadante (SNTE₂) éste último se almacenó a -20 °C .

1.3. Cromatografía de intercambio iónico

Los 600 μ l obtenidos se cromatografiaron en una columna de intercambio catiónico de CM-celulosa. Las dimensiones de ésta fueron 0.8 cm ancho x 4.05 cm de alto. La velocidad de flujo fue de 14 ml / hora o 1 gota cada 8 segundos. La cromatografía se realizó a 4 °C y se obtuvieron fracciones de 1 ml, las cuales fueron eluidas con acetato de amonio 5 mM pH 5.1 y fueron colectadas en tubos de vidrio Pyrex de 12x75 mm, utilizando un colector de fracciones. El monitoreo de éstas se realizó en un espectrofotómetro Gilford Instrument 250 a una longitud de onda de 280 nm. Después se aplicó un gradiente escalonado de amortiguadores (acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y acetato de amonio 1M- Glicina 0.1M pH 9.5), con los que se obtuvieron las fracciones CM-1ab, CM-2ab y CM-3ab. Debido a la fuerza iónica del amortiguador empleado el 95% de la FSH es extraída en la fracción CM-1ab.

2. Quantificación de proteínas

Se determinaron las proteínas totales de la fracciones siguientes: extracto crudo; mezcla de extractos glicoproteicos GLP₁ y GLP₂, y la fracción CM-1ab obtenidas después de la extracción y la

precipitación. Estas se cuantificaron por el método de (5) empleando un Kit de Bio-Rad para determinar proteínas en un microensayo. Se tomó una alícuota de cada una de las fracciones y se colocaron en tubos de vidrio de 12 x 75 mm. El volumen se ajustó a 100 μ l con hidróxido de sodio 1N y agua. Se dejó reposar una hora a temperatura ambiente y después se agregó 1 ml del reactivo de Bradford. Se incubó una hora a temperatura ambiente y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro Gilford Instrument 250 a 595 nm, empleando celdas de cuarzo de 1 cm^3 . Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar para determinar la cantidad de proteínas.

2.1. Preparación y rango de la curva estándar para proteínas

Se preparó una solución de BSA fracción V a una concentración de 1 mg/ml. Con este stock se preparó una solución de 0.1 mg/ml (se tomó 1 ml del stock 1 mg/ml y 9 ml de agua desionizada). Para la elaboración de la curva estándar (figura. 2) se tomaron los microlitros indicados de la solución 0.1 mg/ml de BSA en la tabla 3 que se muestra abajo.

Tabla. 3 Rango de la curva estándar para proteínas

BSA (0.1 mg/ml)	Proteína -	BSA (1mg/ml)	Proteína -
μ l	μ g	μ l	μ g
0	0	10	1
20	2	12	12
40	4	14	14
60	6	18	18
80	8	22	22
-	-	26	26

Se muestra el rango de la curva estándar empleada para cuantificar proteínas de acuerdo al método de Bradford, 1976.

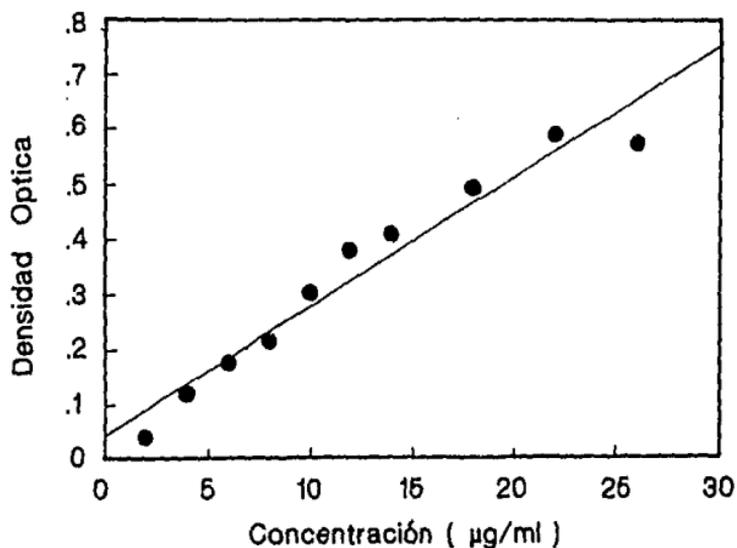


Figura. 2. Curva patrón empleada en la cuantificación de proteínas usando el micro método de Bradford, 1976. En el eje de las "abscisas" se muestra la concentración de albúmina y en el de las "ordenadas" la densidad óptica.

2.2. Caracterización inmunológica de la mFSH

a). SLOT-ELISA

Se cortó una tira de papel de nitrocelulosa de 5x12 cm, se humedeció en PBS 0.05 M pH 7.4, y se colocó en la cámara de SLOT-BLOT. La membrana se secó al vacío 3 minutos. Enseguida se agregó la fracción correspondiente a la mFSH a una concentración de 100 ng/100 µl diluída con PBS 0.05 M pH 7.4, se dejó reposar durante 1 minuto y se secó 3 minutos al vacío. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 200 µl de solución PBS-BSA-Tween-200 0.05% durante 15 horas en agitación constante a 4 °C y el exceso se quitó con vacío. Inmediatamente se lavó tres veces con 200 µl de PBS-Tween en agitación constante a 4 °C y 2 veces con 200 µl de PBS 0.05 M, la duración de cada lavado fue de 10 minutos. Después se quitó el exceso de líquido con vacío y se prepararon diferentes diluciones de un anticuerpo anti- FSH de rata anti-rFSH-S-11 AFP-C0972881, diluído en PBS 0.05M-BSA 3%. Las diluciones empleadas fueron las siguientes: 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:10000, 1:20000 y 1:30000. Se agregaron 100 µl a cada uno de los experimentales, excepto a los controles. Se incubó 2 horas a 4 °C en agitación constante. Enseguida se lavó tres veces con 200 µl de PBS-

Tween por 10 minutos a 4 °C en agitación y se aspiró el excedente con vacío. Se lavó dos veces mas con 200 µl de PBS 10 minutos a 4 °C. Se añadieron a cada pozo 200 µl de una IgG acoplada a peroxidasa de Bio-Rad, dilución 1:500 en PBS 0.05M-BSA 3%. Se incubó 1 hora a 4 °C, se lavó 3 veces con 200 µl de PBS-Tween y 2 veces con 200 µl de PBS 0.

Inmediatamente se introdujo la membrana en la solución reveladora, y se agitó hasta que apareció un color violeta. La reacción se detuvo lavando con agua desionizada varias veces hasta la eliminación total de cualquier residuo colorido. La membrana se almacenó indefinidamente a temperatura ambiente.

b). Electroforesis en SDS-PAGE

Para caracterizar la mFSH obtenida se realizó una electroforesis en geles de TRIS-Poliacrilamida al 7% pH. 8.3, empleando una cámara para geles en placa mini-protean II de Bio-Rad. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se liofilizaron, se resuspendieron en 20 µl de amortiguador TRIS-TEMED y se aplicaron al gel. Este se corrió a 120 voltios, una hora a temperatura ambiente.

c). Tinción del Gel con azul brillante de Coomassie

El gel se tiñó 24 horas a temperatura ambiente en una solución reveladora de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.02%, ácido acético al 10% e isopropanol al 25%.

d). Decoloración del gel

El gel se incubó en una solución de ácido acético al 10% e isopropanol al 10% a temperatura ambiente hasta que desaparezca el exceso de colorante.

e). Tinción con la técnica de plata

Debido a que no se visualizaron las bandas se empleó la técnica de plata empleando un Kit de Bio-Rad. El gel se destiñó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10% (V/V). Después se pasó a 100 ml de una solución fijadora de metanol al 40% y ácido acético al 10% (V/V), 30 minutos. Inmediatamente el gel se transfirió a 100 ml de una solución de etanol al 10% y ácido acético al 10%(V/V), 15 minutos y se realizó otro cambio de la misma solución, otros 15 minutos. Enseguida se pasó a 100 ml de la solución oxidante 5 minutos y se enjuagó con 100 ml de agua desionizada 5 minutos, tres

al 10%, 20 minutos. El exceso de plata se removió enjuagando con 100 ml de agua desionizada, 1 minuto y el gel se transfirió a 100 ml de la solución reveladora. El gel se dejó en esta solución hasta que apareció un precipitado café. Se realizaron dos cambios de la solución reveladora en las mismas condiciones. La reacción se detuvo con 100 ml de ácido acético al 5% (V/V), 5 minutos.

2.3. Evaluación de la actividad inmunológica de la mFSH

a). Marcado de la mFSH por el método de cloramina T

Se marcó NIDDK-rFSH-I-8 (AFP-11454B) y NIDDK-rLH-I-8 (AFP-11536B). Se tomaron 2.5 µg de rFSH y rLH, se resuspendieron en 25 µl de PBS 0.01 M, pH 7.4 y se añadieron 10 µl de yoduro de sodio marcado con ¹²⁵I equivalentes a 1 mCi. Se agregaron 15 µl de una solución de cloramina T a una concentración de 5 mg/3 ml en PBS 0.01 M pH 7.4. Se mezcló 30 segundos en el vórtex y después se añadieron 50 µl de metabisulfito de sodio a una concentración de 3 mg/ml en PBS 0.01 M pH 7.4. Se agitó 10 segundos en el vórtex y se depositó con una pipeta Pasteur en una columna de Sephadex G-100 activada y empacada. La radioactividad remanente en el tubo Eppendorff se enjuagó dos

veces con dos gotas de PBS 0.01 M pH 7.4 y la columna se eluyó con el mismo amortiguador. Se colectaron 30 fracciones de 10 gotas cada una en tubos de vidrio de 10x75 mm enfriados en hielo a los cuales se les añadieron previamente 200 µl de BSA al 5% P/V en PBS 0.01 M pH 7.4. La radioactividad de cada fracción se determinó en un contador de centelleo gamma Packard modelo Crystal Plus. Con los valores obtenidos se hicieron los cálculos correspondientes para determinar la actividad específica de la hormona, empleando la fórmula que a continuación se describe.

b). Determinación de la actividad específica de la hormona yodada

$$AE = \frac{B(D/C)}{A}$$

- AE = Actividad específica
 A = Masa de la proteína en microgramos
 B = 1000 microcuries
 C = Cuentas totales de ¹²⁵Yodo - residuo
 D = Cuentas totales de la proteína

c). Curva estándar de FSH y LH para el RIA Heterólogo

Para la preparación de la curva estándar se realizaron diluciones seriadas de FSH y LH del rango de 1.56 ng/ml a 100 ng/ml, a partir de un stock de rFSH y rLH de 100 ng/ml respectivamente. Las

diluciones se hicieron con PBS 0.01 M pH 7.4 transfiriendo 500 μ l de cada uno de los estándares en orden decreciente y completando el mililitro con PBS. En el caso de rFSH se agregó 2% de suero normal de conejo.

Rango de la Curva Estándar

100.000	ng/ml
50.000	ng/ml
25.000	ng/ml
12.500	ng/ml
6.250	ng/ml
3.125	ng/ml
1.560	ng/ml

d). Radioinmunoensayo

La actividad inmunológica de la mFSH de la mLH fue evaluada por RIA de acuerdo al método (79). Se pusieron 200 μ l de anticuerpo: NIDDK-anti-rFSH-S-11 (AFP-C0972881), a una dilución de 1:62500 en PBS 0.01 M pH 7.4 y anti rLH: NIDDK-anti-rLH-S-10, diluido 1:60,000 con PBS 0.01 M pH 7.4 en tubos de vidrio de 10 x 75 mm. Enseguida se agregaron 100 μ l de la rFSH y rLH obtenidas del NIDDK cuyas características fueron descritas anteriormente. Ambas hormonas fueron

marcadas por el método de cloramina T, y se emplearon 10,000 cpm para cada muestra. La dilución de la radioactividad se realizó con un buffer PBS 0.05 M pH 7.4-EDTA-BSA 2%. Se añadieron 100 μ l de FSH NIDDK-rFSH -RP-2 (AFP-4621B) y de LH (NIDDK-rLH-RP-3 (AFP-7187B) sin marcar a todos los tubos experimentales excepto a las cuentas totales (radioactividad total empleada) y a los tubos blanco (unión no específica). Los tubos se agitaron en el vórtex 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Enseguida se agregaron 100 μ l de un anticuerpo anti-gamma globulina de conejo preparado en borrego a una dilución de 1:10 en PBS 0.05M pH 7.4. Se agitó 10 segundos en el vórtex y se incubó 24 horas a temperatura ambiente. El volumen final del RIA fue de 500 μ l. La reacción se detuvo con 1 ml de agua desionizada. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm en una centrifuga, 45 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada tubo se decantó y el exceso de líquido se limpio con un hisopo. La radiactividad del precipitado se contó en un contador de centelleo gamma modelo Crystal Plus de Packard durante 60 segundos. Los valores de las muestras se expresaron en cpm. La mFSH y mLH se evaluaron siguiendo paralelamente el mismo método. Los resultados obtenidos con la LH no se muestran en este estudio.

7. Determinación del peso molecular de la mFSH

a). Marcado de la hormona por el método de lactoperoxidasa

La yodación de la mFSH se realizó en tubos de vidrio de 12x75 mm a 4 °C. A 20 tubos se les agregó 100 µl de albúmina al 0.5% preparada en PBS 0.01 M pH 7.4. Como la hormona que se marcó esta en 300 µl de acetato de amonio 0.005 M pH 5.1 se omitió agregarle a ésta 25 µl de amortiguador fosfatos 0.5 M. Inmediatamente se agregaron 10 µl de yoduro de sodio (1 mCi) a la muestra y se cuantificó la radioactividad 15 segundos en un contador de centelleo gama de Hewlett-Packard. Se agregaron 20 µl de lactoperoxidasa (1 U.I.), 10 µl de glucosa oxidasa (1 µg/ml diluída en PBS 0.01 M pH 7.4) y 10 µl de β-D-(-) glucosa al (0.5 %). Se mezclaron en el vortex muy bien durante 2 minutos. Se adicionaron 100 µl de azida de sodio y se transfirió el contenido del tubo a la columna de Sephadex G-100 previamente equilibrada. El tubo Eppendorf se lavó con 100 µl de buffer fosfatos 0.5 M pH 7.4. Se colectaron 30 fracciones de 10 gotas por tubo. Se contó la radioactividad de cada una de las fracciones, 30 segundos. La actividad específica de la hormona fue calculada a partir de la ecuación descrita anteriormente.

b). Autorradiografía

Se marcaron 2.6 μg de mFSH con ^{125}I por el método de lactoperoxidasa descrito anteriormente. Se tomaron 30 μl de la hormona yodada (130,213 cpm) y se realizó una electroforesis en geles de acrilamida cuya concentración final fue de al 10% de acrilamida y bisacrilamida al 5% en condiciones reductoras. El gel se corrió a 25 miliamperes, una hora a temperatura ambiente, después se fijó en ácido acético al 10% en agua, 15 minutos, se envolvió con Ega-Pack (Envolpack) y se colocó en un desecador para geles de Bio-Rad modelo 543, 1 hora. Posteriormente el gel se expuso a una placa radiográfica Kodak X-O-MAT por 24 horas a -70°C .

3.1. Actividad Biológica de la mFSH

La actividad biológica de la hormona fue evaluada en un microensayo en un cultivo de células de la granulosa de pollo. Se emplearon medio millón de células de la fracción F6 las cuales fueron aisladas a través de un gradiente de Percoll de Pharmacia e identificadas de acuerdo al método reportado previamente (50). Las células se cultivaron en medio Dulbeco's de GIBCO BRL sin suero, 60 horas en una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO_2 . La potencia biológica de

la FSH fue comparada paralelamente con la FSH humana empleada, para lo cual se agregaron 100 y 200 μg de la mFSH y 0.5 U.I de FSH humana obtenida de Serono Laboratories. Para medir el efecto de la FSH sobre la proliferación de las células de la fracción F6 se le administró 0.1 mCi de timidina tritiada de Amersham catálogo TRK-296. La capacidad de la FSH para inducir la síntesis de estradiol fue determinada a través de un radioinmunoensayo en el cual se cuantificó el 17- β estradiol en el medio de cultivo directamente sin extracción empleando un kit de New England Nuclear.

VI. RESULTADOS

1. Extracción

En esta investigación se partió de 1543 hipófisis de ratón las cuales tuvieron un peso húmedo de 3.24145 g. El peso húmedo individual de la glándula pituitaria fue de 1.2 mg. El volumen del extracto total fue de 13.5 ml y el pH fue de 7.2.

1.1. Rendimiento de la mFSH

Para determinar el rendimiento de la mFSH se cuantificó la cantidad de proteína en una alícuota de 53 μ l de la fracción CM-lab. La muestra se preparó como se indica en la sección de materiales y métodos. La cantidad de proteína que se obtuvo se interpoló en la curva estándar y dió un valor de 5.56 μ g. A partir de éste se calculó el contenido total de proteína presente en 600 μ l dió un valor de 63 μ g. Para sacar el rendimiento de la hormona se empleó 3.2445 g de tejido inicial y se hizo una relación de la cantidad de proteína presente en 600 μ l, lo cual dió un valor de 19.417 μ g de proteína/g de tejido.

1.2. Cromatografía de Intercambio catiónico

Durante la precipitación con acetato de amonio las fracciones "S" y "R" se resuspendieron en el menor volumen posible. Las fracciones se dializaron contra agua, después de la liofilización se obtuvieron los siguientes valores: 5.85 mg para GLP1 y 3.05 mg para GLP-2 de peso respectivamente. Las fracciones se sumaron y se obtuvieron 8.90 mg, los cuales fueron resuspendidos en 653 μ l de amortiguador acetato de amonio 0.005 M pH 5.1. Se tomó una alícuota

de 53 μ l y se empleó para cuantificar proteínas. Los 600 μ l restantes se aplicaron a una columna de CM-Celulosa. Después de la elución con amortiguadores de diferente fuerza iónica se obtuvieron fracciones de un mililitro denominadas CM-1ab, CM-1c, CM-2ab y CM-3ab. El perfil cromatográfico de cada una de ellas se muestra en la figura 4. Con el amortiguador acetato de amonio 0.005 M pH 5.1 de baja fuerza iónica se eluyó la fracción CM-1ab que contiene a la FSH y otra fracción denominada CM-1c que posiblemente sea una variante de la FSH. Con el amortiguador acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 de mediana fuerza iónica se eluyó la fracción CM-2ab. La última fracción de la preparación se eluyó con el amortiguador de alta fuerza iónica que es acetato de amonio 1 M y glicina 0.1 M pH 9.5. La fracción de interés en esta investigación para purificar la mFSH fue la CM-1ab, las demás se almacenaron a -20°C , para realizar estudios posteriores, dado que el mayor contenido son otras hormonas hipofisarias con contaminaciones pequeñas de FSH.

CARBOXIMETIL-CELULOSA
 (0.8 x 4.5cm)
 0.6 ml/4.2 mg Prot
 Flujo: 14ml/h
 Vol. Fracc: 1ml

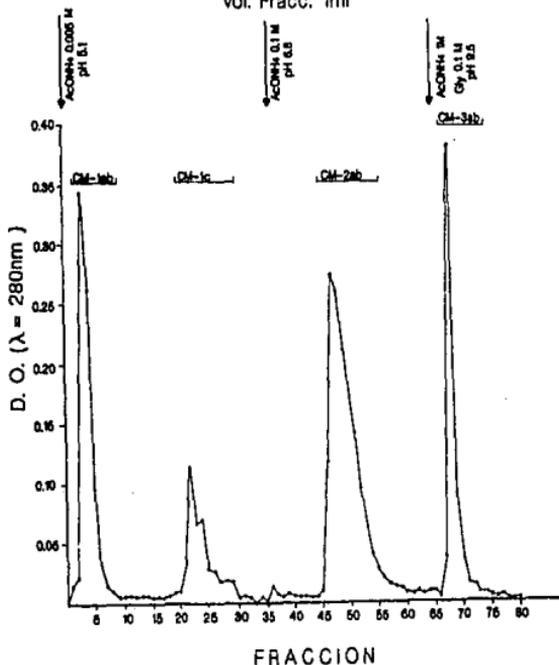


Figura. 4. En esta fotografía se muestra el patrón cromatográfico de cada una de las fracciones y el valor de la densidad óptica obtenido en cada uno de ellas durante la purificación de la mFSH. Las dimensiones de la columna y las características de la cromatografía se observan en la parte superior.

1.3. Movilidad Electroforética de la mFSH

En la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras se observó que la mFSH tuvo un R_f de 0.61, la (figura 5), muestra el patrón electroforético de la hormona. Asimismo, en cada una de las fracciones obtenidas se determinó lo siguiente. En el extracto crudo (homogenado de las hipófisis antes de iniciar el proceso de extracción y purificación de la mFSH), se observó un aspecto difuso de la preparación y una banda bien definida que corresponde al R_f reportado para la albúmina (figura 6A). En el extracto glicoproteico (GLP1 y GLP2) se obtuvieron 3 bandas; una banda delgada cuyo R_f es de 0.32 y corresponde a la FSH de ratón antes de la purificación por cromatografía de CM-Celulosa y la tercera es una banda muy gruesa cuyo R_f es igual a la albúmina (Figura 6B). En la fracción CM-1ab se observaron 3 bandas tenues con R_f s de 0.30, 0.36 y 0.52 (Figura 6C) respectivamente. Las dos primeras bandas son similares a los R_f s reportados para la FSH en otras especies (23,45). La semejanza en los valores de las dos primeras bandas, plantea la posibilidad de que existan dos isoformas de la FSH. En la fracción CM-2ab se determinaron 2 bandas, la primera tiene un R_f de 0.36 y la segunda de 0.52 corresponde a albúmina (Figura 6D). En esta fracción se encuentra teóricamente a la

hormona luteinizante. En la fracción CM-3ab se observó una banda cuyo R_f es similar a 0.32 que corresponde a la fracción CM-1ab (Figura 6E).

Además de comparar la movilidad electroforética de la fracción CM-1ab con otras fracciones obtenidas se realizó una electroforesis en SDS-PAGE para determinar el R_f de la mFSH.



Figura 5. Movilidad electroforética de la hormona en condiciones en SDS-PAGE en condiciones reductoras. La flecha indica la banda correspondiente a la mFSH.

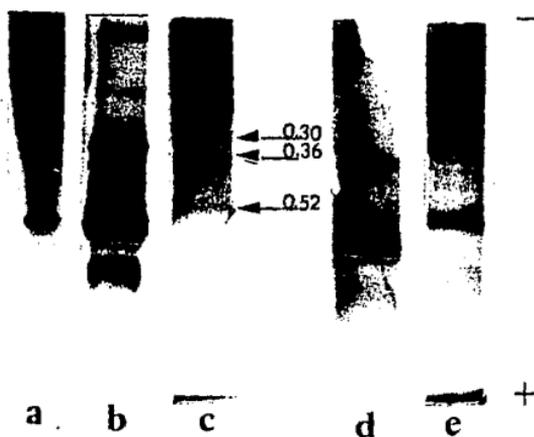
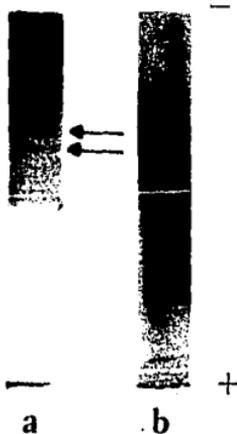


Figura 6. Patrón electroforético de las fracciones obtenidas durante la electroforesis en PAGE-SDS. a). Extracto crudo, b). extracto glicoproteico, c). Fracción CM-1ab, d). CM-2ab, e). CM-3ab. La primera con un Rf de 0.30, la segunda de 0.36 y la tercera de 0.52.

2. Grado de Pureza.

En la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras o nativas se visualizaron dos bandas tenues (figura 7A). En la figura 7B se muestra la preparación de referencia que contiene a la FSH de ratón elaborada por el Dr A.F. Parlow la cual fue donada por el NIDDK. La preparación de referencia de ratón no mostró bandas definidas sino un aspecto difuso a lo largo del gel, lo cual indica que está poco pura comparada con la mFSH.

Figura 7. a). Las flechas señalan las bandas tenues de la mFSH. b). Muestra el aspecto difuso de la preparación de referencia proporcionada por el NIDDK.



2.1. Actividad inmunológica

a). SLOT-ELISA.

Con la técnica del SLOT-ELISA la hormona demostró su inmunogenicidad. Los resultados muestran que el experimento control (sin mFSH) no tuvo ninguna reacción con los anticuerpos secundarios empleados para detectar la actividad inmunológica a través de una reacción colorida (Figura 8a). En cambio en el experimental se observó que la hormona cruza inmunológicamente con el anticuerpo anti-rFSH (Figura 8b).

b).RIA

La hormona se evaluó también con un Radioinmunoensayo. La figura 9 muestra la curva estándar empleada para interpolar el valor obtenido de la mFSH en el RIA. Nuestros resultados muestran que de la cantidad de proteína que contiene la fracción CM-lab (133.59 ng) sólo el 20.96 % corresponde realmente a FSH. La cantidad de la hormona al 50% de unión específica mostró un valor de 28 ng. La actividad específica de la hormona fué determinada 209 μg de FSH/ μg de proteína. La potencia biológica de la hormona fue de 9.43 veces comparada con el estándar NIDDK-rFSH RP-1. Asimismo, con el RIA se comprobó que hay

una actividad inmunológica paralela de la fracción CM-1ab comparada con la rFSH, lo cual sugiere que la mFSH está considerablemente pura.

a

b



Figura 8. Se muestran los resultados obtenidos con el SLOT-ELISA de la mFSH. a). Carril en blanco que corresponde al control. b). La hormona purificada se identificó con un anticuerpo específico para FSH de rata NIDDK anti-rFSH-S1, a una dilución de 1:500. Las bandas oscuras muestran la reacción colorida de la mFSH al reaccionar con el anticuerpo.

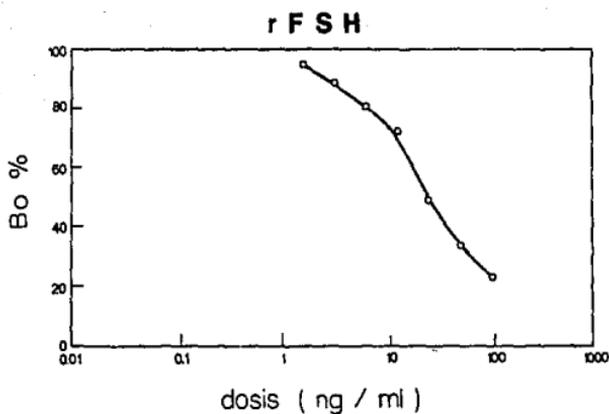


Figura 9. Curva estándar para el RIA heterólogo. En el eje de las "Abcisas" se observa la dosis a la cual la hormona tuvo una unión específica y en el de las "ordenadas" el porcentaje de unión de la misma.

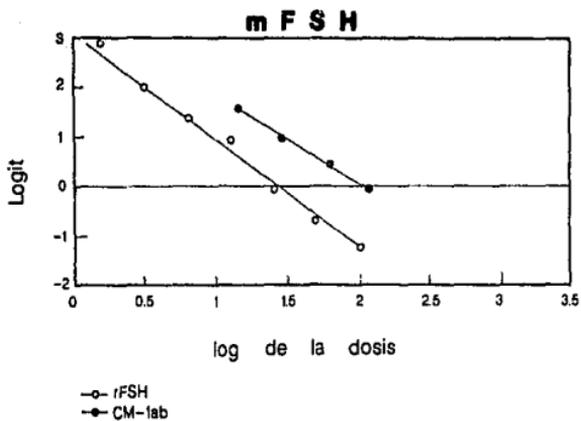


Figura 10. Paralelismo de las curvas obtenidas para la rFSH y la mFSH. Los círculos en blanco denotan la rFSH y los negros la fracción CM-lab que contiene la mFSH purificada.

**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOLOGICA DE
LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA PURIFICACION DE
LA FSH DE RATON (mFSH)**

Muestra	Cantidad de proteína (ng)	Cantidad de FSH (ng) 50% Bo	% FSH	Actividad (Nº de veces la poten- cia con respecto a NIDDK-rFSH RP-1)
Estándar	26.77	26.77	100	45
CM-1ab	133.50	28	20.96	9.43

Figura 11. Se muestra el porcentaje de FSH de en la fracción CM-1ab, así como la actividad de la hormona, comparada con el estándar NIDDK-rFSH-RP-1.

2.3. Peso Molecular

Durante la determinación del peso molecular de la mFSH (fracción CM-1ab) se obtuvieron varias bandas las cuales se muestran en la figura 13. La primera banda que se observa, la de mayor peso molecular corresponde probablemente a agregados de la mFSH. El peso molecular determinado para esta banda fue de 81 941.88 Kd. La segunda banda posiblemente representa a una isoforma de la FSH cuyo valor fue de 52,134 Kd. Se observó otra banda la cual representaría también otra isoforma de la FSH cuyo peso molecular fue de 47,623.24 Kd y una tercera banda que tuvo un peso molecular de 36,311.55 Kd. Asimismo, se detectaron dos bandas más de 20,176.37 Kd y 14,052.87 Kd respectivamente. La suma de ambas nos da aproximadamente el peso molecular de la mFSH (34, 229.24 Kd), el cual coincide con los valores reportados en la FSH de otras especies (Papkoff, 1969; Cheng, 1967 y Grimeck, 1987). La figura 13 muestra la curva estándar empleada par interpolar los valores obtenidos en el cálculo del PM.

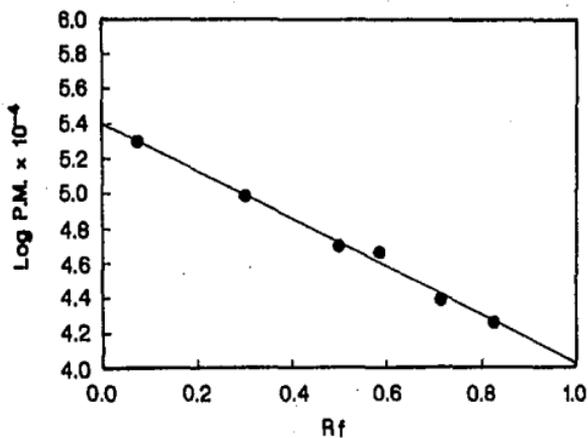


Figura. 12 Gráfica de la curva para determinar el peso molecular de la mFSE y de las subunidades de la misma. En el eje de las "abscisas" se muestra el Rf y en el de las "ordenadas" el logaritmo del peso molecular por 10⁻⁴.

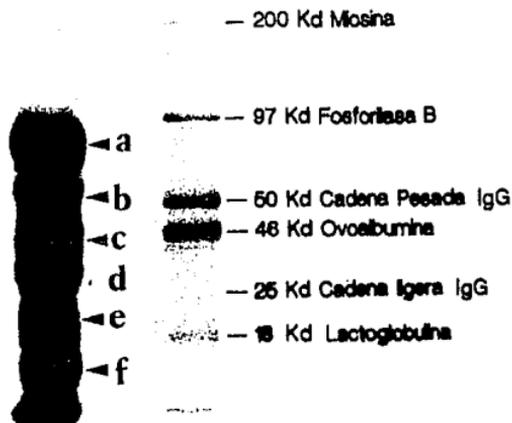


Figura 13. Se ilustran las bandas obtenidas en SDS-PAGE en condiciones reductoras. a). Banda de PM de 81, 941.9 Kd. b, c y d). Posibles isoformas de FSH de PM de 52,134.4, 46, 623.24 y 36, 311.55 Kd. e y f). Corresponden a las probables subunidades de la FSH cuyo PM fue de 20,176.4 y 14,052.9 Kd.

VII. DISCUSION

El conocimiento de la estructura de las hormonas hipofisarias es importante para entender los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo funciones fundamentales en el organismo. De las hormonas hipofisarias las gonadotropinas tienen una función importante en la reproducción y en la perpetuación de las especies. Los estudios biológicos y la caracterización bioquímica y fisicoquímica de la FSH se han hecho en diferentes grupos de vertebrados. Sin embargo, en los roedores sólo se ha purificado la FSH de rata (47, 63) y hamster (78), sin embargo, se carece de información al respecto en otros grupos de roedores. El objetivo del presente trabajo como se mencionó anteriormente fue aislar y purificar la mFSH. En el presente estudio se demuestra que el método empleado en el aislamiento y purificación de la mFSH es simple, relativamente corto y eficiente. En este proceso se empleó un fraccionamiento de la hormona a pH ácido y una adsorción diferencial de la misma en carboximetil celulosa (10, 27, 29, 44, 69). La extracción inicial con acetato de amonio en alcohol en una proporción de 6:4, a pH 5.1, involucra una precipitación isoelectrica en el que la FSH permanece soluble dado que el pI de ésta es de

3.36 a 5.5 y la FSH bovina, ovina y equina parecen tener pI que cae dentro de este rango (60). De esta manera la hormona es separada de otras glicoproteínas cuyos pI son diferentes (63). Lo cual permite obtener una preparación libre de otras glicoproteínas como PRL, TSH y GH.

En el presente trabajo se obtuvo un rendimiento de la hormona de 19.417 $\mu\text{g/g}$ de tejido. Este rendimiento es bajo si se compara con el demostrado por otros autores (11, 23, 76)). Este resultado no puede ser adjudicado a las condiciones en las que se aisló la hormona, debido a que las hipófisis se obtuvieron frescas, al momento de sacrificar los ratones, lo cual tomó un minuto o dos por ejemplar y se congelaron a -70°C inmediatamente. La obtención de las glándulas en un tiempo tan corto evita el deterioro del material biológico por autólisis y la degradación de las moléculas por procesos proteolíticos.

Por otro lado, todas las etapas de extracción y purificación fueron realizadas a 4°C ; a esta temperatura la mayor parte de las proteínas son estables. Asimismo, el uso de PMSF durante la homogenización afecta el sitio activo de las serina-proteasas con actividad semejante a tripsina y quimiotripsina. Lo cual descarta la

posibilidad de que el bajo rendimiento de la hormona se deba a que haya habido una degradación parcial de la hormona en la extracción.

Con respecto a la potencia biológica de la mFSH en esta investigación por (65) en la hFSH, quienes obtuvieron un valor de 1 a 1.5 veces la potencia del estándar NIH-FSH-S1, empleado en este estudio (figura, 11). Así como a los determinados en la FSH bovina con un valor de 0.12 a 0.13 veces comparado con el obtenido en otras especies de mamíferos (7, 22, 29,45, 55, 67).

La mFSH purificada parece estar razonablemente pura en relación a la preparación de referencia donada por el Dr. Parlow del NIDDK (figura, 7). Puesto que ésta no mostró ninguna banda, sino un aspecto difuso comparada con la mFSH, en donde se observó una banda cuyo Rf corresponde a la FSH reportada en otras especies (23,44). Esto se debe a que el estándar de referencia, probablemente sea una preparación cruda del homogenado de la glándula pituitaria del ratón. Dado que se observa el mismo barrido en el extracto crudo obtenido durante la homogenización de las hipófisis en este estudio (Figura 8).

En esta investigación se determinó la actividad inmunológica de la mFSH con un RIA heterólogo empleando una hormona marcada por el método de cloramina T. Con éste, aparentemente se obtienen

actividades específicas de la hormona muy altas, además de que la hormona parece dañarse durante el proceso de oxidación (42).

Se ha planteado que la yodación de glicoproteínas por el método de lactoperoxidasa es más eficiente que el de cloramina T, debido a que con el primero se obtienen actividades específicas de bajo valor y se mantiene la estructura y la actividad biológica de la hormona (42). En nuestro estudio la mFSH marcada por el método de cloramina T no afectó la actividad inmunológica de la hormona dado que la actividad específica obtenida fue adecuada. Estos resultados están de acuerdo a los descritos por otros autores (4,62). La actividad inmunológica de la mFSH fue evaluada paralelamente en un RIA para FSH humana y observamos que la hormona tuvo un porcentaje de unión de 28%, el cual es muy parecido al obtenido con el estándar del NIDDK de rata empleado como referencia (figura 11).

Los resultados del RIA plantean que la mFSH contiene cantidades pequeñas de LH, ya que se cuantificó paralelamente la LH que pudiera estar presente en la preparación de CM-lab. Sin embargo, el valor detectado no interfiere con la actividad de la FSH en donde el porcentaje de entrecruzamiento con la LH es de 0.2 %.

El PM se examinó en la mFSH en SDS-PAGE al 10% con 8-mercaptoetanol. Este es un agente oxidante que hace que los puentes

disulfuro se rompan y el tamaño de la molécula varíe, lo cual determina un Rf mayor y por consiguiente el PM aparente de la hormona disociada es menor. Durante la determinación del PM en esta investigación, se observó una banda de 81,941 Kd que corresponde a probables agregados de la mFSH. Es interesante notar que a pesar, de que en condiciones reductoras se rompen los puentes disulfuro, es posible que exista entre los monómeros otro tipo de interacciones diferentes al enlace S=S, lo cual permite la formación de estos conglomerados.

En algunas especies de mamíferos como humano, rata y perro, se ha planteado que pueden encontrarse una forma dimerica o tetramérica, resistente a agentes oxidante o reductores (21). Se ha visto, que la única forma de evitar la formación de éstos es sometiendo a la hormona a condiciones más drásticas. La forma dimerica parece ser disociada con guanidina 5M (66) o urea 4M (56). Las formas dimericas también se han demostrado en la hipófisis y en el plasma (10). Estas podrían ser equivalentes a alguna de las variantes detectadas en la hFSH (22, 58,) y en la rata (78).

En este estudio también se detectaron tres bandas de PM de 52, 134, 47,693 y 36,311.55 que posiblemente correspondan a isoformas de la mFSH. Se ha planteado que existen variantes de la FSH en el ratón

(78). Asimismo, los valores determinados para las subunidades de la mFSH son similares a los resultados obtenidos en otros grupos (23, 24, 61) en la FSH ovina. El peso molecular de esta especie fue analizado en SDS-PAGE en condiciones reductoras (82). Estos autores determinaron una masa molecular aparente en las subunidades α y β de la FSH bovina de 19.5 y 15.8 Kd. Estos valores están de acuerdo a otros obtenidos (60,61).

En la electroforesis en geles de acrilamida en condiciones nativas se observaron tres bandas: la primera con un Rf de 0.30, la segunda de 0.36 y la tercera corresponde a albúmina. El valor de la movilidad relativa determinado en las dos primeras bandas de la fracción CM-lab en nuestro estudio son similares a los valores demostrados en la hFSH (61), en la bovina (27) y en la FSH bovina (23).

Los datos obtenidos en este estudio indican que la mFSH purificada a partir de un lote de 1543 hipófisis de ratón es suficiente para hacer experimentos que requieran poca cantidad de hormona, como ensayos en cultivos celulares, pero no es suficiente para realizar un bioensayo en donde se requiere de mayor cantidad de estas hormonas. Se ha visto que la cantidad mínima reportada para realizar este tipo

de estudios requiere de una masa del orden de 50 a 100 μg de la hormona purificada (42,47,55,56,58,64,77). Recientemente Carranza-Salas en 1994 observó que a dosis relativamente pequeñas la FSH bovina puede elicitarse una respuesta biológica a una dosis de 2, 4 y 8 μg (comunicación personal).

Por otra parte, el hecho de que de los 133.5 μg de la mFSH sólo el 28% de ésta es FSH, plantea la posibilidad de que la hormona debiera ser purificada con otro método cromatográfico adicional. Se ha visto, que el empleo de más de tres cromatografías durante la purificación afecta la actividad específica de la hormona, debido también a que en cada uno de los pasos normalmente se pierde algo de la misma y las recuperaciones normalmente son muy bajas. Para tratar de purificar la mFSH se requiere de una colecta de 5000 hipófisis mínimo para poder purificar y caracterizar mejor a la mFSH.

En nuestro estudio observamos que la mFSH a una dosis de 100 μg no incrementó de manera significativa la producción de estrógenos en un cultivo de células de la granulosa del ovario del pollo. Esto se debe quizá a que la hormona está contaminada con pequeñas cantidades de LH. Es posible que la respuesta esté relacionada también con la dosis o cantidad de la mFSH empleada para estimular la formación

de estrógenos. De los 133.5 μg de proteína total presente en la fracción CM-lab que contiene a la mFSH sólo el 21% de ésta es FSH (figura 11). Sin embargo, observamos que a una dosis mayor de 200 μg la hormona incrementó significativamente la síntesis de 17- β estradiol (datos no mostrados).

La dosis de mFSH requerida para inducir la producción de esteroides en este estudio fue mucho mayor que la empleada por otros grupos (34) en un cultivo de células de la granulosa de rata. La FSH de rata estimula la producción de 17- β estradiol a una dosis de 10 ng/ml (34).

Se ha visto que el sistema de cultivo de las células de la granulosa no es especie-específico y se ha demostrado que este tipo celular responde a la hFSH, bovina, ovina, equina, porcina y rata (15,16,34). En nuestro estudio evaluamos la actividad biológica de la mFSH empleando un cultivo de células de la fracción F6 de pollo (50). Aunque arriba se mencionó que las células de la granulosa no son especie-específicas en los vertebrados superiores, no se puede descartar la posibilidad de que existan diferencias en la respuesta fisiológica en las células de los vertebrados inferiores, a las

gonadotropinas de los mamíferos, la cual pudiera ser mediada por una mayor o menor producción de hormonas esteroideas.

El sistema de cultivo empleado para evaluar la actividad biológica de la mFSH es equivalente a cualquier bioensayo, como el de Steelman-Pholey en el que se determina el efecto de la hormona a través del incremento del peso del ovario (58). Se sabe que la FSH actúa en las células de la granulosa para inducir la actividad de aromataasa (15,16,65), mientras que los estrógenos estimulan la proliferación de las células de la granulosa y el crecimiento folicular (1, 43,73).

El método de cultivo celular empleado en el presente estudio es más sensitivo que los clásicos bioensayos para FSH; debido a que éste mide directamente la producción de estrógenos en las células de la granulosa en lugar de una respuesta secundaria a FSH. Se ha planteado, que la acción de la mFSH en el aumento del peso del ovario puede ser un efecto secundario a la inducción de la actividad de la aromataasa (41).

Finalmente la recapitulación de los datos de este estudio demostraron que la movilidad electroforética de la mFSH, así como el PM tan parecido a la FSH caracterizada en otras especies, sugiere que

esta hormona tiene propiedades en común desde el punto de vista filogenético con la FSH de otras especies .

VIII. CONCLUSIONES

1. El método empleado en esta purificación es rápido, sencillo y eficiente.
2. La fracción CM-lab que corresponde a la mFSH presenta un peso molecular aparente de 34,133 el cual es semejante al obtenido en otras especies.
3. La mFSH purificada demostró ser inmunológicamente activa por DOT-BLOT y RIA.
4. En electroforesis nativa de PAGE la mFSH se resuelve en dos bandas con un Rf de 0.30 y 0.36 respectivamente. Estos valores son similares a los reportados en otras especies.
5. El mFSH es activa biológicamente en un microensayo en cultivo celular.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Austin C.R. y Short R.V. Procesos de reproducción en los mamíferos. Células germinales y fertilización. Libro 1. Ediciones científicas. La Prensa Medica Mexicana S.A.
2. Bahr J.M. 1982. The procurement of avian and piscine pituitary hormones. Gen.Comp. Endocrinol. 47:529-530.
3. Bergert E.R., Madden B., MacCormick D.J., Papkoff and Ryan R.J. 1990. The antigenic structure of the human glycoprotein hormone in the Rhesus monkey using an anti-human FSH serum and rat FSH. Endocrinol. 92:618-623.
4. Boorman G.A., Niswender G.D., Gay V.L., Reichter L.E and Midgley A.R. 1973. Radioimmunoassay for Follicle -Stimulating Hormone in the Rhesus monkey using anti-human FSH serum and rat FSH. Endocrinol. 92:618-623.
5. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -Dye binding. Anal. Biochem. 72:248-251.
6. Braselton W.E. and McShan W.H. 1970. Purification and properties of follicle stimulating and lutenizing hormones from horse pituitary glands. Arch. Biochem. Biophy. 139:45-58.
7. Braselton W.E and McShan W.H. 1970. Purification and properties of follicle stimulating and luteinizing hormone from the pituitary glands of the turkey *Meleagris gallopavo*. Gen .Comp. Endocrinol. 37:508-520.
8. Bullock D.W., Mittal K.K. and Nalbandov A.V. 1967. Immunological and Biological cross reactivity of chicken and mammalian gonadotrophins. ENdocrinol. 80:1182-1184.
9. Burke W.H., Licht P., Papkoff H and Bona-Gallo A. 1979. Isolation and characterization of lutenizing hormone and follicle stimulating hormone from pituitary glands of the turkey *meleagris gallopavo*. Gen. Comp. Endocrinol. 37:508-520.

10. Butt W.R., Crooke A.C and Cunningham F.J. 1961. Studies on human urinary and pituitary gonadotrophins. *Bioch.J.* 81:596-605.
11. Cahill C.L., Shetlar M.R., Payne R.W., Endecott B and Li Y. 1968. Isolation and characterization of ovine follicle stimulating hormone. *Biochim.Biophys.Acta.* 154:40-52.
12. Chang Y.S., Huang C.J., Huang F.L., Liu C.S and Lo T.B. 1990. Purification, characterization and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Gen.Comp:Endocrinol.* 78:23-33.
13. Dixon H.B.F and Thompson C.M. 1968. Chromatography of oxidized and reduced cytochrome C on carboxymethylcellulose. *Bioch.J.* 107:427-431.
14. Ellis S. 1961. Studies on the serial extraction of pituitary proteins. *Endocrinol.* 69:554-570.
15. Erickson G.F., Wang C and Hsueh A.J.W. 1979. FSH induction of functional receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature.* 279:336-338.
16. Erickson G.F., Magoffin D.A., Dyer C.A and Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6:371-399.
17. Farmer S.W., Papkoff H and Licht P. 1975. Purification of turkey gonadotropins. *Biol.Reprod.* 12:415-422.
18. Fujiki Y., Rathman P and Saxena B.B. 1978. Amino acid sequence of the β subunit of the follicle stimulating hormone from equine pituitary glands. *J.Biol. Chem.* 253:5363-5368.
19. Ganong W.F. 1980. *Manual de fisiología Médica.* 7a. Edición. Ed. Manual Moderno.
20. Gottschalk A. 1969. Biosynthesis of glycoproteins and its relationship to heterogeneity. *Nature.* 222: 452-454.

21. Gray. C.J. Molecular weight of human follicle stimulating hormone. *Nature*. 216: 1112-1113.
22. Grimeck H.J., Nuti L.C., Nuti K.M and Mcshan W.H. 1976. Effect of neuroaminidase treatment on the biological activity of highly purified ovine and hypophysectomized immature male and female rats. *Endocrinol.* 98:105-110.
23. Grimeck H.J., Gorski J and Wenworth B.C. 1979. Purification and characterization of bovine follicle-stimulating hormone:Comparison with ovine follicle stimulating hormone.*Endocrinol.*104:140-147.
24. Govorun M.S., Osipova T.A., Khilko S.N., Martynov A.V and Bulatov A.A. 1992. An electrophoretic analysis of human glycoprotein hormone and their subunits. *Biol.Nauki.*7:74-80.
25. Ham.A.M y Cornmack. 1987. *Tratado de Histología*.8a. edición. Editorial Interamericana.
26. Hashimoto C., MacShan W.H and Meyer R.K. 1965. Purification and characterization of follicle stimulating hormone from sheep pituitary glands. *Biochem.*5:3419-3425.
27. Hartree-Stockell S.A. 1966. Separation and partial purification of the protein hormones from human pituitary glands:*Biochem.J.* 100:764-765.
28. Hartree-Stockell A and Cunningham F.J. 1969. Purification of chicken pituitary follicle stimulating hormone and lutenizing hormone. *J.Endocrinol.* 43:609-616.
29. Hartree-Stockell A., Bell E.T., Christie D.W and Kirkham K.E. 1972. Partial purification of dog pituitary glycoprotein hormones. *J.Endocrinol.* 52:403-404.
30. Hayashi T., Hanaoka Y and Hayashi H. 1992 a.The complete amino acid sequence of the follitropin β subunit of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen.Comp. Endocrinol.*88:144-150.
31. Hayashi H., Hayashi T and Hanaoka Y. 1992 b. Amphibian lutropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete aminoacid sequence of the β subunit. *Eur.J:Biochem.*205:105-110.

32. Hayashi H., Hayashi T and Hanaoka Y. 1992 c. Amphibian lutropin and follitropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete aminoacid sequence of the alfa subunit. *Eur.J.Biochem.* 203:185-191.
33. Hind S., Karim A.K., Zoheir F., Noshy M., Fovad N.B and James N.W. 1989. Dot-enzyme-linked immunoadsorbent assay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of human fascioliasis. *J.Parasitol.* 75: 549-552.
34. Hueh A.J.W., Erickson G.F and Harol Papkoff. 1983. Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by culture rat granulosa cells. *Arch.Biochem. Biophys.* 225:505-511.
35. Koenig B.L and King E. 1950. Extracction studies of sheep pituitary gonadotropic and lactogenic hormones in alcoholic acetate buffers. *Arch. Biochem.* 26:219-228.
36. Krishnan K.A., Proudman J.A and Bahr J.M. 1992. purification and characterization of chicken follicle stimulating hormone. *Com.Biochem.Physiol.* 102:67-75.
37. Laemli U.K.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
38. Licht P and Papkoff H.1974. Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Endocrinol.* 94:1587-1593.
39. Licht P and Papkoff H.1974. Separation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland from the snappy turtle *Chelydra serpentina*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 22:218-237.
40. Licht P., Papkoff H., Farmer S.W., Muller C.H., Tsui H.W and Crew D. 1977. Evolution and gonadotropin structure and function. *Recent.Prog.Horm Res.* 33:169-245.
41. Louvet J.P., Hartman M.S and Ross G.T. 1975. Effects of human chorionic gonadotropin, human interstitial cell stimulating hormone and human follicle stimulating hormone on ovarian wights in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Endocrinol.* 96:1179-1185.

42. Miyashi Y., Vaitukatis J.L., Nieschlang E and Lipsett M.B. 1972. Enzymatic iodation of gonadotropins. *J:Clin.Endocrinol.*34:23-27.
43. Norris D.O. 1980. *Vertebrate Endocrinology*. Four Edition. Editorial Lea and Febiger.Philadelphia.
44. Papkoff H., Gospodarowicz D and Li C.H.1967. Purification and properties of ovine follicle-stimulating hormone. *Arch. Biochem.Biophys.* 120:434-439.
45. Papkoff H and Gan J. 1970. Bovine interstitial cell-stimulating hormone:purification and properties.*Arch.Biochem.Biophys.*136: 522-528.
46. Papkoff H., Licht P., Bona-Gallo A., MacKenzie D.S., Oelofsen W and Oothuizen M.M.J. 1982. Biochemical and immunological characterization of pituitary hormone from the ostrich *Strutio chamelus*. *Gen.Comp.Endocrinol.*48:181-195.
47. Parlow A. F. 1970. Biologic detection of FSH in unconcentrated serum of intact male mice and unexpected effects of orchidectomy on FSH and LH. *Endocrinol.* 87:271-275.
48. Parlow A.F. 1975. The immunoreactive hTSH contamination of immunochemical grade hFSH preparation. *J.Clin.Endocrinol. Metab.* 41:189-190.
49. Federnera E., Gómez Y., Velásquez P., Juárez Oropeza and Gonzalez del Pliego M. 1988. Identification of steroidogenic cell subpopulationin the ovary of the newly hatched chicken. *Gen.Comp.Endocrinol.*71:153-162.
50. Rathman P., Fujiki Y., Landefeld T and Saxena B.B. 1978. Isolation and aminoacid sequence of the alpha subunit of follicle stimulating hormone from equine pituitary glands. *J.Biol. Chem.* 253:5359-53-62.
51. Reichter L.E. 1962. Preparation of purified bovine lutenizing hormone. *Endocrinol.* 71:729-735.

52. Reichter L.E and Parlow A.F. 1963. Preparation of ovine follicle-stimulating hormone havin a high degree of biological purity. *Endocrinol.*73:224-229.
53. Reichter L.E. 1964. Preparation of purified porcine luteinizing hormone. *Endocrinol.* 75:970-972.
54. Reichter L.E and Parlow A.F.1964.Partial purification and separation of human pituitary gonadotrophins.*Endocrinol.*74:236-243.
55. Reichter L.E and Parlow A.F. 1964. Proteinasa contamination of purified pituitary gonadotrophins. *Endocrinol.*74:809-810.
56. Reichter L.E and Jiang N.S. 1965. Studies on bovine pituitary follicle-stimulating hormone.*Endocrinol.*77:124-127.
57. Reichter L.E. 1967. Further studies in species differences in follicle stimulating hormone as revealed by the slope in the Steelman Pohley Assay. *Endocrinol* 80:1180-1181.
58. Reichter L.E., Kathman R.H and Ryan R. 1968. Studies on the composition and properties of immunochemical grade human pituitary follicle stimulating hormone(FSH):Comparison with lutenizing hormone(LH). *Endocrinol.*82:109-114.
59. Reichter l.E. 1970. Purification of anterior pituitary hormones(ovine, bovine, rat,rabbit).*Methods Enzymol.*38:360-388.
60. Reichter L.E. 1971.Electrophoretic properties of pituitary gonadotropins as studied by electrofocusing.*Endocrinol.*88:1029-1044.
61. Reichter L.E and Lawson G.M. 1973. Molecular weight relationships among the subunits of the human glycoprotein hormones. *Endocrinol.*92:1034-1042.
62. Reichter L.E and Bhalla V. K. 1974. Development of a radioligand tissue receptor assay for human follicle-stimulating hormone. *Endocrinol.* 94:483-491.
- 63.Reichert L.E. 1975.Purification of anterior pituitary hormones. *Methods enzynol.*38:360-380.

64. Richards J.S., Jhansen T., Hedin L., Lifka j., Ratoosh S., Durica J.M and Goldring N.B.1987. Ovarian follicular development from physiology to molecular biology.Recent.Prog.Horm.Res.43:231-276.
65. Roos P and Gemzell C.A.1964. The isolation of human pituitary follicle-stimulating hormone. Biochim. Biophys. Acta. 92:218-220.
66. Roos P.1968. Human follicle stimulating hormone.: Acta Endocrinol.Copenh.59:14-93.
67. Shome B and Parlow A. 1974. Human follicle stimulating hormone (hFSH): First proposal for the aminoacid evidence of the alfa subunit(hFSH) and first demonstration of its identity of the alfa subunit of human luteinizing hormone (hLH). J.Clin. Endocrinol. Metab.39:199-202.
68. Shome B and Parlow A. 1974. Human follicle stimulating hormone:first proposal for the aminoacid sequence of the hormone-specific, β subunit (hFSH).J.Clin.Endocrinol.Metab.39:203-205.
69. Stanton F., Robertson D.M., Burgeon P.G., Schmauk-White B and Hearn M.T.W. 1992. Human follicle -stimulating hormone isoforms:isolation and Physiochemical Characterization. Endocrinol.130:2820-2832.
70. Steelman S.L., Kelly L., Segaloff A and Weber G.T. 1956. Isolation of an apparently homogeneous follicle stimulating hormone. 59:257-257.
71. Steelman S.L., Segaloff A and Mays M.G. 1958. Preparation of highly active human gonadotropin and growth hormone.Arch. Bioch, Biophys.78:262-263.
72. Tepperman J.1980. Metabolic and Endocrine Physiology. Four edition.Year Book Medical Publishers.
73. Towbin H., Staehelin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:Procedure and applications.Proc.Natl.Acad. Sci. USA.76:4350.

74. Thorell J.L and Johansson B.G. 1971. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 251:363-369.
75. Sakai H and Ishii S. 1980. Isolation and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42:1-8
76. Saxena B.D., McShan W.H and Meyer R.K. 1962. Purification of follicle stimulating hormone from horse anterior pituitary glands. *Biochim. Biophys. Acta.* 65:394-402.
77. Sherwood O.D., Grimeck H.J and Macshan W.H. 1970. Purification and properties of follicle-stimulating hormone from sheep pituitary glands. *J. Biol. Chem.* 245:2328-2336.
78. Ulloa Aguirre A and Chappel S.C. 1982. Multiple species of follicle stimulating hormone exist within the anterior pituitary gland of male golden hamsters. *J. Endocrinol.* 95:257-266.
79. Van Damme M.P., Robertson D.M., Marana R., Ritzén., E.M and Diczfalusy E. 1979. A sensitive and specific in vitro bioassay method for the measurement of follicle stimulating hormone activity. *Acta. Endocrinol.* 91:224-237.
80. Woods M.C and Simpson M.E. 1960. Purification of sheep pituitary follicle-stimulating hormone (FSH) by ion exchange chromatography on diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. *Endocrinol* 66:575-584.
81. Wentworth B.C. 1971. Isolation and purification of follicle stimulating hormone and lutenizing hormone from turkey pituitary glands. *Biol. Reprod.* 5:107-108.
82. Wu J.B., Stanton P.G., Robertson D.M and Hearn M.T.W: 1993. Isolation of FSH from bovine pituitary glands *J. Endocrinol.* 137:59-68.

X. APENDICE

SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA
PURIFICACION DE LA PMSF

PMSF	0.02 %
Agua desionizada	50 ml

Se pesaron 0.01 g de PMSF y se disolvieron en 25 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.2 con una solución de NaOH 1N, se aforó a 50 ml con agua desionizada y se almacenó a temperatura ambiente.

SOLUCION DE EXTRACCION

Acetato de amonio	10 %
Etanol absoluto	400 ml

Se pesaron 100 g de acetato de amonio, se disolvieron en 800 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 5.1 con ácido acético concentrado y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. Se tomaron 600 ml de esta solución y se mezclaron con 400 ml de etanol absoluto (6:4). Se agregaron 0.02 g de PMSF y se almacenó a 4 °C.

SOLUCION DE DIALISIS

Bicarbonato de amonio	10 mM
Agua desionizada	1000 ml

Se pesaron 0.79 g de bicarbonato de amonio, se disolvieron en 800 ml de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.5 con NaOH 1N. Se aforó a 1000 ml y se almacenó a 4 °C.

**AMORTIGUADORES EMPLEADOS EN LA CROMATOGRAFIA
DE CARBOXIMETIL CELULOSA**

AMORTIGUADOR DE BAJA FUERZA IONICA

Acetato de amonio	0.005 M
Agua desionizada	1000 ml

Se pesaron 0.385 g de acetato de amonio y se aforaron a 100 ml, el pH se ajustó a 5.1 con HCL 1N.

AMORTIGUADOR DE MEDIANA FUERZA IONICA

Acetato de amonio	0.1 M
Agua desionizada	100 ml

Se pesaron 0.77 g de acetato de amonio y se aforaron a 100 ml, el pH se ajustó a 6.8 con ácido acético concentrado.

AMORTIGUADOR DE ALTA FUERZA IONICA

Acetato de amonio	1 M
Glicina	0.1 M
Agua desionizada	100 ml

Se pesaron 7.7 g de acetato de amonio y 0.75 g de glicina, se aforaron a 100 ml con agua desionizada y se ajustó el pH a 9.5 con NaOH 1N.

**PREPARACION DE LA COLUMNA DE
CARBOXIMETIL CELULOSA**

A) Activación de la resina

Se pesaron 10 g de carboximetil celulosa G-100 de Sigma y se suspendieron en 150 ml de NaOH 0.5N (1:15 P/V). La resina se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro, se agitó, se dejó

sedimentar y se quitó el sobrenadante con vacío. Enseguida se lavó con agua pH 4.0 y se equilibró con amortiguador de acetato de amonio 0.005 M pH 5.1. Una vez equilibrada la resina se dejó sedimentar y el sobrenadante se quitó con vacío.

B). Llenado de la columna

Se empleó una columna de 3 ml la cual se montó en un soporte universal. Con una pipeta Pasteur se depositó la resina G-100 y se dejó sedimentar sin permitir que se secase, agregando amortiguador de acetato de amonio 0.005 M pH 5.1.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Reactivo de Bradford para proteínas

Azul brillante de Coomasie G-250 de Sigma	0.01%	P/V
Etanol	4.75%	P/V
Acido fosfórico	8.5 %	P/V
Agua destilada	500	ml

se pesaron 50 mg de azul brillante de Coomasie G-250 y se disolvieron en 25 ml de etanol al 95%. enseguida se agregaron 50 ml de ácido fosfórico al 85% P/V, se aforó a 500 ml con agua destilada y se filtró. El reactivo se almacenó en una botella ámbar a 4 °C por un máximo de 4 semanas.

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

A) solución A1

Tris	18.15	P/V
HCl	1	N
Agua desionizada	100	ml

Se pesaron 18.15 g de tris, se disolvió en 24 ml de ácido clorhídrico 1N, se agregaron 0.115 ml de TEMED y se ajustó el pH a 9.4 con NaOH 1N. La mezcla se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó a 4 °C.

B) Solución A2

Acrilamida	2.5 %
Metilen-bis-acrilamida	0.656 g
Agua desionizada	50 ml

Se pesaron 2.5 g de acrilamida y 0.656 g de metilen bisacrilamida, se aforaron a 50 ml con agua desionizada. Se filtró y almacenó a 4 °C.

C) Solución B

HCl	1 N
Tris	5.98% P/V
TEMED	0.46% V/V
Agua desionizada	100 ml

D) Solución C

persulfato de amoni	0.14% P/V
Agua desionizada	18 ml

Se pesaron 25.2 mg de persulfato de amonio y se disolvieron en 18 ml de agua desionizada. Esta solución se debe emplear inmediatamente después de prepararla.

E) Solución D

Acrilamida	10% P/V
Metilen-bis-acrilamida	2.5% P/V
Agua deionizada	100 ml

Se pesaron 10 g de acrilamida y 2.5 g de metilen-bis-acrilamida, se disolvieron en agua desionizada y se aforó a 100 ml. la solución se filtró y almacenó a 4°C.

Solución D

Acrilamida	10 % P/V
Metilen-bis- acrilamida	2.5% P/V
Agua desionizada	100 ml

Se pesaron 10 g de acrilamida y 2.5 g de metilen-bis-acrilamida, se disolvieron en agua desionizada y se aforó a 100 ml . la solución se filtró y almacenó a 4 °C.

F). Solución E

Rivoflavina	0.004% P/V
Agua desionizada	3 ml

se pesaron 0.12 g de riboflavina y se disolvieron en 2996 ul de agua desionizada, se cubrió con papel aluminio y se almacenó a 4 °C.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA

A) Cámara inferior

Tris	0.02476 M
Glicina	0.1918 M
Agua desionizada	1000 ml

Se pesaron 3 g de tris y se disolvieron en 250 ml de agua desionizada. Por separado se pesaron y disolvieron 14.4 g de glicina en 250 ml de agua desionizada. se mezclaron ambas soluciones y se ajustó el pH a 8.3. Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C.

B) Cámara superior

Tris	0.02476 M
Glicina	0.1918 M
Azul de bromofenol	5 ml

Se pesaron 3 g de tris y 14.4 de glicina, se disolvieron por separado en 250 ml de agua desionizada. Se mezclaron y se ajustó el pH a 8.3. Se aforó a 1000 ml con agua desionizada. Al momento de correr la electroforesis se le añadieron 5 ml de azul de bromofenol al 0.005 %.

C). Amortiguador para aplicar la muestra

Solución B	2 ml
Glicerol al 10%	6 ml
Azul de bromofenol al 1%	20 ul

Se tomaron 2 ml de la solución B y 6 ml de glicerol al 10%, se mezclaron bien, se separaron 2 ml de esta mezcla y se le añadieron 20 ul de azul de bromofenol al 1%. esta mezcla se preparó en el momento de usarse.

GEL SEPARADOR

Solución A1	25 %
Solución A2	25 %
Solución C	50 %

Se tomaron 2.5 ml de la solución A1 y 2.5 ml de la solución A2, se mezclaron bien y se desgasificaron durante 5 minutos empleando una bomba de vacío. Enseguida se agregaron 5 ml de la solución C, e inmediatamente se aplicó a la cámara de electroforesis con una pipeta Pasteur y se dejó polimerizar una hora a temperatura ambiente.

GEL CONCENTRADOR

Solución B	25 %
Solución D	50 %
Solución E	5%

Se mezcló 1 ml de la solución B, 2 ml de la D y 1 ml de la E. la mezcla se desgasificó por vacío 10 minutos y se protegió de la luz con papel aluminio. Inmediatamente se aplicó al gel separador y se le añadió un poco de agua para que polimerizara uniformemente. se

insertó el peine y se dejó polimerizar una hora a temperatura ambiente.

TINCION DE GELES

Azul brillante de Coomasie R-250	0.02 %
Acido acético	10 %
Isopropanol	25 %

Se pesaron 0.02 g de azul brillante de Coomasie, se disolvieron en 10 ml de ácido acético y 25 ml de isopropanol y se almacenó a temperatura ambiente. Esta mezcla puede utilizarse varias veces.

DECOLORACION DE GELES

Acido acético	10 %
Isopropanol	10 %

Se tomaron 50 ml de ácido acético y se mezclaron con 50 ml de isopropanol. Esta mezcla se preparó en el momento de usarse.

TINCION DE GELES CON PLATA

AGENTE OXIDANTE

Dicromato de potasio	10 %
Agua desionizada	90 %

Se tomaron 10 ml de la solución de dicromato de potasio y se disolvieron en 90 ml de agua desionizada. Esta mezcla se empleó inmediatamente.

AGENTE DE PLATA

Nitrato de plata	10 %
Agua desionizada	90 ml

Se tomaron 10 ml de la solución de nitrato de plata y se disolvieron en 90 ml de agua desionizada. Esta solución puede ser utilizada varias veces.

REVELADOR

Paraformaldehído	3.2 %
Agua desionizada	100 ml

Se pesaron 3.2 g de paraformaldehído de Baker y se disolvieron en 100 ml de agua deionizada.

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA TECNICA
DE SLOT-ELISA

SOLUCION REVELADORA

4-cloronaftol	30 mg
Metanol	10 ml
PBS 0.5 M	50 ml
H ₂ O ₂ al 30 %	50 ul

El 4-cloronaftol se pesó y se disolvió en 10 ml de metanol. Por separado se tomaron 50 ul de H₂O₂ al 30 % y se diluyeron con 50 ml de PBS 0.5M. esta mezcla se añadió a la solución anterior al momento de usarse.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS 0.5 M

Solución A

Fosfato de sodio monobásico	3.45 g
Agua desionizada	50 ml

Se pesaron 12.78 g de fosfato de sodio monobásico y se disolvieron en 50 ml de agua desionizada.

PBS 0.5 M

Se tomó 1 ml de PB 0.5 M y se diluyó diez veces con agua desionizada y se añadió NaCl 0.14 M.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PBS-TWEEN	
PBS 0.05 M	10 ml
Tween	0.3 %

Se preparó una solución con el amortiguador arriba descrito y se agregaron 30 ul de tween.

REACTIVOS EMPLEADOS PARA AUTORRADIOGRAFÍA

GELES DE ACRILAMIDA EN SDS al 10 %

A). GEL SEPARADOR

Acrilamida al 30% y bisacrilamida al 0.8%	10.0 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	7.5 ml
Agua destilada	12.2 ml
SDS al 10%	0.6 ml
Persulfato de amonio 100 mg/ml	0.2 ml
TEMED	20 ul

B) GEL CONCENTRADOR

Acrilamida 30 % y bisacrilamida 0.8	5 ml
Tris 0.5 M, pH 6.8	7.5 ml
Agua destilada	17.1 ml
SDS al 10%	.3 ml
Persulfato de amonio 100 mg/ml	.1 ml
TEMED	5 ul

C) AMORTIGUADOR DE CORRIDA

Glicina 1.8 M	288 g
Tris 0.24 M	60 g
SDS 0.1%	20 g

D) COCTEL PARA MUESTRAS DE GELES DE ACRILAMIDA

Tris 0.5 M pH 6.8	10 ml
SDS al 10 %	10 ml
Glicerol	10 ml
Agua destilada	20 ml
Azul de bromofenol	100 mg

Se agregaron 10 ul de β mercaptoetanol por cada ml de coctel y se hirvieron con la muestra 5 minutos.

AMORTIGUADOR TRIS-HCL 1.5 M

Tris	181.71 g
Agua destilada	1000 ml

Se pesaron 181.71 g de tris, se aforaró a 1 litro con agua destilada y se ajustó el pH a 8.8 con ácido corhídrico concentrado.

Amortiguador Tris-HCL 0.5 M

Tris	78.8 g
Agua destilada	1000 ml

Se pesaron 78.8 g de tris, se disolvieron en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 6.8 y se aforó a 1 litro con agua destilada.

SDS al 10 %

Dodecil sulfato de sodio	10 g
Agua	1000 ml

Se pesaron 10 g de dodecilsulfato de sodio y se agregaron 100 ml d agua destilada.

ACRILAMIDA AL 30% Y BISACRILAMIDA AL 0.8%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

Se pesaron 30 g de acrilamida, 0.8 g de bisacrilamida de Bio Rad y se agregaron a 100 ml de agua destilada. Las soluciones se cubrieron de la luz y se almacenaron a 4 °C.

ACETATO DE SODIO 4M

Acetato de sodio	0.544 g
Agua destilada	10 ml

Se pesaron 0.544 g de acetato de sodio y se disolvieron en 10 ml de agua destilada el pH se ajustó con ácido acético glacial concentrado.

SOLUCIONES EMPLEADAS EN EL MERCADO
DE GONADOTROPINAS

SOLUCION DE LACTOPEROXIDASA

Se tomaron 20 ul de una solución de lactoperoxidasa de Sigma (500 U.I./400 ul) y se diluyeron con 480 ul de acetato de sodio 0.4 M pH 5.6 para obtener 1 U.I.

GLUCOSA OXIDASA

Glucosa oxidasa	1 mg
PBS 0.01 M pH 7.4	10 ml

Se pesó 1 mg de glucosa oxidasa de Sigma grado analítico y se disolvió en 10 ml de PBS 0.01 M pH 7.4. Se tomaron 250 ul de esta solución y se aforaron a 25 ml con PBS 0.01M.

D-D-(+) GLUCOSA

D-D-(+) glucosa	0.05 g
Agua destilada	10 ml

Se pesaron 0.1 g de azida de sodio y se disolvieron en 10 ml de buffer fosfatos 0.1M pH 7.4. Preparar esta solución en el momento de emplearla.

AZIDA DE SODIO

Azida de sodio	0.01 g
Buffer fosfatos 0.1 M pH 7.4	10 ml

Se pesaron 0.1 g de azida de sodio y se disolvieron en 10 ml de buffer fosfatos 0.1 M pH 7.4. Preparar esta solución en el momento de emplearla.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE SEPHADEX G-100

Se pesó 1 g de resina Sephadex G-100 de Pharmacia Fine Chemical, se resuspendió en 10 ml de buffer fosfatos 0.01M pH 7.4 y se dejó equilibrar 24 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente se preparó la columna empleando una pipeta de vidrio desechable a la cual se le cortó la parte superior. Se le agregó una perla de ebullición para evitar que la columna se vacíe y la resina se agregó con una pipeta Pasteur y se lavó con PBS 0.01M pH 7.4 hasta que la resina se vea homogénea. La columna se lavó con 1 ml o 2 de albúmina al 0.5 % en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.4.

SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA IODACION DE LA FSH METODO DE CLORAMINA T

SOLUCION DE CLORAMINA T

Cloramina T	5 mg
PBS 0-01M pH 7.4	3 ml

Se pesaron 5 mg de cloramina T y se disolvieron en 3 ml de PBS 0.01 M pH 7.4.

SOLUCION DE ALBUMINA

Albumina sérica bovina	0.5 g
PBS 0.01 M, pH 7.4	10 ml

Se pesaron 0.5 g de albúmina sérica bovina de Sigma y se disolvieron en 100 ml de PBS 0.01 M pH 7.4. Preparar esta solución al momento de emplearla.

METABISULFITO DE SODIO

Metabisulfito de sodio	15 mg
PBS 0.01 M pH 7.4	5 ml

Se pesaron 0.5 mg de metabisulfito de sodio y se disolvieron en 5 ml de PBS 0.01 M pH 7.4.

PBS 0.05 M

Fosfato monobásico de sodio	0.9 g
Fosfato dibásico de sodio	1.85 g
Cloruro de sodio	8.17 g

Se pesaron 0.9 g de fosfato monobásico de sodio, 1.85 g de fosfato dibásico de sodio y 8.17 g de cloruro de sodio. Se disolvieron en 800 ml de agua destilada desionizada estéril, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 100 ml.