

01674
36



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y LA SALUD ANIMAL**

**DISTRIBUCION DE ISOFORMAS DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE (LH) EN EL SUERO
DE LAS CABRAS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

SUSANA ROJAS MAYA

TUTOR:

DR. LUIS ZARCO QUINTERO

COMITE TUTORAL:

**DR. EVERARDO GONZALEZ PADILLA
DRA. ALEIDA OLIVARES SEGURA**

MEXICO, D. F.

2003

1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

DECLARACION DEL AUTOR

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliográfico.



Susana Rojas Maya

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A Conchita y Manuel gracias por todo el trabajo, esmero y cariño.

A mis hermanos, sobrinos y cuñados por su apoyo y cariño
A Emmanuel

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca crédito (138324), por el financiamiento del proyecto de investigación "Aislamiento y caracterización de isoformas de LH de bovinos y caprinos" (25748-B) de la cual forma parte este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser parte de mi formación.

Al H. jurado por los comentarios tan valiosos para enriquecer el trabajo:

Dr. Luis Zarco Quintero
Dr. Everardo González Padilla
Dra. Aleida Olivares Segura
Dr. Jaime Gallegos Sánchez
Dr. Héctor Vera Ávila

A Gerardo Perera Marín y Everardo González Padilla por todo el apoyo y la dedicación para hacer posible este trabajo.

A cada uno de los integrantes del departamento de Reproducción por ser tan indispensables para formar el equipo.

A Clara Murcia Mejía por todo lo que hemos aprendido en el laboratorio y por el apoyo para la realización de esta investigación.

A Luis López León gracias por las facilidades para utilizar a las cabras.

A todos mis compañeros que participaron en la fase experimental, gracias por su apoyo: Joel Hernández, Elena Castro, Ana Delia, Laura Edith, Bernardo, Soledad Díaz.

Al los integrantes del posgrado de la FMVZ por todo el trabajo para ayudar a la formación del estudiante.

Al Dr. Javier Flores por su paciencia y dedicación

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| DECLARACION | II |
| DEDICATORIA | III |
| AGRADECIMIENTOS | IV |
| RESUMEN | V |
| SUMMARY | VI |
| INDICE DE FIGURAS | VII |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Hormona liberadora de gonadotropinas | 4 |
| 2.2 Gonadotropos | 5 |
| 2.3 Regulación neuroendocrina del ciclo estral | 6 |
| 2.4 Anestro | 8 |
| 2.5 Composición de las gonadotropinas | 8 |
| 2.6 Isoformas de la Hormona luteinizante (LH) | 9 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO | 14 |
| 3.1 Objetivo | 14 |
| 3.2 Hipótesis | 14 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 4.0 Fase de campo | 15 |
| 4.0.1 Animales experimentales | 15 |
| 4.1 Procedimiento experimental | 15 |
| 4.1.1 Época de anestro | 15 |
| 4.1.2 Época reproductiva | 16 |
| 4.2 Determinación hormonal | 17 |
| 4.2.1 RIA de LH | 17 |
| 4.2.2 RIA de P ₄ | 17 |
| 4.3 Determinación de la heterogeneidad de la LH | 17 |
| 4.3.1 Cromatoenfoque | 17 |
| 4.4 Análisis estadístico | 19 |
| V. Resultados | 20 |
| 5.0 Concentración de la LH | 20 |
| 5.0.1 Concentración de la LH en el anestro con GnRH | 20 |
| 5.0.2 Concentración de la LH en la etapa reproductiva | 20 |
| 5.1 Patrón de elución de la LH durante el cromatoenfoque | 20 |
| VI. DISCUSIÓN | 29 |
| VII. CONCLUSIÓN | 34 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 35 |
| ANEXO I. REACTIVOS DEL RIA | 46 |
| ANEXO II. ABREVIATURAS | 47 |

RESUMEN

SUSANA ROJAS MAYA "Distribución de isoformas de la hormona luteinizante (LH) en el suero de cabras" Asesor Dr. Luis Zarco Quintero. Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México

El presente trabajo tuvo como propósito caracterizar el patrón de distribución de isoformas de la LH en el pico preovulatorio de cabras y en el anestro. Las cabras en anestro ($n=4$) se estimularon con 100 μ g de GnRH im y se muestrearon durante 5h cada 15 min y los animales ciclando ($n=6$) se muestrearon por 12h cada hora post-estro. El análisis de la LH del pico observado fue mediante radioinmunoanálisis y la heterogeneidad se identificó por medio del cromatofoco utilizando una columna de intercambio iónico (PBE-118), equilibrada con trietilamina 25mM, pH 11.0, con un gradiente de pH de 10.0 a 3.5. Las 150 fracciones se agruparon en básicas (pH>7.5), neutras (pH 7.5-6.5) y ácidas (pH<6.5), además por unidad de pH (>10, 9.99-9.0, 8.99-8.0, 7.99-7.0, 6.99-6.0, 5.99-5.0, 4.99-4.0 y 3.99-3.0). El porcentaje de la LH recuperada en cada fracción se transformó a arcoseno y se sometió a un análisis de varianza. Las proporciones de isoformas básicas (72.7 ± 1.70) fue mayor en el pico preovulatorio que en el anestro (53.9 ± 1.2), en contraste las formas neutras fueron menores en el pico preovulatorio (6.2 ± 2.3) que en anestro (17.6 ± 0.87), en tanto que no hubo diferencia estadística en las formas ácidas (19.1 ± 1.5 vs 28.0 ± 0.28 ; $p>0.05$). El análisis por unidad de pH en el pico natural e inducido fue respectivamente: pH>10 (0.94 ± 1.1 vs 4.6 ± 0.9 ; $p>0.05$); pH 9.99-9.0 (5.6 ± 1.5 vs 34.8 ± 0.59 ; $p<0.05$) y 8.99-8.0 (61.3 ± 1.4 vs 7.4 ± 0.78 ; $p<0.05$), sin diferencia a pH inferior ($p>0.05$) Las formas predominantes correspondieron a las básicas, sobre todo en pico natural. Es el primer estudio que informa la heterogeneidad de la LH en suero caprino.

Palabras clave: Anestro, Estro, Hormona luteinizante, Isoformas.

6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

The purpose of this research project was to characterize the luteinizing hormone (LH) isoforms distribution pattern in goats serum on the preovulatory peak and peak on anestrus. The goats anestrus ($n=4$) was stimulate with $100\mu\text{g}$ GnRH i.m and the samples were collected every fifty minutes after stimulus of GnRH for 5h and another group was collected every hour post-estrous during 12h. The peak LH observed was determined using radioimmunoassay tests, while LH heterogeneity was analyzed using chromatofocusing by cationic interchanges column (PBE-118), equilibrate with trietilamina 25mM, eluted with a pH gradient ranging from 10.0 to 3.5. The 150 fractions collected during chromatofocusing were grouped into basic ($\text{pH}>7.5$), neutral ($\text{pH } 7.5 \text{ to } 6.5$) and acidic ($\text{pH}<6.5$) isoforms and by pH units (>10 , 9.99-9.0, 8.99-8.0, 7.99-7.0, 6.99-6.0, 5.99-5.0, 4.99-4.0 y 3.99-3.0). The recuperate LH percentage on every fraction was transformed to arcoseno and was analyzed using variant analysis. The basic isoforms proportions (72.7 ± 1.70) were bigger than the anestrus (53.9 ± 1.2), in contrast the neutral forms on the preovulatory peak (6.2 ± 2.3) were smaller than anestrus (17.6 ± 0.87), and the acids forms (19.1 ± 1.5 vs 28.0 ± 0.28 ; $p>0.05$) not being significantly different. Per pH unit analysis the result on the natural peak and induced were: $\text{pH}>10$ (0.94 ± 1.1 vs 4.6 ± 0.9 ; $p>0.05$); $\text{pH } 9.99-9.0$ (5.6 ± 1.5 vs 34.8 ± 0.59 ; $p<0.05$) and $8.99-8.0$ (61.3 ± 1.4 vs 7.4 ± 0.78 ; $p<0.05$), without difference to the lowest pH ($p>0.05$). The predominant forms were the basic, especially on the natural peak. This is the first study that informs about the heterogeneity on goats serum.

Key words: Anoestrus, Estrous, Isoforms, Luteinizing hormone.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil de la LH en cabras en anestro, bajo la Administración i.m. de la GnRH (100 µg/animal). Las muestras se tomaron cada 15 min, después de la GnRH (flecha) y el círculo denota las muestras seleccionadas para el análisis en el cromatoenfoque.....22
- Figura 2.** Perfil de la LH durante el pico preovulatorio de cabras en época reproductiva. Las flechas señalan el momento del celo y el círculo denota las muestras seleccionadas para el análisis en el cromatoenfoque.....23
- Figura 3.** Gradiente de de pH (A) y el patrón de elución de proteínas séricas (B) determinadas por densidad óptica a 280nm.....24
- Figura 4.** Patrón de elución del suero caprino del grupo en época reproductiva. Las flechas señalan el cambio del amortiguador y la aplicación de NaCl 1M.....25
- Figura 5.** Patrón de elución del suero caprino del grupo en época de anestro. Las flechas señalan el cambio del amortiguador (pH 7.0 a pH 3.5) y la aplicación de NaCl 1M.....26
- Figura 6.** Distribución de isoformas de la LH. Análisis por grupo de isoformas, correspondientes a básicas (pH >7.5), neutras (pH, 6.5-7.5) y ácidas (pH<6.5). Las letras que no se comparten son diferentes (p<0.05).....27
- Figura 7.** Distribución de isoformas de LH en anestro y estro. Los resultados presentan el análisis de las isoformas por unidad de pH. * Diferencia entre tratamientos por unidad de pH (p<0.01). a,b,c diferencia dentro de tratamientos (p<0.05).....28

I. INTRODUCCIÓN

El proceso de reproducción en los caprinos es controlado a nivel de sistema nervioso central (SNC), por medio de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) sintetizada y liberada de manera pulsátil por el hipotálamo para estimular la síntesis y secreción de las hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) necesarias para el funcionamiento adecuado del proceso reproductivo (Chemineau et al., 1988; Tanaka et al., 1995).

La hembra caprina al igual que la ovina se caracteriza por ser poliéstrica estacional; ya que, presenta su actividad reproductiva durante el otoño hasta la primavera, presentándose durante este periodo una serie de ciclos estrales con una duración de 21 a 23 días, continuando con un periodo de no ovulación denominado anestro. Los esteroides gonadales, específicamente el estradiol (E_2) y la progesterona (P_4) son los reguladores importantes del ciclo estral; por ejemplo, en la fase folicular, el estradiol a nivel de hipotálamo e hipófisis estimula la liberación de la LH con pulsos de alta frecuencia y baja amplitud lo que genera el pico preovulatorio y durante la fase lútea inhibe la amplitud. (Karsch et al., 1984; Karsch et al., 1993; Tanaka et al., 1995). Durante el periodo de anestro los ciclos cesan, ya que hay una extremada sensibilidad en el hipotálamo a la retroalimentación negativa del estradiol (Legan y Karsch, 1979)

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la LH se secreta en múltiples formas moleculares, esta heterogeneidad molecular se debe en parte a

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula y constituye la base química de la formación de las isoformas o isohormonas. Los oligosacáridos le confieren propiedades biológicas e inmunológicas a cada isoforma (Baezinger y Green, 1988; Zalesky et al., 1991; Ulloa-Aguirre et al., 1999; Dias, 2001).

En los últimos años, con el propósito de conocer el patrón de distribución de las isoformas de la LH, se ha recurrido a la aplicación de análogos de GnRH en diferentes condiciones fisiológicas, para incrementar la concentración circulante de la hormona, la cantidad liberada depende del estado endocrinológico del donante, de la sensibilidad a la GnRH y de la reserva de la hormona en el gonadotropo. Para identificar la heterogeneidad se han empleado técnicas como el isoelectroenfoque (IEF) y el cromatoenfoque (CF). El CF se basa en la separación de la proteína de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), usando un gradiente de pH, que se seleccionaron en función de la proteína. La ventaja de utilizarlo es que conserva la actividad biológica e inmunológica de la proteína y permite un alto porcentaje de recuperación (Ulloa-Aguirre et al., 1995; Cooke et al., 1996).

En general, se han identificado isoformas básicas y ácidas de la LH en extractos hipofisarios, suero y orina; con diferente actividad biológica, en los bioensayos in vitro, se ha demostrado que las formas básicas presentan una alta actividad biológica, con una vida media corta en la circulación (Cooke et al., 1996) a diferencia de las isoformas que eluyen a un pH ácido, que presentan una menor actividad biológica in vitro, pero con una mayor vida media en la circulación (Ulloa-Aguirre et al., 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La mayor información de la heterogeneidad de las isoformas séricas de gonadotropinas ha sido reportada en humanos en diferentes estadios fisiológicos, por ejemplo en mujeres posmenopáusicas (Wide et al., 1996) en la obesidad (Castro-Fernández et al., 2000) en el ciclo menstrual (Padmanabhan et al., 1988) y en la senectud (Wide et al., 1985).

Sin embargo en animales domésticos, la información se ha limitado a nivel hipofisiario, por ejemplo, en diferentes fases del ciclo estral, en el anestro o en animales ovariectomizados (OVX), bajo el efecto de esteroides (Zalesky et al., 1991; Stumpf et al., 1992; Zalesky et al., 1992; Padmanabhan et al., 1992; Hassing et al., 1993; Kojima et al., 1995; Christianson et al., 1998). En la actualidad no existen reportes para las isoformas circulantes de la LH en animales domésticos en particular en la especie caprina por lo que consideramos de gran importancia utilizarla como modelo experimental.

Por lo tanto el objetivo del trabajo fue investigar el patrón de distribución de las isoformas de la LH presentes en suero de la especie caprina, en dos etapas fisiológicas, que correspondieron al pico preovulatorio y al pico inducido con GnRH durante la época de anestro.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

El control en la liberación de gonadotropinas se realiza por las neuronas secretoras de la GnRH, que se originan fuera del sistema nervioso central en la placa olfatoria, las cuales migran hacia la parte anterior del cerebro y se agrupan como redes laxas dispersas en el hipotálamo medio basal (HMB). La mayoría de los cuerpos celulares productores de la GnRH, se localizan en el área preóptica (APO) cerca de la línea media y en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT); envolviendo a la región anterior del tercer ventrículo, con abundantes cuerpos neuronales y axones, que terminan en el plexo portal (Caldani *et al.*, 1988; Duittoz y Batailler, 2000).

Las neuronas de la GnRH, representan el componente final de la salida de una red neuronal, que integra múltiples factores medioambientales e internos para regular la secreción de hormonas reproductivas. El circuito neuronal responsable de la activación rítmica de las neuronas de la GnRH es conocido como el generador de pulsos del hipotálamo, en donde la frecuencia y amplitud de pulsos varía durante el ciclo reproductivo (Lincoln *et al.*, 1985; Moenter, 1992; Skinner *et al.*, 2000).

La pulsátilidad de la GnRH en la hembra es controlada por dos áreas separadas en el hipotálamo conocidas como núcleos hipotalámicos tónico y cíclico; el centro tónico, se localiza en el núcleo ventromedial y el núcleo arcuato, responsables de la secreción basal de la GnRH, durante el anestro y en la fase lútea, el otro centro es el denominado el centro cíclico o centro preovulatorio, ubicado en el área hipotalámica anterior, núcleo supraquiasmático y en el núcleo preóptico, encargados de generar el pico preovulatorio (Karsch *et al.*, 1984). La GnRH secretada llega al sistema porta-hipofisiario y de ahí a la hipófisis anterior, estimulando así la síntesis y secreción de LH y FSH. La alta frecuencia de pulsos de GnRH favorece la síntesis de la LH, en tanto que la baja frecuencia favorece la de FSH (Chemineau *et al.*, 1988; Goodman *et al.*, 2000).

En el anestro la baja frecuencia de pulsos de GnRH, es generada por la retroalimentación negativa del estradiol, lo que marca una disminución en la frecuencia de secreción de LH (Chemineau *et al.*, 1988). Esta supresión en la actividad secretora de las neuronas productoras de la GnRH durante el anestro, ocurre a través de un mecanismo neural en el hipotálamo, en donde se ha propuesto que el grupo de neuronas que actúan en el anestro no actúan durante la época reproductiva (Pau y Jackson, 1985; Xiong *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999)

2.2 Gonadotropos

Las células hipofisarias responsables de la síntesis y secreción de la LH y FSH se les denomina gonadotropos, localizados en la parte distal de la hipófisis anterior, y ocupan solo el 7 al 15%, del tejido hipofisario caracterizado por una población de células heterogéneas. Estudios inmunohistoquímicos, han demostrado la presencia de gonadotropos pequeños, que contienen solamente LH o FSH, denominados monohormonales, que representan el 62%; mientras las células grandes que contienen LH y FSH, denominados gonadotropos bihormonales y corresponden al 38%, cuya proporción de células se modifica de acuerdo a la etapa del ciclo estral (Childs *et al.*, 1994; Smith y Jennes, 2001).

La actividad de síntesis y secreción del gonadotropo es regulada por la GnRH, esteroides y péptidos gonadales. La frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH modulan el tipo de respuesta hipofisaria. Por ejemplo, en el proestro, cuando las concentraciones de estradiol e inhibina son altas, el número de receptores a la GnRH en la hipófisis en comparación con el estro o el metaestro (Child *et al.*, 1992; Brown y McNeilly, 1999; Crawford *et al.*, 2000).

El mecanismo de acción de la GnRH sobre los gonadotropos está mediado por la unión de la hormona con el receptor, activando a la enzima fosfolipasa C, generando la producción de dos segundos mensajeros, el trifosfato de inositol (IP3) y el 1,2-diacilglicerol (DAG). El primero de ellos aumenta el calcio intracelular y desencadena la liberación de las gonadotropinas preformadas por exocitosis. El diacilglicerol activa la protein-Cinasa C (PKC), lo cual induce la

regulación de la síntesis de gonadotropinas, tanto las Cinasas dependientes de la calcio-calmodulina como las Cinasas dependientes de los calcio-fosfolípidos están involucrados en la estimulación de la liberación de la LH (Anderson, 1996).

2.3 Regulación neuroendocrina del ciclo estral

Durante la época reproductiva de la cabra, la frecuencia y amplitud de pulsos de LH varía durante el ciclo estral; en la fase folicular se presenta un pulso cada 90 min mientras que durante la fase lútea temprana se presenta un pulso cada 4h y en la fase lútea tardía se presenta un pulso cada 12h, siendo diferente en el anestro en donde se presentan solo dos pulsos cada 24h (Karsch *et al.*, 1984; Herbinson, 1998).

Esta variabilidad en la pulsátilidad de la GnRH y en consecuencia de la LH, es provocada por el estradiol y la progesterona. Por ejemplo, el estradiol estimula a nivel del hipotálamo la frecuencia de pulsátilidad de la GnRH, en tanto que a nivel de la hipófisis estimula la síntesis de la LH, generando así pulsos de alta frecuencia y baja amplitud. En la fase lútea, la progesterona inhibe la pulsátilidad de la GnRH y a nivel de la hipófisis, participa disminuyendo la síntesis de la LH, lo que conduce a pulsos de baja frecuencia y alta amplitud (Goodman y Karsch, 1980; Karsch *et al.*, 1983).

De acuerdo con el estado reproductivo, el estradiol puede regular la biosíntesis de la GnRH a través de modificaciones en la expresión de genes de gonadotropinas; por ejemplo, al administrar un antagonista de los opiodes durante la fase lútea para incrementar la frecuencia de los pulsos de LH, se observa la expresión de genes, únicamente en las neuronas de GnRH en el hipotálamo medio basal (HMB). Similarmente, cuando la frecuencia de pulsos de LH fue inducida a ovejas en estro por exposición al macho, la expresión del gen fue otra vez observada únicamente en las neuronas de GnRH en el HMB (Boukhliq *et al.*, 1999)

El incremento en los pulsos de LH, estimula el desarrollo folicular a nivel de las células de la teca y de la granulosa para producir estrógenos y enzimas

involucradas en la esteroidogénesis. En el cuerpo lúteo, existen dos tipos de células, las células lúteas pequeñas, originarias de las células de la teca, que contienen receptores para la LH y responden a esta, incrementando la secreción de progesterona de 5 a 15 veces, mientras que las células lúteas grandes originarias de las células de la granulosa, secretan altas concentraciones de progesterona y no responden a los pulsos de LH (Fortune, 1994; Niswander *et al.*, 2000).

Las neuronas que controlan la secreción de GnRH reciben inervación de otras neuronas capaces inhibir la función gonadal por medio de ciertos neurotransmisores; por ejemplo, las neuronas productoras de ácido gama amino butírico (GABA) y las de los opiodes endógenos, aminoran la excitabilidad eléctrica de las neuronas. En el área preóptica, las neuronas de GABA son importantes en la regulación de neuronas de GnRH, además de poseer receptores para el estradiol y forman parte del grupo neural que controla la secreción de la LH (Krsmanovic *et al.*, 1998; Seong-Kyu *et al.*, 2002)

Los opiodes, participan como intermediarios en la disminución de la amplitud de los pulsos de GnRH, la disminución en el tono opioide es crítica para permitir el pico de LH. Esto se ha demostrado al aplicar tratamientos con antagonistas de los opiodes, como la naloxona, que incrementa la amplitud de los pulsos de GnRH en ovejas OVX (Goodman *et al.*, 1995). Se ha reportado en la oveja y en la rata, que previo al pico preovulatorio de GnRH/LH, existe una activación de los opiodes endógenos, particularmente de la β -endorfina, lo que permite una acumulación de GnRH en las terminaciones nerviosas de la eminencia media. En la oveja, la disminución de la β -endorfina provoca una activación del sistema adrenérgico y noradrenérgico y por la secreción preovulatoria de GnRH (Caraty *et al.*, 1989; Evans, 1999).

2.4 Anestro

El anestro es caracterizado por una incrementada sensibilidad a la retroalimentación negativa del estradiol causando una disminución en la frecuencia de pulsos de la LH. El mecanismo detrás de la retroalimentación negativa del estradiol no esta completamente entendido. Se considera a las neuronas dopaminérgicas o adrenérgicas como mediadoras de la retroalimentación negativa de los estrógenos (Goodman *et al.*, 1982). Las porciones terminales de las neuronas secretoras de GnRH y las neuronas dopaminérgicas se encuentran muy cercanas entre si en la eminencia media del hipotálamo de la oveja, estableciéndose sinapsis funcionales (Smith y Jennes, 2001)

2.5 Composición de las gonadotropinas

Las gonadotropinas hipofisarias, junto con la TSH y eCG son glicoproteínas estructuralmente similares, formadas por dos subunidades denominadas subunidad alfa (α) y subunidad beta (β), unidas entre si por fuerzas no covalentes. La subunidad α es idéntica entre estas glicoproteínas en la misma especie, y esta conformada por la misma secuencia de aminoácidos (aa), mientras que la subunidad β es única para cada hormona y le confiere especificidad biológica (Cooke *et al.*, 1996)

La secuencia primaria de aa, que codifica para la subunidad α en diferentes especies, presentan una homología del 75 al 100%, por ejemplo: bovino y equinos tienen una homología del 82%, mientras que el bovino y el humano solo tienen el 75%; sin embargo entre bovinos y ovinos su secuencia es homologa al 100% (Pierce y Parson, 1981; Keel *et al.*, 1987)

La subunidad β de cada glicoproteína tiene una secuencia de aa altamente conservada entre las diferentes glicoproteínas intra e inter especie (82% de homología). Una particularidad de esta subunidad, es que de ella depende la actividad hormonal específica en cada glicoproteína, que se expresa en su

totalidad, cuando esta subunidad se asocia con la subunidad α (Pierce y Parson, 1981; Cowley *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 1996)

Los oligosacáridos unidos a la subunidad α son críticos para el ensamble de subunidades, integridad, secreción, así como también, para la señal de traducción; mientras que, los oligosacáridos unidos a la subunidad β son importantes para el ensamblaje y secreción, así como, en el rango de eliminación (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001)

2.6 Isoformas de la hormona luteinizante

La hormona luteinizante no es una hormona de estructura única sino que esta constituida por un grupo de isoformas, la presencia de variaciones en la estructura y distribución de oligosacáridos sializados y sulfatados constituye la base química para la formación de las isoformas. Los oligosacáridos presentes en estas proteínas son de dos tipos, los del tipo N-unidos; es decir, aquellos carbohidratos acoplados covalentemente al nitrógeno del grupo amida de la asparagina, y los O-unidos por medio de un enlace covalente al oxígeno del grupo hidróxilo de la serina o treonina. Ambos tipos de oligosacáridos existen en las gonadotropinas, pero predominan los oligosacáridos N-unidos. La estructura básica de los oligosacáridos unidos a las glicoproteínas está formada por dos moléculas de N-acetilglucosamina-nueve moléculas de manosa y tres moléculas de glucosa, incorporando al péptido naciente de cada subunidad en el retículo endoplásmico rugoso, en donde, sufren modificaciones postraduccionales en conjunto con la proteína, mientras las modificaciones finales del oligosacárido, se realizan en el aparato de Golgi, a través de enzimas específicas como manosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetil galactosamina y ácido siálico (Baezinger y Green, 1988)

Los oligosacáridos, se han clasificado de acuerdo al tipo de ramificación (mono di o triramificados) así como, al residuo final, por ejemplo, sializados (N), sulfatados (S) y una mezcla, sializados/sulfatados (S-N). La cantidad relativa de cada tipo de oligosacárido, varía dependiendo de la hormona, así como de la

especie, es decir para la FSH bovina se han identificado oligosacáridos con dos ramas sializadas (N-2); mientras que, para la TSH humana solo se han identificado oligosacáridos con residuos de ácido siálico, a diferencia de la TSH bovina que presenta oligosacáridos del tipo neutro (N-S). En el caso de la LH bovina se caracteriza por no presentar ácido siálico, pero presenta el 67% de sulfatados; mientras en la LH ovina (oLH) solo el 5% están sializados y el 73% sulfatados con una pequeña mezcla (0.07%). Se localizan en sitios específicos de cada subunidad y son determinantes importantes de la actividad biológica, inmunológica *in vivo* e *in vitro* de cada hormona (Baezinger y Green, 1988; Cooke *et al.*, 1996). La presencia del ácido siálico es un factor determinante en la unión hormona-receptor, otorgando la actividad biológica *in vivo*, isoformas con menor cantidad de ácido siálico son rápidamente depuradas de la circulación (Burgon *et al.*, 1996)

La glicosilación de las gonadotropinas es un proceso altamente complejo dentro del gonadotropo, este es modulado por una variedad de factores extrahipofisarios de origen gonadal e hipotálamico. En particular los estradiol y andrógenos parecen para regular la sialización y/o sulfatación terminal de los oligosacáridos unidos y de aquí algunas de las propiedades de la molécula de gonadotropinas determinada por los residuos; por ejemplo, la eliminación metabólica y la potencia *in vivo*. A través de las entradas hipofisarias, la hipófisis anterior no puede regular únicamente lo la cantidad sino también la calidad de la hormona liberada por la gónada en una condición fisiológicas o patológicas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001)

El estradiol es el principal modulador de la glicosilación, ya que modifica la tasa de síntesis y secreción de la GnRH e induce la síntesis y expresión del mRNA que codifica para la subunidades de la LH. Altas concentraciones de estradiol favorece la síntesis y secreción de isoformas ácidas de la LH, a través del mecanismo celular de las glicosiltransferasas (N-acetilgalactosamina transferasa y sulfotransferasa) en la incorporación de galactosa y de sulfato (Castro-Fernández *et al.*, 2000).

La variación en la abundancia relativa de las gonadotropinas hipofisarias y circulantes han sido documentadas en varias condiciones fisiológicas, caracterizadas por cambios profundos en el medio ambiente endocrino; por ejemplo, en la pubertad (Phillips *et al.*, 1997), ciclo menstrual y en la senectud (Anobile *et al.*, 1998) informando como una alteración en los esteroides sexuales influye en la glicosilación terminal y en las propiedades funcionales de las gonadotropinas. En el humano, por ejemplo, pacientes con síndrome de ovario poliquístico, la existencia de una alta proporción de isoformas básicas de LH en la circulación con una elevada bioactividad *in vitro* de la hormona, sugieren que la señal de GnRH y un efecto permisivo en el gonadotropo por el estradiol, podría promover un incremento en la producción de isoformas básicas; es decir menos sializadas (Ropelato *et al.*, 1999). En el hombre, la obesidad es asociada con niveles bajos de testosterona y altos niveles de estradiol. En esta condición la obesidad provoca un incremento selectivo de las isoformas de LH menos ácidas, las cuales pueden potencialmente modificar la intensidad y la duración de la señal liberada de LH sanguínea por la gónada (Castro-Fernández., 2000).

En los rumiantes se ha identificado en patrón de distribución de la LH en el tejido hipofisario bajo diferentes condiciones fisiológicas, por ejemplo, Stumpf *et al.* (1992) identificaron que el patrón la distribución intrahipofisaria de las isoformas de LH y FSH, utilizando como modelo experimental vaquillas prepúberes OVX, OVX+E₂ e intactas. En el grupo OVX causó un incremento en las isoformas básicas y la administración de estradiol restableció el patrón de distribución a niveles similares a los de los animales intactos.

Por otro lado, en bovinos, se ha reportado el efecto del E₂ sobre el patrón de distribución de isoformas hipofisarias de LH y FSH durante la fase folicular del ciclo estral. Se utilizó como modelo experimental un grupo control, otro OVX y el tercero de OVX+E₂, presentando patrones de distribución similares para LH y FSH, ya que al remover el ovario resultó un ligero incremento en el porcentaje de isoformas básicas, mientras que al remover el ovario y aplicar E₂ el

patrón fue imitado. El incremento en las concentraciones de E₂ durante la fase folicular del ciclo estral resultan en un incremento en el porcentaje de isoformas de LH ácidas. Esto no fue influenciado por la OVX o por el tratamiento con E₂ sobre la distribución de isoformas de FSH en la hipófisis. Así, la heterogeneidad de las gonadotropinas parece no cambiar significativamente durante la fase folicular del ciclo estral bovino (Kojima *et al.*, 1995)

En extractos hipofisarios de ovejas en la fase folicular, lútea y en el anestro se informó de la presencia de 13 isoformas de LH en las tres etapas analizadas por medio del cromatofluorograma. La isoforma predominante eluyó a pH 9.3, con un porcentaje en la fase folicular del 51.7%, en la fase lútea 50.8% y durante el anestro de un 48.9%. La distribución de LH intrahipofisaria entre estas isoformas no cambió significativamente entre las fases del ciclo estral, pero un alto porcentaje (21.3%) de básicas débiles y formas ácidas pH 6.4 estuvieron presentes durante el anestro. De aquí se concluyó que la heterogeneidad de la LH intrahipofisaria cambia mínimamente a través del ciclo estral de la oveja (Zalensky *et al.*, 1992)

Además, Christianson *et al.* (1998) al suplementar con andrógenos animales OVX reporta que la heterogeneidad de la LH es hormonalmente regulada, ya que incrementa en el porcentaje de isoformas básicas de LH en la hipófisis ovina usando extractos hipofisarios de machos castrados versus enteros. Zalensky *et al.* (1993) observaron que al inmunizar contra GnRH, se modula el contenido, así como la distribución de las isoformas de LH, en machos intactos e inmunizados u machos OVX e inmunizados OVX observaron que se reduce la cantidad de LH inmunoreactiva en la hipófisis.

Con base en estos estudios, se documenta que la heterogeneidad estructural de las gonadotropinas representa una repercusión importante en la actividad biológica, en el humano las formas básicas de LH son más activas *in vitro* que las ácidas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). En rumiantes estudios a nivel

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hipofisiario, reportaron que las isoformas medianamente alcalinas, son más bioactivas que las básicas o las ácidas (Zalensky *et al.*, 1992; Kojima *et al.*, 1995)

III. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El polimorfismo de las gonadotropinas se debe en parte a la estructura interna de los oligosacáridos que las conforman, lo que conduce a un cambio en la actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) e inmunológica, generando características particulares a cada miembro de la familia de las gonadotropinas. Estas evidencias han sido documentadas en la especie humana, roedores, y algunos rumiantes. Sin embargo los estudios en bovinos y ovinos, se han limitado a la heterogeneidad de la LH presente en la adenohipófisis. Es por ello que este estudio, se enfocó a conocer el patrón de heterogeneidad de la LH en la circulación, de la cual no existen evidencias en la actualidad, más aun utilizando a la cabra como modelo experimental. Con base en ello, se planteó el siguiente objetivo.

3.1 Objetivo

Conocer el patrón de distribución de las isoformas de la LH presentes en suero de la especie caprina, en dos etapas fisiológicas correspondientes al estro (pico preovulatorio) y al anestro (pico inducido con GnRH).

3.2 Hipótesis

La hipótesis nula fue que el patrón de distribución de isoformas sería similar entre las dos condiciones fisiológicas muestreadas y comparable a lo observado en extractos pituitarios de caprinos y de otros rumiantes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.0 Fase de campo

El trabajo se desarrollo en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, el cual se encuentra en el Km. 29 de la carretera Federal México-Cuernavaca, en la delegación de Tlálpan, D.F; a una altura de 2760 msnm, a 19°13' latitud norte y 99° latitud oeste. El clima de la zona es de tipo C(w)(w)b(ij), que corresponde al semifrío-semihúmedo con lluvias en verano, según la modificación al sistema de clasificación climatológica de Köepen (García, 1981). La precipitación pluvial anual es de 800 a 1200 mm y la temperatura promedio de 10°C.

4.0.1 Animales experimentales

Se utilizaron para el anestro (n=4) y estro (n=6) hembras caprinas criollas, multiparas, alimentadas con heno de avena, ensilado de maíz, alfalfa achicalada concentrado y agua *ad libitum*.

4.1 Procedimiento experimental

4.1.1 Época de anestro

Con el propósito de caracterizar el patrón de distribución de las isoformas de la LH circulantes en periodo de anestro, fue necesario incrementar la concentración de la LH en el suero, mediante el estímulo exógeno con GnRH. Para ello, primero se realizó una inspección ultrasonográfica de los ovarios para garantizar la condición de anestro de las cabras, corroborando en los niveles plasmáticos de progesterona. Aquellos animales que presentaron folículos $\leq 5\text{mm}$ y concentraciones de P_4 menores a 1 ng/ml se incluyeron en este estudio.

Una vez seleccionados los animales, de manera individual se le aplicó una dosis i.m. de 100 µg de un análogo de GnRH (Fertagyl-intervet) en 1 ml de solución salina fisiológica; previo a la aplicación de la dosis de GnRH, se tomaron dos muestras de sangre con intervalo de una hora entre ellas, y posterior a ello se tomaron las muestras cada 15 min durante 5 h. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular, en tubos con vacío con un gel activador de la coagulación (Vacutainer, Becton-Dickinson), se centrifugaron a 1500 x g durante 10 minutos y los sueros se conservaron a -20°C hasta su análisis.

4.1.2 Época reproductiva

Con el propósito de caracterizar el patrón de distribución de las isoformas circulantes de la LH en el estro (pico preovulatorio), este estudio se realizó durante mes de Septiembre, bajo un esquema de doble sincronización con PGF2α. Para ello se utilizaron 7 hembras a las que inicialmente se les realizó un ultrasonido de los ovarios y solo aquellas que presentaran cuerpo lúteo y niveles de progesterona mayores de 1 ng/ml, se incluyeron en este estudio.

Se seleccionaron cabras ciclando que mostraron presencia de cuerpo lúteo (ultrasonido) y concentraciones séricas de progesterona menores a 1 ng/ml. Para sincronizar el celo en el grupo y facilitar así la toma de muestra, se procedió a administrar a cada cabra, 0.75µg de prostaglandina por vía i.m. (PGF2α, Preloban, Hoechst Roussel Vet) y se repitió el mismo tratamiento nueve días después. A partir de la segunda administración de PGF2α, se procedió a detectar calores con la presencia del macho. A partir de la detección del celo, se inició el muestreo cada hora durante 12 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min y los sueros se conservaron a -20°C hasta su análisis.

4.2 Determinación hormonal

4.2.1 RIA de LH

El sistema analítico de cuantificación para la LH, correspondió a un RIA heterólogo de fase líquida, específico, de 120 horas de incubación a 4°C, utilizando como sistema de separación al segundo anticuerpo (Velasco 2000). El sistema consistió en incubar la muestra (300µl) y/o el estándar (100µl) en presencia de 200 µl de primer anticuerpo (anti-oLH-26; dilución de trabajo de 1:20,000) que contenía suero normal de conejo (1:1600) por un periodo de 48 h a 4°C; al termino, se colocó la hormona marcada con ¹²⁵I (100µl) con una masa radioactiva de 14000 cpm, continuando con la incubación por 48h. Finalmente se adicionaron 200 µl de segundo anticuerpo (dilución 1:80) por tubo y se continuó la incubación por 24h. La separación de la fracción unida de la libre se obtuvo por centrifugación (1500 X g/30 min/ 4°C), previa adición de 1 ml de PBS-BSA al 0.1%/tubo. La fracción unida se cuantificó en un espectrómetro de radiaciones gamma durante 1 minuto y los cálculos se realizaron con el programa "riastat". El sistema presentó una sensibilidad de 0.03 ng/tubo, con un coeficiente de variación intraensayo (6.40%) e interensayo (14.26%) para la dosis esperada al 50% de la relación Logit-Log (ED₅₀). La especificidad de sistema correspondió a 0.005 ng/tubo para FSH y TSH. La GH y Prolactina no fueron detectables.

4.2.2 RIA de P₄

El RIA P₄ se realizó con un kit comercial de la marca Diagnostic Products Corporation (DPC) con una sensibilidad de 0.1 ng/ml, con un coeficiente de variación intraensayo del 6.35%.

4.3 Determinación de la heterogeneidad de la LH

4.3.1 Cromatoenfoque

Con el fin de identificar las diferentes formas moleculares de LH presentes en el suero caprino, se desarrollo un sistema cromatográfico de intercambio iónico (cromatoenfoque). Para ello, una vez determinada la

concentración de la LH en las muestras sanguíneas colectadas en las dos etapas del estudio, se seleccionaron solo aquellas que presentaron las concentraciones más altas de LH en cada animal (Figuras 1 y 2) y la mezcla de suero (12 ml) de cada animal, se sometió a diálisis (Spectra/Por # 1) con límite de exclusión de 12,000 a 14,000 daltones, durante 48h a 4°C, con cambios sucesivos de agua desionizada cada 8h, con el propósito de clarificar y eliminar pequeños péptidos contenidos en la muestra. Al término de la diálisis las muestras fueron divididas en un volumen de cuatro ml y liofilizadas. Cada muestra dializada y liofilizada se resuspendió en 2 ml de amortiguador Pharmalyte, 1:45, pH 7.0, y para clarificar la muestra, se centrifugo a 1500 X g / 20 min, y se le determino la cantidad de proteína total (Bollang and Stuart ,1991) con el propósito de colocar 20 mg de proteína por columna.

El intercambiador iónico (PBE-118; Pharmacia) se empaco en columnas de vidrio (0.7 X 27 cm) se equilibrio a 4°C, con 15 volúmenes de Trietilamina-HCl (0.025mM, pH 11.0), con un flujo de 7 ml/h. Previo a la aplicación de la muestra se colocaron 4 ml de amortiguador de corrida, con el objeto de evitar una exposición de la muestra a valores de pH extremo. Una vez colocada la muestra de suero, se colectaron 70 fracciones de 2 ml c/u, con el amortiguador de corrida; cuando no se detecto cambio de pH en las fracciones colectadas, se aplicó un segundo amortiguador que correspondió al polybuffer-74 (1:8, pH 4.0), y se continuó la corrida hasta observar que las fracciones presentaran un pH de 3.5 o menor, en ese momento se aplicó una alta fuerza iónica (NaCl,1M), y se colectaron 20 fracciones más, con el propósito de recuperar las proteínas que no eluyeron con el gradiente de pH. Durante la corrida cromatográfica, se determinó el pH a cada fracción, y las primeras fracciones (1-70) se neutralizaron con 200 µl de una solución TRIS-HCl (1.1 M, pH 7.4), mientras que las fracciones eludías con el segundo amortiguador y el NaCl (71-160) se neutralizaron con imidazol (pH 7.0). El intercambiador iónico como los amortiguadores empleados fueron desgasificados 30m antes de su utilización, con el fin de evitar que los iones de bicarbonato provocaran fluctuaciones en el gradiente de pH. Al termino de cada

cromatoenfoque se determinaron las concentraciones de LH por el medio del RIA en cada fracción. Los resultados se expresaron como el porcentaje de LH recuperada hasta antes de la aplicación del NaCl. La LH se agrupó, según el pH de elución en isoformas básicas ($\text{pH} > 7.5$), neutras ($\text{pH} 7.5-6.5$) y ácidas ($\text{pH} < 6.5$) y por unidad de pH (> 10 ; 9.99-9.0; 8.99-8.0; 7.99-7.0; 6.99-6.0; 5.99-5.0; 4.99-4.0 y 3.99-3.0).

4.4 Análisis estadístico

El porcentaje de la LH eluida en cada rango de pH se convirtió a arcoseno, para su análisis de varianza, considerando como variable independiente la etapa del ciclo (reproductiva o anestro). Se utilizó el paquete estadístico SAS.

V. RESULTADOS

5.1 Concentración de la LH

5.1.1 Concentración de la LH en el anestro con GnRH

La concentración sérica de la LH en cabras en anestro (n=4) que recibieron GnRH, mostró un incremento a los 30 min, de la aplicación del tratamiento, alcanzando una concentración máxima de 12.25 ± 1.88 ng/ml de LH, a las 2.0 ± 0.68 h con una duración del pico de 4.41 ± 0.075 h desde el ascenso hasta el descenso (Figura 1).

5.1.2 Concentración de la LH en la etapa reproductiva

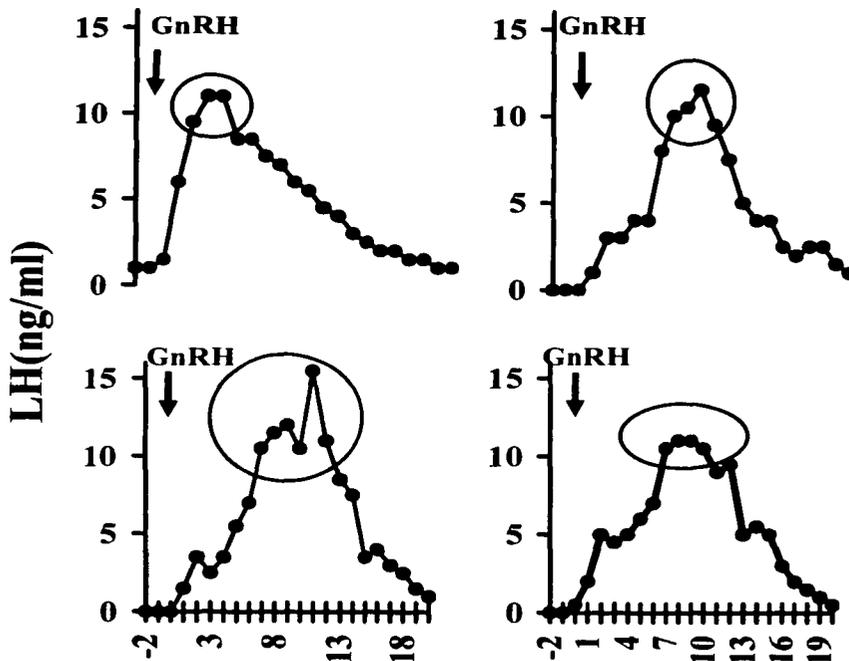
La concentración de LH en los animales en época reproductiva (n=7) presentaron una elevación a las 6.57 ± 1.7 h después de que se observó la conducta de celo. La concentración máxima promedio de LH fue de 35.76 ± 12.25 ng/ml y la duración del pico en tres cabras fue de 7.2 ± 0.75 h (Figura 2).

5.2 Patrón de elución de la LH durante el cromatofoco

El patrón del gradiente de pH durante la corrida cromatográfica, se ejemplifica en la Figura 3-A, en donde se observaron en todos los sueros analizados, dos mesetas que correspondieron a la estabilidad en pH 7.0 y en pH 3.5. La Figura 3-B presenta el patrón de elución de las proteínas presentes en el suero, previamente dializado, liofilizado y resuspendido en amortiguador de corrida, determinado por espectrofotometría a 280nm. El análisis del suero en ambas condiciones fisiológicas, presento un patrón semejante de elución, con un pico de proteína bien definido en un rango de pH 9.0 a 8.0; no se observo una elución de proteínas a pH 7.0, sin embargo una gran proporción de la proteína aplicada a la columna se eluyo a pH inferior de 7.0. Finalmente, con la aplicación de NaCl 1M se desprendió una pequeña porción de proteína que no eluyo con el gradiente de pH 11.0 a 3.5.

El patrón de elución de las isoformas de la LH, correspondientes al pico preovulatorio y al anestro, luego de la aplicación de la GnRH se presentan en las Figuras 4 y 5. La proporción de las isoformas que eluyeron a pH básico, neutro o ácido en las dos condiciones estudiadas (Figura 6). La proporción de isoformas básicas ($\text{pH} > 7.5$) de LH en el pico preovulatorio ($72.7 \pm 1.70 \%$) fue superior ($p < 0.05$) a la observada en el grupo en anestro tratado con GnRH ($53.9 \pm 1.2\%$); las isoformas neutras ($\text{pH} 7.5-6.5$) fueron menores ($p < 0.05$) en el pico del estro ($6.2 \pm 2.3\%$) que en el pico inducido en anestro ($17.6 \pm 0.87\%$) y las isoformas ácidas no mostraron diferencia ($P > 0.05$) (28.0 ± 0.28 en el pico del estro y 19.1 ± 1.5 en anestro). Finalmente las proteínas que eluyeron después de la aplicación de NaCl 1M no se incluyeron en este análisis, ya que estudios previos en este laboratorio demostraron que no se trata de LH, sino de un artefacto debido a la alta fuerza iónica generada por el NaCl 1M en las fracciones, lo que interfiere en la reacción antígeno anticuerpo.

La agrupación por unidad de pH, en ambas condiciones estudiadas (Figura 7) permitió observar que la proporción de isoformas eluidas a $\text{pH} > 10$ no mostró diferencias, sin embargo, la diferencia más evidente se observó en los rangos siguientes: en el pico preovulatorio, entre $\text{pH} 8.0$ y 9.99 eluyó el 66.9% de la LH, en tanto que en el anestro lo hizo el 42.2% ($p < 0.05$). La otra diferencia detectada fue en la proporción relativa de las isoformas más ácidas ($\text{pH} < 4.0$) con un porcentaje del $8.5 \pm 2.2\%$ de la LH en el pico del estro y un $20.3 \pm 4.0\%$ en el pico inducido con GnRH durante el anestro ($p < 0.05$). En la proporción de LH eluida por unidad de pH, entre $\text{pH} 4.0$ y 7.99 , no hubo diferencia ($p > 0.05$) entre las condiciones muestreadas.



No de muestra

Figura 1. Perfil de la LH en cabras en anestro, bajo la administración i.m. de la GnRH (100 µg/animal). Las muestras se tomaron cada 15 min, después de la GnRH (flecha) y el círculo denota las muestras seleccionadas para el análisis en el cromatoenfoque

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

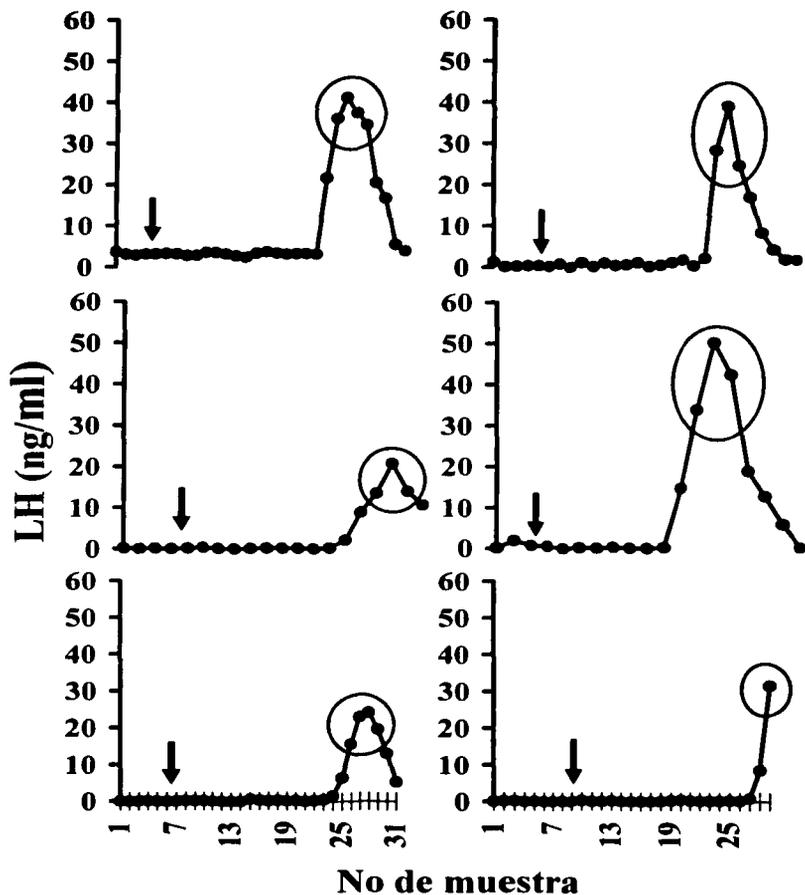


Figura 2. Perfil de la LH durante el pico preovulatorio de cabras en época reproductiva. La flechas señalan el momento del celo y el círculo denota las muestras seleccionadas para el análisis en el cromatoenfoque.

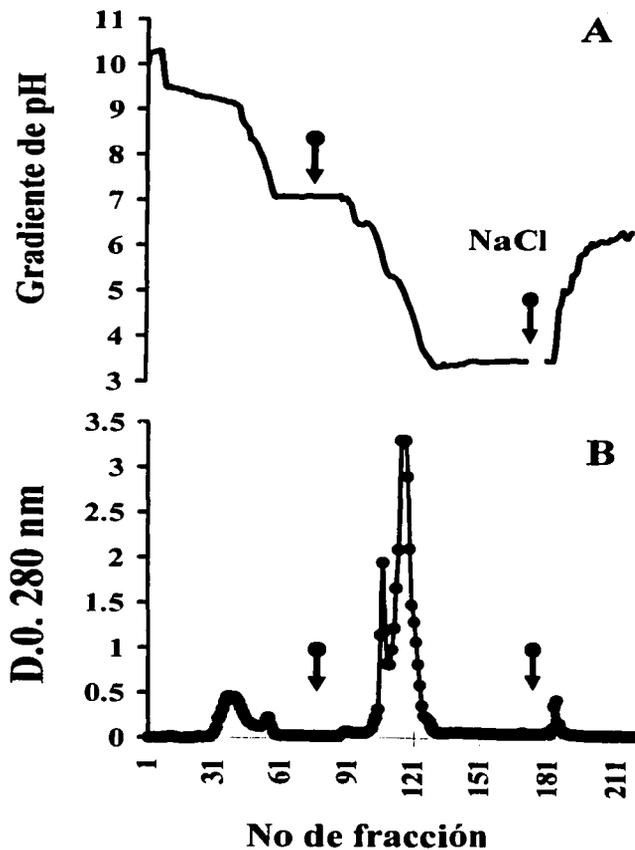


Figura 3. Gradiente de pH (A) y el patrón de elución de las proteínas séricas (B) determinadas por densidad óptica a 280 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

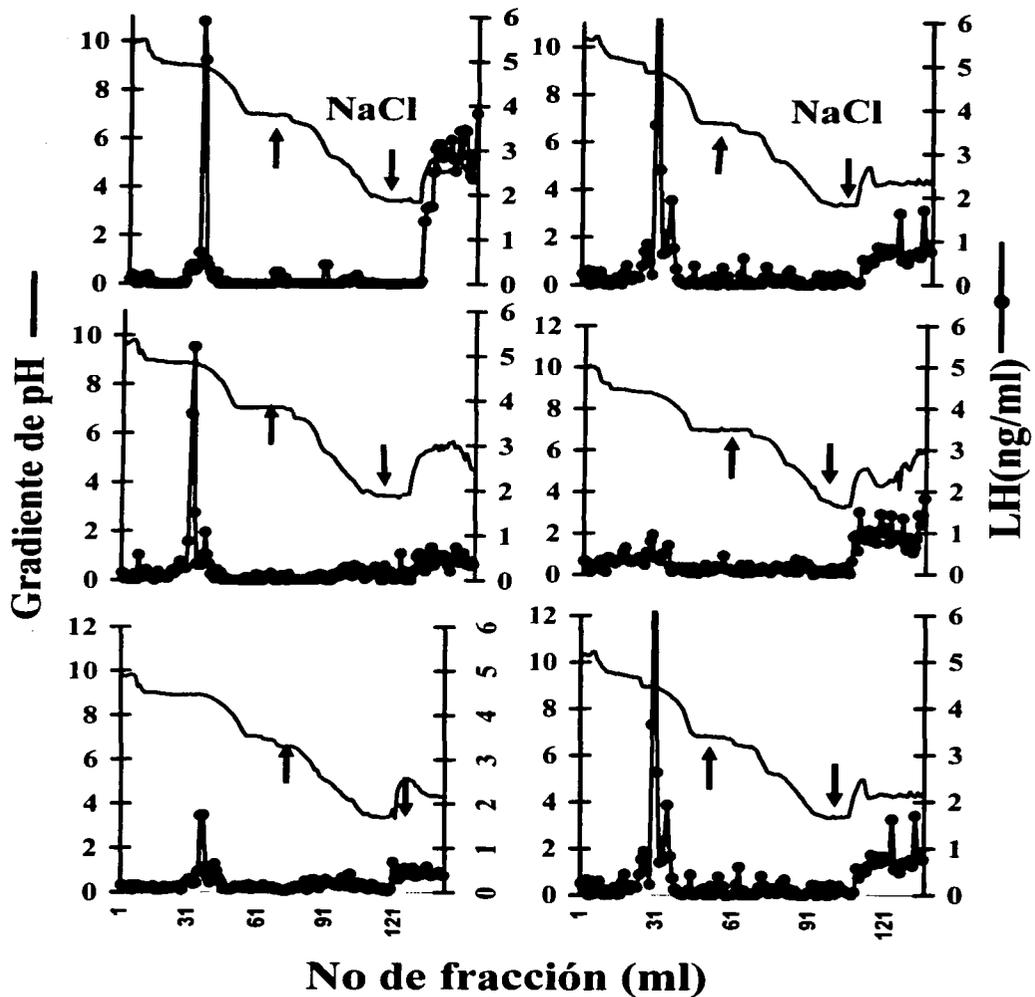


Figura 4. Patrón de elución del suero caprino del grupo en época reproductiva. Las flechas señalan el cambio del amortiguador y la aplicación de NaCl 1M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

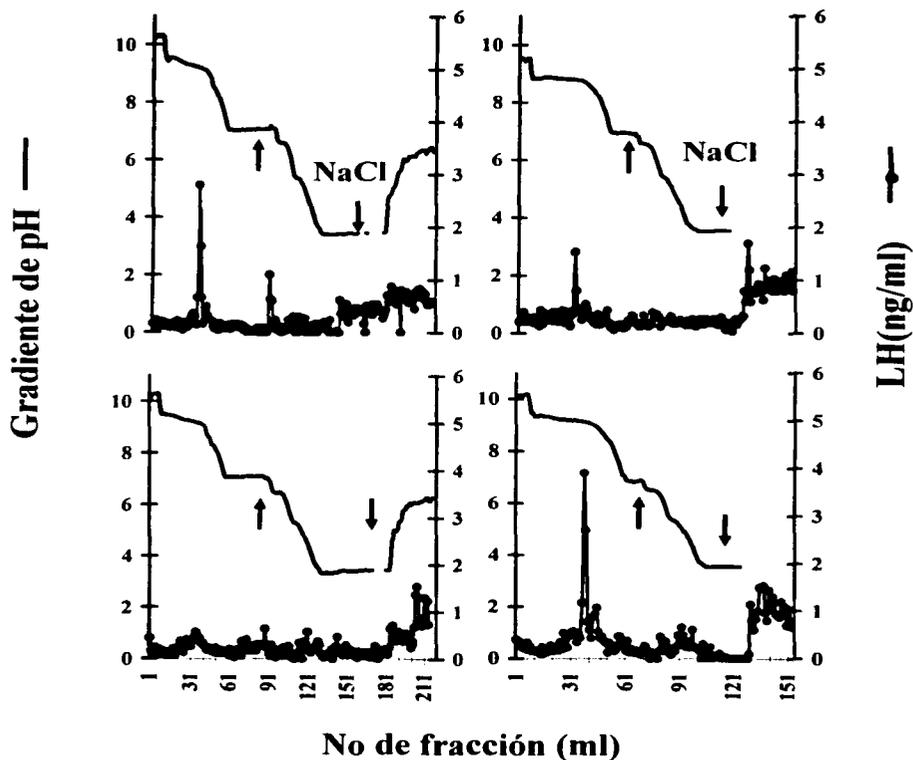


Figura 5. Patrón de elución del suero caprino del grupo en época de anestro. Las flechas señalan el cambio del amortiguador (pH 7.0 a pH 3.5) y la aplicación del NaCl 1M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

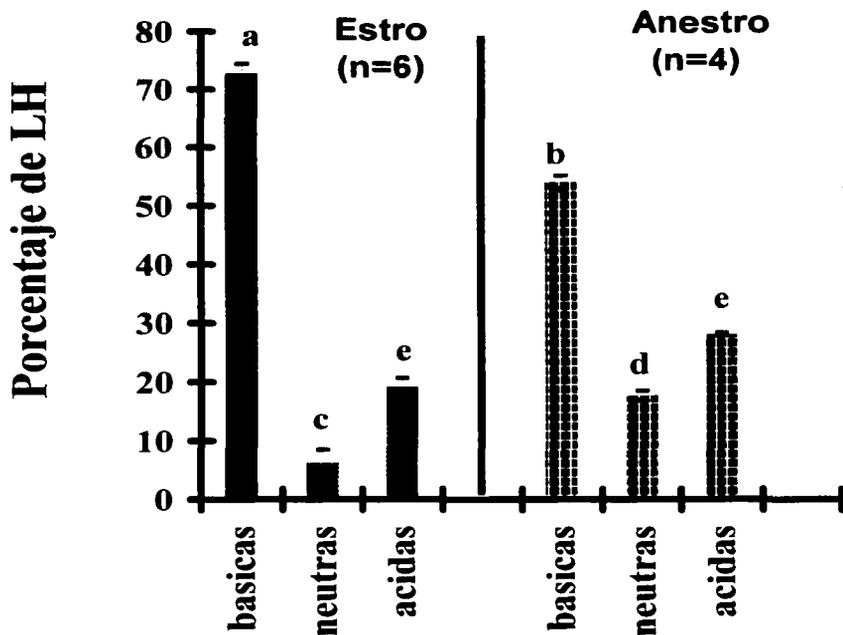


Figura 6. Distribución de isoformas de la LH.
Análisis por grupo de isoformas,
correspondientes a básicas (pH>7.5), neutras (pH
7.4 a 6.5) y ácidas (pH<6.5). Las letras que no se
comparten son diferentes(p<0.05)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

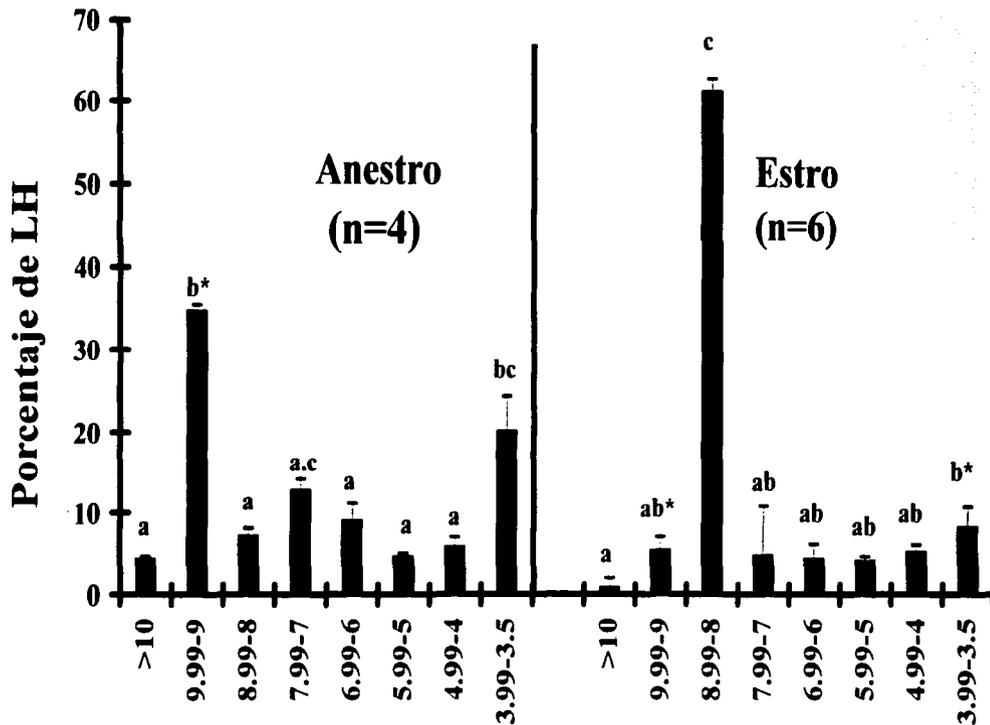


Figura 7. Distribución de isoformas de LH en anestro y estro. Los resultados presentan el análisis de las isoformas por unidad de pH. * Diferencia entre tratamientos por unidad de pH ($p < 0.01$). a,b,c diferencia dentro de tratamientos ($p < 0.05$)

VI. DISCUSION

La heterogeneidad molecular de las gonadotropinas es un evento influido por el medio ambiente endocrino del animal. Se han descrito a nivel hipofisario y en la circulación en la especie humana y en roedores (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Chappel *et al.*, 1982; Wide *et al.*, 1996). Sin embargo, la heterogeneidad de las gonadotropinas en animales domésticos, se ha limitado a estudios en la adenohipófisis (Zalesky y Grotjan 1991; Stumpff *et al.*, 1992) y hay escasas evidencias sobre del patrón de elución de las isoformas circulantes, referidas únicamente a la FSH en la especie ovina (Padmanabhan *et al.*, 1992), debido posiblemente a las bajas concentraciones de las gonadotropinas presentes en el suero en las diferentes condiciones fisiológicas. Más aún, este tipo de información no se ha descrito para la especie caprina, los resultados de este estudio muestran por primera vez la heterogeneidad de la LH presente en el suero de la especie caprina en dos condiciones fisiológicas.

Los resultados mostraron que la concentración media de LH secretada en el estro (pico preovulatorio) fue mayor que la concentración del grupo de cabras tratadas con la GnRH en época de anestro. Al respecto, se ha documentado que los cambios en el patrón de secreción de LH en las dos etapas estudiadas dependen fundamentalmente de la sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación del estradiol (Legan y Karsch, 1980; Caraty *et al.*, 1999). Por ejemplo, en el anestro, existe una incremento en sensibilidad a la retroalimentación negativa de los estrógenos, causando pulsos de LH con menos frecuencia, lo que se refleja en bajas concentraciones de la LH en la circulación; en contraste durante la época reproductiva, la retroalimentación que ejerce el estradiol en el hipotálamo, favorece la liberación de la LH con pulsos más frecuentes de baja amplitud, lo que se manifiesta como una mayor concentración de la hormona en la circulación (Caraty *et al.*, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Durante el estudio en la época reproductiva, el pico de LH se presentó a las 6.6 ± 1.7 h después de iniciada la conducta de celo, con una amplitud de 35.8 ± 12.25 ng/ml, resultados similares a lo reportado por Pierson *et al.* (2001 y 2003), quienes analizaron la presencia del pico de LH en cabras después de un tratamiento de sincronización del celo. Las cabras que recibieron el estímulo de la GnRH en la época de anestro respondieron inmediatamente, con la presencia del pico de LH a las 2.0 ± 0.68 h, con amplitud de 12.25 ± 1.88 ng/ml, valores que coinciden con trabajos previos (Knight *et al.*, 1988 y Pierson *et al.*, 2001). Lo anterior indica que las muestras analizadas en este estudio son representativas de lo que ocurre en condiciones fisiológicas.

El patrón de distribución de isoformas de la LH de los sueros colectados en las etapas de anestro y estro, mostró que cuantitativamente existían las mismas isoformas en ambas condiciones, semejante al reportado para la especie humana (Castro Fernández *et al.*, 2000) y bovina (Perera *et al.*, 2000). En contraste, desde el punto de vista cuantitativo, se observaron diferencias con lo informado en otras especies de animales domésticos, en particular en extractos de adenohipófisis bovinas (Perera *et al.*, 2000; Kojima *et al.*, 1995) y ovinas (Zalesky *et al.*, 1992). Aunque el mayor porcentaje de las isoformas circulantes eluyeron a pH básico (≥ 7.5) como se observa en extractos hipofisarios de estas especies, la cantidad relativa de isoformas de LH identificadas en la adenohipófisis no refleja lo que se ha observado en la circulación, que son las que van a interactuar con la células blanco.

El análisis por grupo de isoformas permitió identificar las diferencias entre condiciones fisiológicas; el porcentaje de isoformas básicas, fue mayor en la etapa de estro en relación a la etapa de anestro. Sin embargo, cuando se analizó el patrón de elución por unidad de pH, se observó que el alto porcentaje de isoformas básicas presentes en el suero del estro, se debió principalmente a las isoformas que eluyeron a un pH medianamente básico (pH 8.99-8, isoformas predominantes) en contraposición en la etapa de anestro, las isoformas

predominantes eluyeron a pH ≥ 10 y pH 9.99-9. Estos resultados concuerdan con lo observado en la LH del suero de la especie bovina durante el diestro y el estro (Perera *et al.*, 2003), lo que corrobora que el medio ambiente endocrino modifica el patrón de distribución de isoformas de la LH. El porcentaje mayor de isoformas medianamente básicas (como las obtenidas en este estudio en el estro) y ácidas de las gonadotropinas intrahipofisarias y en la circulación, se ha correlacionado con altas concentraciones de estradiol. Por ejemplo, Norris *et al.* (1989) analizando la actividad biológica *in vitro* de la LH sérica durante el pico preovulatorio de la borrega, encontraron que la actividad específica de la hormona (relación entre la actividad biológica e inmunológica, B/I) fue disminuida, lo que indica que en esta etapa del ciclo, las isoformas de la LH liberadas a la circulación corresponden en parte a las isoformas de tipo ácido; En otros estudios donde se analizó la participación del estradiol en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1991; Ropelato *et al.*, 1999; Padmanabhan *et al.*, 1988), han documentado que este esteroide sexual, modifica la tasa de síntesis y liberación de la GnRH (Gharib *et al.*, 1990; Cowley *et al.*, 1998) y con ello induce el incremento en la síntesis y expresión del mRNA que codifica para la subunidad α y la subunidad β LH, (Gharib *et al.*, 1990; Harmernik *et al.*, 1995), y participa en la regulación de la glicosilación de las gonadotropinas (Damian-Matsumara *et al.*, 1999; Darmesh y Baezinger, 1993). Con base en estos estudios se puede sugerir, que el incremento en los niveles de estradiol en la etapa de estro, induce un patrón de secreción de la LH con picos de baja amplitud y alta frecuencia (Caraty *et al.*, 1999) favoreciendo la síntesis de isoformas medianamente básicas y ácidas de la LH, posiblemente porque el estradiol reduce la actividad de las enzimas glicosiltransferasas, en particular de la N-acetilgalactosamina transferasa y sulfotransferasa (enzimas que participan en la incorporación de galactosa y sulfato en la estructura final de los oligosacáridos del tipo N-unido en las gonadotropinas, características de la isoformas de tipo básico), favoreciendo la formación de isoformas de tipo ácido y medianamente alcalinas,

lo que puede explicar la mayor proporción de este tipo de isoformas en el suero de los animales en estro.

En la etapa de anestro, la baja frecuencia de picos de la LH, provoca una baja en la concentración de la LH circulante, es por ello que en este estudio se recurrió a incrementar la concentración circulante de la LH con una dosis de GnRH, para poder identificar la heterogeneidad de la LH en esta condición. La administración de GnRH i.m. o i.v. en dosis única, podría enmascarar las características de la LH secretada normalmente en el anestro, si tuviera como efecto, en muy corto plazo, inducir la síntesis de nueva LH en el gonadotropo. Se ha documentado en niños que la administración pulsátil de GnRH incrementa la proporción de isoformas básicas de LH en el suero (Wide *et al.*, 1996). En contraste, la administración exógena de la GnRH a dosis única *in vitro* (Zalesky *et al.*, 1991) e *in vivo* (Castro-Fernández *et al.*, 2001; Zambrano *et al.*, 1995) no modifica el patrón de isoformas de la LH; además en ovinos, se ha documentado que la LH liberada a la circulación bajo un estímulo de la GnRH en la fase lútea, no se acompaña de un incremento en la tasa de transcripción del gen para la β LH; inclusive, la administración de un bolo de GnRH i.v. en el diestro no aumenta el mRNA para el receptor de la GnRH en el gonadotropo (Brown y McNeilly, 1999). Estos trabajos nos permiten proponer, que la LH que analizamos de la etapa de anestro, es básicamente la hormona preformada, con las características de la secretada en condiciones normales.

Por otro lado, se ha observado que la ausencia de esteroides gonadales y la inhibición de la GnRH endógena, provocan un alto porcentaje de isoformas básicas intrahipofisarias (Robertson *et al.*, 1991; Stumpf *et al.*, 1992; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1992). Es entonces posible, que en presencia de concentraciones mínimas de estradiol en la etapa de anestro, se observe un efecto inhibitorio en la actividad de las enzimas responsables de la incorporación del grupo N-acetilgalactosamina y sulfatos en los residuos de oligosacáridos de la LH, lo que permitiría un incremento en las isoformas ácidas en el suero. Evidencias descritas también para isoformas de la LH presentes en la

adenohipófisis de borregas en anestro (Zalesky *et al.*, 1992), presentaron un patrón y porcentaje semejante de isoformas de la LH a la presentadas en este estudio, lo que indica que en el anestro, la síntesis y regulación de las isoformas de la LH se ven afectadas por el estradiol, lo que puede explicar la aparición selectiva de ciertas isoformas de la LH de tipo ácido cuando se inhibe la síntesis de glicosiltransferasas que incorporan particularmente sulfato terminal en los oligosacáridos presentes en las gonadotropinas.

Finalmente, se ha documentado que las isoformas con mayor actividad biológica *in vitro* y con una alta tasa de eliminación en la circulación, corresponden a las formas básicas, en contraste a las isoformas ácidas (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001). En este estudio, la proporción de formas ácidas fue mayor en las cabras inducidas con GnRH en el anestro (20.3 ± 4.0), que durante el pico de LH (8.5 ± 2.2) ($P < 0.05$), esto permite sugerir que la baja frecuencia de pulsos de la LH, provoca la síntesis de isoformas ácidas, para que sean eliminadas lentamente de la circulación y con esto mantenerse aunque sea a muy baja concentración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. CONCLUSION

El presente trabajo documenta por primera vez la heterogeneidad de la LH circulante en caprinos y define que existen diferencias en la proporción relativa de distintas isoformas dependiendo de la condición fisiológica, durante el anestro se incrementa la proporción de isoformas ácidas que eluyen a pH inferior a 4.0. En tanto que la proporción relativa de isoformas básicas fue mayor en el pico de cabras en estro.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Anderson L. Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Reviews of Reproductions* 1996; **1**:193-202

Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V, Robertson WR. Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**(7) 631-639

Baenzinger UC y Green DE. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochemica et Biophysica Acta* 1988; **947**:287-306.

Bollang MD and Stuart JE. *Protein Methods*, 1991 Ed. Wiley-Liss

Boukhliq R, Goodman RL, Berriman SJ, Adrian B and Lehman NM. A subset of gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine medial basal hypothalamus is activated during increased pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1999; **140**(12):5929-5935

Brown P y McNeilly AS. Transcriptional regulation of gonadotropins genes. *Reviews of Reproduction* 1999; **4**:117-124

Burgon PG, Stanton PG, Robertson DM. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996; **137**:4827-4836.

Caldani M, Batailler M, Thiery JC, Dobois MP. LHRH immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry* 1988; **88**: 1-11

Caraty A, Locatelli A, Martin GB. Biphasic response in the secretion gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected whit estradiol. *J.Endocrinol.* 1989;**123**:375-382

Caraty A, Antonine C, Delaleu B, Locatelli A, Bouchard P, Gautron JP, Evans NP, Karsch FJ and Padmanabhan V. Nature and bioactivity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secreted during GnRH surge. *Endocrinology* 1995;**136**:3452-3460

Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 1999;**140**: 165-170.

Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlung D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A and Méndez JP. A Preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J. Clin.Endocrinol.Metab* 2000;**85**: 4603-4610.

Chappel SC, Courtifaris C, Jacobs SJ. Studies on the microheterogeneity of follicle-stimulating hormone present whit the anterior pituitary gland of ovariectomized hamster. *Endocrinology* 1982;**110**: 847-854.

Chemineau, P., Martin, G.B., Saumande, J. and Normant, E. Seasonal and hormonal control of pulsatile LH secretion in the dairy goat (*Capra hircus*). *J. Reprod Fertil* 1988; **83**:91-98.

Childs GV, Unabia G ,Kee LB., Rougeau D. Heightened secretion by small and medium-sized luteinizing hormone (LH) gonadotropes late in the cycle suggest

contributions to the LH surge or possible paracrine interactions. *Endocrinology* 1992; **130**(1): 345-352

Childs GV, Unabia G, Kee LB., Rougeau D. Cells that express luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) β -subunit messenger ribonucleic acids during the estrous cycle: The major contributors contain LH β , FSH β , and/or growth hormone. *Endocrinology* 1994; **134**(2); 990-997

Christianson SL, Zalesky DD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: Androgens increase the percentage of less basic isohormone. *Domest. Anim. Endocrinol* 1998;**15**:87-92.

Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF and Headon DR. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim.Reprod. Sci* 1996;**41**:77-99.

Cowley MA, Rao A, Wright PJ, Illing N, Millar RP and Clarke IJ. Evidence for differential regulation of multiple transcripts of the gonadotropin releasing hormone receptor in the ovine pituitary gland; effect of estrogen. *Mol.Cell.Endocrinol* 1998; **146**:141-149.

Crawford JL, Currie JW, McNeilly AS. Replenishment of LH stores of gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH after the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. *J. Endocrinol* 2000;**167**:453-463.

Damesh SM y Baenzinger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulfated oligosaccharides of lutropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:11127-11131.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Damián-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sánchez-Hernández C, Timossi C and Ulloa-Aguirre A. Oestrogens regulate pituitary α 2,3-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J. Mol. Endocrinol* 1999;**23**:153-165.

Dias, J.S. Debate. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? II. A biochemical point of view. *Hum. Reprod* 2001;**16**(5):825-830.

Duittoz AH y Batailler. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *Journal of reproduction and fertility* 2000;**120**:391-396

Evans J. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocrinology Reviews* 1999;**20**(1):46-67

Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Repro* 1994;**50**:225-232.

García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 1981; 3ra. Edición México Instituto de Geografía. UNAM

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA and Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 1990;**11**(1):177-198.

Goodman RL, Karsch FJ. Pulsatile secretion on luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 1980;**107**:1286-1290

Goodman RL, Bittman EL, Foster DL and Karsch FJ. Alterations in the control of luteinizing hormone pulse frequency underlie the seasonal variation in estradiol negative feedback in the ewe. *Biology of Reproduction* 1982;**27**: 580-589

Goodman RL, Robinson JE, Kendrinck KM y Dyer RG. Is the inhibitory action of estradiol on luteinizing hormone pulse frequency in anestrus ewes mediated by noradrenergic neurons in the preoptic area? *Neuroendocrinol* 1995;**61**:284-292.

Goodman RL, Thiery JC, Delaleu B and Malpoux B. Estradiol increases multiunit electrical activity in the A15 area of ewes exposed to inhibitory photoperiods. *Biology of Reproduction* 2000;**63**:1352-1357

Hamernick DL, Clay CM, Turzillo A, Van Kirk EA, Moss GE. Estradiol increases amounts of messenger ribonucleic acid for gonadotropin-releasing hormone receptors in sheep. *Biol.Reprod* 1995;**53**:179-185.

Hassing JM, Kletter GB, l'Anson H, Wood RI, Beitins IZ, Foster DL, and Padmanabhan V. Pulsatile administration of gonadotropins-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH) isoforms distribution pattern of pituitary of circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology* 1993;**132**:1527-1536.

Herbinson AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology reviews* 1998;**19**:302-330

Karsch FJ, Foster DL, Goodman RL Bittman EL. A role for estradiol in enhancing luteinizing hormone frequency in the follicle phase of the estrous cycle of sheep. *Endocrinology* 1983;**113**:1333-1339

Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* 1984; **40**:185-225

Karsch, FJ, Dahl GE, Evans, NP, Manning, JM, Mayfiel, KP, Moenter SM, and Foster, DL. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe-alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biology of Reproduction* 1993; **49**:1377-1383.

Keel BA, Sachanbacher BD and Grotjan HE. Jr. Effect of castration and steroid administration on the charge heterogeneity of pituitary luteinizing hormone. *Biol.Reprod* 1987;**36**:1102-1113.

Kim SJ, Foster DL, Wood RI. Prenatal testosterone masculinizes synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Biol of Reprod.* 1999;**61**:599-605

Knight CH, Wilde CJ, McLeod BJ, Haresing W. Exogenous GnRH induces ovulation in seasonally anoestrous lactating goats (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil.*1998;**83**(2):679-686.

Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Roberson MS, Werth LA, Wolfe MW et al . Effects of 17 β -estradiol on distribution of pituitary isoform of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod* 1995;**52**: 297-304.

Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Saeed SA, Arora KK, Catt KJ. Muscarinic Regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 1998;**139**:10

Legan JS y Karsch JF. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology of Reproduction* 1979;**20**:74-85

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Legan JS y Karsch JF. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feed-back action of estradiol. *Biology of Reproduction* 1980;**23**:1061-1068.

Lincon DW, Fraser HM, Linconl GA, Martin GB and McNeilly AS. Hipotalamic pulse generators. *Recent Progress in Hormone Research* 1985 ;**41**:369-418

Moenter SM, Brand RM, Midgley AR and Karsch FJ. Dinamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology* 1992;**130**: 503-510

Niswender GD, Juengel JL, Silav PJ, Rollyson MK and Mintush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Rewiews* 2000;**80**(1): 1-29

Norris TA, Weesner GD, Shelton JM, Harms PG and Forrest DW. Biological activity of LH during the peripartum period and the estrous cycle of the ewe. *Dom Anim Endocrinol* 1989;**6**(1):25-33.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J. et al. Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoforms distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal disgenesis. *J.Clin.Endocrinol. Metab* 1988;**67**:465-473.

Padmanabhan V, Mieher CD, Borondy M, L`Anson H, Wood RI, Landerfeld et al. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoform during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 1992;**131**:213-220.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pau KJ y Jackson GL. Effect of frontal hypothalamic deafferentation on photoperiodic induced changes of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 1985;**41**:72-78

Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnicas de radiomarcaje con Iodo-Gen. *Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*; 1996 septiembre 24-26; Puebla (Puebla) México.

Perera MG, Murcia MC, Rojas SM, Hernández CJ y González PE. Caracterización fisicoquímica e inmunológica de isoformas de la LH en hipófisis frescas y liofilizadas. *Memorias del XVII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*; 2000 Septiembre 11-15; República de Panamá: PANVET, 2000: 273.

Perera MG, Murcia MC, Rojas SM, Hernández CJ, González PE. Patrón de distribución de isoformas circulantes de la hormona luteinizante (LH) durante la etapa de estro y diestro en vaquillas Holstein. 2003 (enviado a publicación)

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K , Eriksson K and Wide L. Changes In the Isoforms of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone during Puberty in Normal Children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**:3103-3106.

Pierce, J.G. and Parsons, T.F. Glycoprotein hormones structure and function. *Ann. Rev. Biochem* 1981;**50**:465-495

Pierson JT, Baldassarre H, Keefer CL, Downey BR. Seasonal variation in preovulatory events associated whit synchronization of estrus in dwarf goats. *Theriogenology* 2001;**56**:759-769

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pierson JT, Baldassarre H, Keefer CL, Downey BR. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats. *Theriogenology* 2003;**60**:397-406

Robertson DM, Foulds LM, Fry RC, Cummins JT and Clarke I. Circulating half-lives of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoforms fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 1991;**129**: 1805-1813

Ropletato MG, García-Rudaz MC, Castro-Fernández C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M and Veldhuis JD. A Preponderance of Basic Luteinizing Hormone (LH). Isoforms Accompanies Inappropriate Hypersecretion of Both Basal and Pulsatile LH in Adolescents with Polycystic Ovarian Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:4629-4636.

Statistical Analysis System (SAS) versión 6.03. SAS Institute, North Carolina, 1988.

Seong-Kyu H, Abraham IM and Herbinson AE. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Neuroendocrinology* 2002;**143**:1459-1466

Skinner DC, Harris TG, Evans NP. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biology of reproduction* 2000;**63**:1135-1142

Smith MJ y Jennes L. Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 2001;**122**:1-10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Stumpff TT, Wolfe MW, Roberson MS, Caddy G, Kittok RJ, Schanbacher BD, Grotjan HE and Kinder JE. Bovine luteinizing hormone (LH) isoforms and amounts of messenger ribonucleic acid for alpha and LH beta-subunits in pituitaries of cows immunized against LH-releasing hormone. *Biol.Reprod* 1992;**47**: 776-781

Tanaka T, Takanori O, Hopshino K, Mori Y. Changes in the gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity during the estrous cycle in the goat. *Neuroendocrinology* 1995;**62**:553-561

Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ and Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormone: Characterization and physiological relevance. *Endocrine Rev* 1995;**16**:765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumara P, Dias JA. Role of glycosilation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; **11**(3):205-215.

Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C and Méndez J.P. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Human Reproduction* 2001;**16**: 599-604.

Velasco MJR. Desarrollo y validación de segundo anticuerpo como método de separación entre trazador unido y libre en un radioinmunoanálisis de fase líquida. 2000; Tesis de licenciatura, Fac.Med.Vet.y Zoot. UNAM.

Wide, L. Median charge and charge heterogeneity in human pituitary FSH, LH and TSH. II. Relationship to sex and age. *Acta Endocrinol.* (Copenh), 1985;**109**: 190-197.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Wide,L., Naessen T., Eriksson,K.,Rune,C. Time-related effects of a progestogen on isoforms of serum gonadotrophins in 17 beta-oestradiol treated post-menopausal women *Clinical Endocrinology* 1996;**44**:651-658.

Xiong JJ, Karsch FJ and Lehman MN. Evidence for seasonal in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons *Endocrinology* 1997;**138** (3): 1240-1250

Zalesky, D.D. y Grotjan, H.E.: Comparison of Intracellular and Secreted Isoforms of Bovine and Ovine Luteinizing Hormone. *Biol. Reprod* 1991 ;**44** : 1016-1024.

Zalensky, D.D., Nett, T.M. and Grotjan, H.E. Ovine luteinizing hormone : isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J.Anim. Sci* 1992;**70**: 3851-3856

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. ANEXO I

Reactivos utilizados en el RIA

Anticuerpo

El primer anticuerpo (Ac) se genero apartir de la LH ovina (NIDDK-oLH-26) por el Banco de Hormonas proteínicas de origen animal, del Instituto de Neurobiología-UNAM (Donación). Se trabajo a una dilución final 1:200 000, en presencia de suero normal de conejo (SNC;1:1600) de la marca Sigma (Inmuno Chemicals R-9133) en un amortiguador de fosfatos (0.05 M) salino (0.14 M) más EDTA,0.02M (ethylen diamino tetracetico) pH 7.4.

Trazador

El trazador USDA-bLH-b6 (5 µg de hormona grado yodación en 25 µl de amortiguador de fosfatos (PB) 0.05M, pH 7.4), se radioiodino con 0.5 mCi de Na¹²⁵I (Amersham, actividad específica de 15.7 mCi/µg de yodo 99% de pureza), por el método de IODO-GEN (de 1,3,4,6-tetracloro-3α-6α-diphenilglucoril;PIERCE Chemicals, 28 600) referido por Perera *et al.* (1996).

Procedimiento:

1.5 µg de IODO-GEN ; 5 µg de hormona grado yodación disuelta en 25 µl de PB; 0.5mCi de Na¹²⁵I. La mezcla de reacción se agito suavemente durante 8 minutos, al termino la hormona marcada se separo por medio de gel filtración (Shepadex G50-150; Pharmacia).

Estándar

La hormona (USDA-bLH-b5) se utilizó como estándar en el ensayo a las dosis desde 0.3 hasta 160 ng/ml respectivamente, diluidos en amortiguador de fosfatos salino 0.05 M con 0.14 M NaCl 1% de BSA, pH 7.4.

Segundo anticuerpo

El segundo anticuerpo (Velasco, 2000), se genero a partir de IgG de conejo aplicado a burros, utilizado a una dilución 1:80 en amortiguador de fosfato salino

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO II. ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--|
| SNC | Sistema nervioso central |
| LH | Hormona luteinizante |
| FSH | Hormona folículo estimulante |
| P₄ | Progesterona |
| E₂ | 17-β Estradiol |
| OVX | Ovariectomía |
| HMB | Hipotálamo medio basal |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropinas |
| CF | Cromatoenfoque |
| pl | Punto isoeléctrico |
| RIA | Radioinmunoanálisis |
| aa | Aminoácido |
| B/I | Cociente actividad biológica/inmunológica |
| PGF_{2α} | Prostaglandina F_{2α} |
| ng/ml | Nanogramos por mililitro |

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**