



01674

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS SÉRICAS E
HIPOFISIARIAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH)
DURANTE EL DIESTRO DE LA OVEJA.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A
ESPERANZA ARRIETA BALLESTEROS**

**T U T O R:
DR. ANTONIO PORRAS ALMERAYA**

**COMITÉ TUTORAL:
DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ
DR. GERARDO PERERA MARIN**

MÉXICO D.F.

2004



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.

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos por estar conmigo en todo momento,
gracias por su cariño.

A mis sobrinas y sobrino por ser parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito que me fue otorgada en el período comprendido de enero del 2002 a enero del 2004. Apoyo importante y trascendental para la obtención del grado de Maestría.

A los H. miembros del Jurado: Dr. Gerardo Perera Marin, Dr. Jaime Gallegos Sánchez, Dra. Teresa Sánchez Torres, Dra. Aleida Olivares Segura y Dr. Antonio Porras Almeraya por el tiempo invertido y los valiosos comentarios que me permitieron el enriquecimiento de este documento.

Al Dr. Antonio Porras por haberme brindado su apoyo para la realización de esta investigación y por haberme compartido sus conocimientos.

A Clara Murcia y Gerardo Perera por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio y por el tiempo dedicado en este estudio.

A los integrantes del CEPIER por las facilidades brindadas en la realización de los experimentos.

A todos mis compañeros que participaron en la fase experimental, gracias por su apoyo: Jahel, Violeta, Laura Edith, Gaby, Susana, Mario, Víctor, Jaime, Nicolás, Cesar; así como a los integrantes del departamento de Reproducción por su amistad.

Con cariño a Cesar por todo lo que hemos compartido.

DECLARACIÓN

El autor da 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 esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



Arrieta Ballesteros Esperanza

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Hormonas glicoproteicas	
2.1.1 Gonadotropinas hipofisarias.....	4
2.1.2 Estructura química de las gonadotropinas hipofisarias.....	5
2.1.3 Oligosacáridos de las glicoproteínas.....	7
2.1.4 Mecanismos de acción de la hormona luteinizante	
2.1.4.1 Receptor de la hormona luteinizante.....	9
2.1.4.2 Mecanismo de acción de la hormona luteinizante.....	11
2.2 Regulación neuroendocrina de la secreción de la hormona luteinizante	
2.2.1 Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH).....	12
2.2.2 Esteroides	
2.2.2.1 Estrógenos.....	14
2.2.2.2 Progesterona.....	15
2.3. Ciclo estral de la oveja	17
2.4. Isoformas de las glicoproteínas	
2.4.1 Tipos de isoformas de las glicoproteínas.....	18
2.4.2 Características de las isoformas de las glicoproteínas.....	19
2.4.3 Factores que modifican el patrón de heterogeneidad de las isoformas de las glicoproteínas.....	20
III. OBJETIVO E HIPÓTESIS	23
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	24
4.1 Localización	24
4.1.1 Selección de los animales.....	24
4.2 Diseño del estudio	
4.2.1 Estudio previo.....	25
4.2.2 Fase experimental.....	26

4.3 Procesamiento de las muestras biológicas	
4.3.1 Suero.....	27
4.3.2 Homogeneizado de hipófisis.....	27
4.4 Determinación de la heterogeneidad de la hormona luteinizante	
4.4.1 Cromatoenfoque.....	27
4.5 Determinación hormonal	
4.5.1 Radioinmunoanálisis para progesterona.....	29
4.5.2 Radioinmunoanálisis para la hormona luteinizante.....	29
4.6 Análisis estadístico.....	31
V. RESULTADOS	32
5.1 Estudio Previo.....	32
5.2 Fase experimental	
5.2.1 Distribución de isoformas de la LH en extractos hipofisarios	
5.2.1.1 Grupo de pH.....	32
5.2.1.2 Tipo de isoformas.....	33
5.2.1.3 Unidad de pH.....	33
5.2.2 Distribución de isoformas de la LH en muestras séricas	
5.2.2.1 Grupo de pH.....	33
5.2.2.2 Tipo de isoformas.....	34
5.2.2.3 Unidad de pH.....	34
5.2.3 Comparación de la distribución de isoformas de la LH presentes en extractos hipofisarios y muestras séricas	
5.2.3.1 Grupo de pH.....	35
5.2.3.2 Tipo de isoformas.....	35
5.2.3.3 Unidad de pH.....	35
VI. DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIÓN	43
VII. LITERATURA CITADA	44
IX. ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tipos de isoformas de la hormona luteinizante en extractos hipofisarios de ovejas en fase lútea (promedio \pm error estándar).....	58
Cuadro 2. Análisis de la hormona luteinizante eluida por unidad de pH en extracto hipofisiario ovino (promedio \pm error estándar).....	59
Cuadro 3. Porcentaje de isoformas de la hormona luteinizante presente en suero ovino (promedio \pm error estándar).....	60
Cuadro 4. Análisis de la hormona luteinizante eluída por unidad de pH en suero ovino (promedio \pm error estándar).....	61
Cuadro 5. Porcentaje de hormona luteinizante obtenida en hipófisis y suero por grupo de pH en ovinos (promedio \pm error estándar).....	62
Cuadro 6. Comparación entre el porcentaje de isoformas de la hormona luteinizante presente en hipófisis y suero ovino (promedio \pm error estándar).....	63
Cuadro 7. Análisis de la hormona luteinizante eluída por unidad de pH en extracto hipofisiario y suero ovino (promedio \pm error estándar).....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tiempo de sacrificio de las ovejas para la obtención de suero e hipófisis, después de la aplicación de solución salina (SS; Grupo T _e) o la GnRH (Grupos T-30, T-90 y T-180).....	65
Figura 2. Cromatoenfoco de la LH para extractos hipofisarios y muestras séricas.....	66
Figura 3. Radioinmunoanálisis de las muestras séricas de ovinos.....	67
Figura 4. Radioinmunoanálisis de los extractos hipofisarios ovinos....	68
Figura 5. Concentraciones séricas (promedio ± error estándar) de la LH en muestras sanguíneas colectadas a intervalos de 15 min durante 5 h, después de aplicar 100 µg de la GnRH a las ovejas (n=16).....	69
Figura 6. Patrón de elución representativo de una oveja de cada grupo de la LH hipofisiaria ovina.....	70
Figura 7. Patrón de elución representativo de la LH sérica se presenta una oveja por grupo.....	71
Figura 8. Patrón de elución de las isoformas del grupo T _e de la LH hipofisiaria ovina.....	72
Figura 9. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-30 de la LH hipofisiaria ovina.....	73
Figura 10. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-90 de la LH hipofisiaria ovina.....	74
Figura 11. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-180 de la LH hipofisiaria ovina.....	75
Figura 12. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-30 de la LH sérica ovina.....	76
Figura 13. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-90 de la LH sérica ovina.....	77
Figura 14. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-180 de la LH sérica ovina.....	78

RESUMEN

Esperanza Arrieta Ballesteros: DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS SÉRICAS E HIPOFISARIAS DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH) DURANTE EL DIESTRO DE LA OVEJA. (Asesores: Dr. Antonio Porras Almeraya, Dr. Gerardo Perera Marin y Dr. Jaime Gallegos Sánchez)

El objetivo de este estudio fue comparar el patrón de distribución de las isoformas de la LH en suero e hipófisis durante la fase lútea de la oveja. Se utilizaron 16 ovejas Pelibuey en diestro, de las cuales a 12 se les administró 100 µg de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), 30, 90 o 180 min antes de su sacrificio (grupos T-30, T-90 y T-180, n=4) y a las 4 restantes se les administró 100 µg de SS (T_e). La adenohipófisis fue homogeneizada y centrifugada a 16000 x g por 2 h. Las muestras de suero fueron dializadas por un período de 48 h y cada uno fue liofilizado después. La hipófisis y el suero de cada oveja fueron colectados para su análisis con el cromatoenfoco (gradiente de pH de 10.5 a 3.5). La concentración de la LH presente en suero e hipófisis se determinó por medio de un radioinmunoensayo homólogo ovino para la LH. La LH eluída en el cromatoenfoco se agrupó en isoformas básicas (pH \geq 7.5), neutras (pH de 7.4 a 6.5) y ácidas (pH \leq 6.4). El porcentaje de la LH recuperada se transformó en arco seno y se realizó un análisis de varianza considerando los efectos de grupo (T_e , T-30, T-90 y T-180) y de tipo de muestra (hipófisis y suero). El patrón de distribución de las isoformas de la LH se caracterizó porque las formas básicas fueron más abundantes que las neutras o ácidas ($p < 0.05$), independientemente del tipo de muestra. Además, se observó un mayor porcentaje de isoformas básicas en hipófisis ($T_e=83\%$, T-30=81%, T-90=82%, T-180=83%) que en suero (T-30=51%, T-90=48% T-180=54%; $p < 0.05$). Mientras que un mayor porcentaje de isoformas neutras hubo en suero (T-90=20%, T-180=23%) que en hipófisis (T-90=7%, T-180=5%; $p < 0.05$), sin encontrar diferencia para T-30. En isoformas ácidas solo hubo diferencia para el grupo T-30 (10% en hipófisis vs 32% en suero; $p < 0.05$). Estos datos muestran que el patrón de distribución de las isoformas de la LH, durante el diestro de la oveja, se caracteriza por un predominio de las isoformas básicas. Además se observó que en la hipófisis hubo una mayor proporción de isoformas básicas pero una menor proporción de formas neutras y ácidas al compararlas con el suero, lo cuál sugiere que las isoformas ácidas en suero podrían ser un factor importante para mantener la función del cuerpo lúteo, al tener una vida media mayor en circulación.

Palabras clave: Hormona luteinizante, Isoformas, Diestro.

ABSTRACT

Esperanza Arrieta Ballesteros: DISTRIBUTION OF ISOFORMS SERIC AND PITUITARY OF LUTEINIZING HORMONE DURING DIESTRUS IN OVINE. (Asesores; Dr. Antonio Porrás Almeraya, Dr. Gerardo Perera Marin y Dr. Jaime Gallegos Sánchez)

The object of this study was to compare the pattern of distribution of LH isoforms in serum and pituitary during the luteal phase in sheep. Sixteen Pelibuey sheep in diestrus were used, of which 12 received 100 µg of gonadotropin releasing hormone (GnRH), 30, 90 and 180 min before sacrifice (groups T-30, T-90 and T-180, n=4), and to the 4 rest it was administered to them 100 µg of SS (T_e). The anterior lobe of the pituitary gland were homogenizing and centrifugated at 16000 x g for 2 h. The samples serum were dialyzed for a period of 48 h and afterwards each was lyophilized. The pituitary and serum of each sheep was collected for analysis by chromatofocus (pH gradient from 10.5 to 3.5). LH concentration in serum and pituitary was determined by a radioimmunoassay homologous to ovine LH. Eluted LH was grouped into basic (pH ≥ 7.5), neutral (pH from 7.4 to 6.5) and acid isoforms (pH ≤ 6.4). The percentage of recovered LH was transformed into arc sine and analysis of variance was performed considering the effects of the group (T_e, T-30, T-90 and T-180) and of the type of sample (pituitary or serum). The pattern of distribution of LH isoforms revealed abundance of basic isoforms with respect to neutral and acid isoforms (p<0.05), independently of the type of sample. Besides, a higher percentage of basic isoforms was found in pituitary (T_e=83 %, T-30=81 %, T-90=82 %, T-180=83 %) than in serum (T-30=51 %, T-90=48 %, T-180=54 %; p<0.05). On the other hand, a higher percentage of neutral isoforms were observed in serum (T-90=20 %, T-180=23 %) than in pituitary (T-90=7 %, T-180=5 %; p<0.05), finding no difference for T-30. In acid isoforms, the only difference observed was for group T-30 (10 % in pituitary vs 32 % in serum; p<0.05). These data show that the pattern of distribution of the LH isoforms during diestrus in sheep is characterized by the predominance of basic isoforms. In addition, the pituitary showed a higher proportion of basic and lower proportion of acid isoforms than serum, which suggests that the acid isoforms in serum can be an important factor to maintain the function of the luteal body, since their half-life in circulation is longer.

Key words: Luteinizing hormone, Isoforms, Diestrus.

"Hacer con soltura lo que es difícil a los demás, he ahí la señal del talento; hacer lo que es imposible al talento, he ahí el signo del genio." -Henry F. Amiel-

I. INTRODUCCIÓN

La FSH y LH son sintetizadas por los gonadotropos de la hipófisis anterior. Ambas gonadotropinas pertenecen a la familia de hormonas glicoproteicas, químicamente están compuestas por péptidos que forman subunidades proteicas denominadas alfa y beta, que en conjunto con los oligosacáridos forman un heterodímero biológicamente activo (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 1996). Las variaciones en el arreglo estructural de los carbohidratos generan una serie de isoformas, las cuales presentan diferente bioactividad, modificando funciones como: vida media en circulación, unión al receptor y la capacidad para estimular los sitios de transducción (Moore *et al.*, 2000; Creus *et al.*, 2001; Barrios-De-Tomasi *et al.*, 2002; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003).

Se han identificado diferentes tipos de isoformas que se clasifican de acuerdo a su pH en formas ácidas (pH ≤ 6.4), neutras (pH 6.5 a 7.4) y básicas (pH ≥ 7.5 ; Cooke *et al.*, 1996; Rojas, 2003; Perera *et al.*, 2004). Morell *et al.* (1971) encontraron que las isoformas ácidas de las gonadotropinas, tienen una vida media mayor en la circulación que las formas básicas.

Factores como la edad, el estado reproductivo y nutricional de los animales modifican los patrones de heterogeneidad de secreción de las gonadotropinas (Cooke *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2000).

Moore *et al.* (2000) observaron que la distribución de las isoformas hipofisarias de la FSH cambia con la edad de los animales así, las ovejas adultas presentan un mayor porcentaje de isoformas ácidas en comparación con las corderas.

También el patrón de las isoformas de la FSH y la LH se modifica en las diferentes fases del ciclo reproductivo en los ovinos, de tal manera que durante el anestro las isoformas de FSH se tornan más ácidas en corderas o en hembras adultas ovariectomizadas en comparación con las isoformas identificadas en la época reproductiva (Moore *et al.*, 2000). Zalesky *et al.* (1992) realizaron un estudio con extractos hipofisarios de ovejas detectando un mayor porcentaje de isoformas de la LH básicas en la época reproductiva y un aumento de las isoformas ácidas en el anestro.

En general la información generada sobre la heterogeneidad de las gonadotropinas se limita a observaciones a nivel hipofisario, en diferentes condiciones fisiológicas (Zalesky *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 2000), existiendo un número limitado de estudios de las isoformas a nivel circulante, los cuales han sido descritos principalmente en la especie humana (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Burgon *et al.*, 1996; Castro-Fernández *et al.*, 2000). Recientemente se ha estudiado el patrón de distribución de las isoformas séricas de la LH en cabras y bovinos en distintas fases del ciclo estral (Rojas, 2003; Perera *et al.*, 2004). Así, Perera (2003) reportó que en bovinos las isoformas de la LH sérica predominante en la fase folicular corresponden a las de tipo ácido; mientras que, en la fase lútea la mayor proporción está dada por las isoformas básicas. Por su parte Rojas (2003) define que existen diferencias al incrementarse la proporción relativa de isoformas de la LH ácidas circulantes en el anestro de cabras, en comparación con la fase folicular (pico preovulatorio), donde la proporción relativa de isoformas básicas fue mayor.

Escasos estudios han determinado si el patrón de distribución de las isoformas presentes en hipófisis, es similar al patrón de las isoformas circulantes. Padmanabhan *et al.* (1992) encontraron, que el patrón de distribución de las isoformas de la FSH en hipófisis es diferente al observado en suero debido posiblemente a las bajas concentraciones de las gonadotropinas presentes en el suero.

En la actualidad no se conoce si el patrón de distribución de las isoformas de la LH sérica e hipofisiaria concuerdan; siendo importante el determinar si existe variación entre las isoformas de la LH presentes en hipófisis y suero lo cual puede ser indicio de las formas que actúan a nivel de la célula blanco. El objetivo del presente estudio fue identificar la distribución de las isoformas de la LH en estos dos diferentes compartimentos (hipófisis y en el suero), durante un ambiente endocrino dominado por la progesterona (fase lútea).

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Hormonas glicoproteicas

Las hormonas glicoproteicas FSH y LH, son sintetizadas por los gonadotropos de la adenohipofisis, mientras que la gonadotropina corionica equina (eCG) y la gonadotropina corionica humana (hCG) son sintetizadas por las células del trofoblasto, aunque estructuralmente similares, su origen es distinto (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 1996).

2.1.1 Gonadotropinas hipofisarias

Las gonadotropinas se caracterizan por participar en la regulación del ciclo reproductivo. La FSH en la hembra, promueve el desarrollo folicular, a través de la unión a sus receptores en las células de la granulosa del folículo, en tanto que en el macho actúa en las células de Sertoli, estimulando la espermatogénesis. En tanto que la LH, participa a nivel testicular (células de Leydig) estimulando la síntesis y secreción de andrógenos y en los ovarios actúa en las células de la teca interna estimulando la síntesis y secreción de andrógenos, además de participar en la maduración folicular final, inducir la oleada preovulatoria de la LH que provoca la ruptura de la pared folicular y la ovulación, y posteriormente en el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Roa, 2001).

Las gonadotropinas LH y FSH, son sintetizadas, almacenadas y liberadas en las células gonadotropas de la adenohipofisis. Estas células se han clasificado con base a sus características de tinción, en acidófilas y basófilas. En particular las células de los gonadotropos son de tipo basófilo, se localizan en la parte distal de la adenohipofisis, representando del 7 al 15 % de la población total de las células presentes en esta (Smith y Jennes, 2001).

Los gonadotropos son células heterogéneas que cambian de forma, tamaño y patrón de almacenamiento según la etapa del ciclo estral. Mediante estudios inmunohistoquímicos, se han identificado dos grupos de gonadotropos; los pequeños (200 μm) o monohormonales que contienen solamente LH o FSH y representan el 62 % de los gonadotropos. En tanto que los gonadotropos grandes (400 μm) o bihormonales, contienen ambas gonadotropinas y corresponden al 38 % restante de los gonadotropos (Childs, 1994; Smith y Jennes, 2001).

Lo anterior tiene implicaciones fisiológicas importantes, así por ejemplo, en ovinos antes de la presentación del pico preovulatorio de la LH se observa un gran acúmulo de gonadotropos de ambos tamaños y una mayor expresión del ARNm encargado de codificar la subunidad beta (β) para la FSH y la LH (Crawford *et al.*, 2000; Molter-Gérard *et al.*, 2000); en contraste, después de darse el pico preovulatorio de la LH hay una disminución del ARNm que codifica para la subunidad β (McNeilly, 2000).

2.1.2 Estructura química de las gonadotropinas hipofisarias

La LH y la FSH, químicamente están compuestas de dos subunidades polipeptídicas denominadas alfa (α) y beta, unidas por fuerzas no covalentes, que en conjunto con los oligosacáridos forman un heterodimero biológicamente activo. La actividad biológica solo se expresa cuando estas subunidades se encuentran unidas (Keel *et al.*, 1987; Stumpf *et al.*, 1992; Hamernik, 1995; Moore *et al.*, 2000).

La subunidad alfa, es idéntica para las diferentes gonadotropinas dentro de una misma especie, ya que es codificada por un mismo gen, presentando una gran homología entre especies por ejemplo, en ovinos y bovinos del 100 %,

bovinos y equinos 82 % y para bovinos y humanos del 75 % (Pierce y Parsons, 1981).

En la especie humana este gen se localiza en el cromosoma seis, también se ha descrito en otras especies, por ejemplo en ovinos, bovinos y roedores (Gharib *et al.*, 1990); el gen que codifica la subunidad α está compuesto por 4 exones y 3 intrones, con un peso molecular entre 5.4 Kilobases (Kb) a 13 Kb. Este gen codifica una proteína con un peso molecular de 20 Kilodaltons (KD), caracterizada por dos sitios de glicosilación del tipo N-unidos, localizados en los aminoácidos (aa) 56 y 83 en especies como la bovina, ovina, porcina y equina, en tanto que en humanos estos sitios de glicosilación se localizan en el aminoácido 52 y 78 teniendo el mismo tipo de unión (Gharib *et al.*, 1990; Cooke *et al.*, 1996; Perlman *et al.*, 2003).

La subunidad beta en comparación con la subunidad α , es específica para cada hormona ya que es codificada por diferentes genes, esto le confiere la especificidad biológica a la hormona. Diferentes estudios en el humano han determinado que el gen que sintetiza la subunidad β de la LH se localiza en el cromosoma 19, mientras que para la FSH el gen se encuentra localizado en el cromosoma 11; el gen está compuesto por 3 exones y 2 intrones con un peso molecular de 1.5 Kb (Pierce y Parsons, 1981; Gharib *et al.*, 1990).

El gen que codifica la subunidad β para la LH sintetiza una proteína, con un peso molecular de 16 KD, que presenta de 1 a 6 sitios de glicosilación del tipo N-unidos y O-unidos, localizados en diferentes aminoácidos así, la LH en la especie bovina, ovina y porcina se localiza en el aminoácido 13 siendo del tipo N-unido, en tanto que en humanos este sitio de glicosilación se localizan en el aminoácido 30 del tipo N-unido y en equinos los sitios de glicosilación se

localizan en el aminoácido 13 del tipo N-unido y varios sitios del tipo O-unidos (Gharib *et al.*, 1990).

La β -FSH se compone de 110 a 111 aa (Perlman *et al.*, 2003), la β -TSH tiene de 112 a 118 aa, la β -LH va de 117 a 121 aa, mientras que la β -hCG y β -eCG se constituye de 145 a 149 aa (Combarous, 1988).

2.1.3 Oligosacáridos de las glicoproteínas

Los oligosacáridos que componen las hormonas glicoproteicas presentan dos tipos de unión; O-unidos que se unen covalentemente al oxígeno del hidroxilo del aminoácido serina (Ser) o treonina (Thr); mientras que los N-unidos se unen de manera covalente al nitrógeno del grupo amida de la asparagina (Asn; Pierce y Parsons, 1981; Ryan *et al.*, 1987).

La glicosilación de tipo N-unido ocurre de forma cotraduccional en el retículo endoplásmico rugoso (RER), dada por una molécula de dolicol pirofosfato (lípidos insaturados), la cual se localiza en la membrana del RER; unida a esta se encuentra un oligosacárido compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina, nueve residuos de manosa y tres residuos de glucosa, los cuales son los que se incorporan al péptido recién sintetizado mediante la utilización de la enzima glucosiltransferasa al encontrar específicamente la secuencia Asn-X-Ser o cuando se presenta la secuencia Asn-X-Thr (X corresponde a cualquier otro aminoácido exceptuando la prolina; Hirschberg y Snider, 1987).

Una vez terminada la síntesis del polipéptido e incorporado el o los oligosacáridos, la proteína sufre modificaciones de tipo postraduccional en el lumen del RER; el cual inicia con la remoción del péptido señal, mediante una

péptidasa de señal. Posteriormente las subunidades α y β se unen para formar el heterodímero funcional (García-Campayo y Boime, 2001). La primera modificación que presenta el oligosacárido es la eliminación de un residuo de glucosa por medio de una enzima α -glucosidasa I, además de la remoción de los dos siguientes residuos de glucosa por la α -glucosidasa II, por último la enzima α -manosidasa corta 4 residuos de manosa (Cooke *et al.*, 1996).

Después de que ocurren las modificaciones, el polipéptido es enviado al aparato de Golgi (AG), de manera específica al Cis-Golgi, donde la enzima α 1,2-manosidasa elimina residuos de manosa; cuando la proteína llega a la región media del AG la enzima N-acetilgalactosamina transferasa incorpora al polipéptido residuos de N-acetilgalactosamina; se da la eliminación de manosas por la enzima α -manosidasa II, mientras que la N-acetilglucosamina transferasa incorpora N-acetilglucosamina. En su paso por el Trans-Golgi actúan las enzimas como la galactosa transferasa que incorpora galactosa, la sialiltransferasa que une ácido siálico terminal, la N-acetilgalactosamina transferasa y la sulfotransferasa que incorpora grupos sulfatos terminales (Baenzinger y Green, 1988; Green y Baenzinger, 1988; Breen, 2002).

Los oligosacáridos que forman parte de las gonadotropinas presentan en la parte final ácido siálico y sulfato; originando tres tipos de oligosacáridos; sializados, sulfatados y mixtos (sializados/sulfatados), además de tipo neutral. La LH ovina presenta principalmente oligosacáridos de tipo monosulfatados (56 %), disulfatados (13 %), neutral (26 %), monosializados (1 %) y mixto (4 %); mientras que la FSH bovina y humana presentan oligosacáridos monosializados, disializados y trisializados y algunas hormonas como la FSH ovina, la LH

humana y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) humana presentan ambos tipos de oligosacáridos (Pierce y Parsons, 1981; Ryan *et al.*, 1987).

Las principales funciones de los oligosacáridos en las hormonas glicoproteicas son: modificar la tasa de eliminación en circulación de las proteínas, la cual dependerá del tipo de residuo del oligosacárido; si es sializado, la hormona tiene una mayor vida media en circulación, en contraste a lo observado cuando presentan residuos de oligosacáridos con terminación sulfato (Perlman *et al.*, 2003). Los oligosacáridos, también participan en el plegamiento de las subunidades, dando una mayor estabilidad a la proteína y evitando el agregado de formas moleculares; también modifican la afinidad por su receptor en la célula blanco (Pierce y Parsons, 1981; Ryan *et al.*, 1987; Baenzinger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003).

2.1.4 Mecanismos de acción de la hormona luteinizante

2.1.4.1 Receptor de la hormona luteinizante

El receptor de la LH pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G, dicho receptor se localiza en la membrana plasmática de la célula blanco; en las hembras se encuentra en las células de la teca y de la granulosa, en los machos se localiza en las células de Leydig y de Sertoli, teniendo como característica una alta afinidad y especificidad por su ligando (Ji *et al.*, 2002).

El gen que codifica para el receptor de la LH se encuentra localizado para la especie humana en el brazo corto del cromosoma 2, específicamente en la banda p21, la región que codifica el receptor es de más de 60 Kb generando una proteína de 699 aa (Rousseau-Merck *et al.*, 1990; Dufau, 1998). Este receptor se encuentra compuesto por diez intrones y un exon de los cuales, los diez intrones codifican el dominio extracelular y el exon codifica el dominio intramembranal e

intracelular (Roux y Milgron, 2001). El receptor es un glicoproteína formada por un polipéptido monocatenario que contiene 674 aa y un peso molecular de 80 a 90 KD (Dufau, 1998).

El dominio extracelular externo del receptor está compuesto por 341 aa, presenta seis sitios de glicosilación, un dominio transmembranal formado por siete hélices conectadas por medio de tres asas extracelulares, tres asas intracelulares y por un dominio intracelular, además de tener residuos de cisteína en la primera y segunda asa extracelular que le permite formar puentes disulfuro con los residuos de cisteína, dándole una mayor estabilidad a la estructura transmembranal al formar hélices anfipáticas permitiendo con ello el reconocimiento del ligando (Dufau, 1998; Ji *et al.*, 2002).

El conjunto de las siete hélices transmembranales forman una estructura tridimensional semejante a un cilindro, el cuál se encuentra orientado perpendicularmente a la membrana celular; este dominio es homólogo para las diferentes hormonas glicoproteicas en un 54 a 65 % entre LH, FSH y TSH (Dufau, 1998; Ji *et al.*, 2002).

El dominio intracelular presenta sitios de fosforilación los cuales son necesarios para la activación e inhibición del receptor, cuando se unen proteínas transductoras de la señal que une nucleótidos de guanina (proteína G); la fosforilación de la proteína cinasa catalítica (C) se da de forma potencial en el sitio de presentación de tirosina-cinasa unida a los residuos de serina y treonina (Dufau, 1998; Ji *et al.*, 2002).

2.1.4.2 Mecanismo de acción de la hormona luteinizante

La acción de la LH en la célula de la teca folicular, se inicia al unirse la hormona al receptor, formando el complejo hormona-receptor, el cual se une a la proteína G, requiriendo en conjunto de guanosintrifosfato (GTP) y magnesio, y formar el segundo mensajero llamado adenosin monofosfato cíclico (AMPC), desatando el mecanismo que activa a la proteína cinasa A, siendo esta última la encargada de modular mediante la fosforilación, la función de diversas proteínas intracelulares (Halvorson y Chin, 2001).

A pesar de que el mecanismo de acción más conocido de las gonadotropinas es la vía del AMPC-proteína cinasa A se ha establecido la posibilidad de una segunda vía de acción, la cuál corresponde a la proteína cinasa C generada a través del rompimiento de fosfolípidos provenientes de la membrana plasmática para producir 1,4,5 trifosfato (IP_3) y 1,2 diacilglicerol (DAG). El IP_3 actúa a nivel del retículo endoplásmico liso liberando calcio (Ca^{++}) intracelular, incrementando la concentración de Ca^{++} citosólico, mientras que el DAG estimula a la proteína cinasa C. En consecuencia los receptores de las gonadotropinas pueden estimular estos dos mecanismos, sin embargo la activación de una u otra vía depende de la concentración de la hormona en circulación, requiriéndose una mayor concentración de gonadotropinas para activar la proteína cinasa C (Halvorson y Chin, 2001; Salvador *et al.*, 2002).

2.2 Regulación neuroendocrina de la secreción de la hormona luteinizante

2.2.1 Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

Las áreas y núcleos encargados de la síntesis de la GnRH son; el área preóptica anterior, específicamente el núcleo preóptico y el núcleo supraquiasmático, responsables de la secreción cíclica de la GnRH en la hembra. A diferencia del área medio basal que corresponde al núcleo arcuato y núcleo ventro medial, responsables de la secreción tónica de la GnRH. Las neuronas que sintetizan y secretan a la GnRH, son reguladas por múltiples inervaciones de otras neuronas capaces de estimular o inhibir su secreción (Bauer-Dantoin *et al.*, 1995).

Las catecolaminas (noradrenalina y adrenalina), la serotonina y los aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato; Smith *et al.*, 2000) estimulan la síntesis y secreción de la GnRH, mientras que el ácido aminobutírico (GABA) inhibe su secreción, al disminuir la excitabilidad eléctrica de las neuronas (Seong-Kyu *et al.*, 2002), mientras que el neuropéptido Y permite la liberación de la GnRH, además de potencializar la respuesta de los gonadotropos a esta hormona (Kalra, 1993). Un dato interesante es que las neuronas productoras de la GnRH, carecen de receptores para estradiol y progesterona, que son hormonas esteroideas que controlan la secreción pulsátil de la GnRH en diferentes estados fisiológicos del animal. Por lo tanto, esto indica, que la regulación de la secreción de la GnRH se realiza de manera indirecta a través de neuronas periféricas (Herbison, 1995; Mahesh y Brann, 1998; Phogat *et al.*, 1999).

La GnRH es liberada en forma pulsátil, en el sistema porta hipotálamo-hipofisiario para así llegar a la hipófisis anterior, donde induce la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Bergland y Page, 1978; Phogat *et al.*, 1999; Krsmanovic *et al.*, 2000).

Además participa en la expresión de sus propios receptores, en la glicosilación de la LH (Liu *et al.*, 1976; Vogel *et al.*, 1986) y en el patrón de secreción de las gonadotropinas dada por la frecuencia de su secreción en las diferentes etapas del ciclo estral (Caraty *et al.*, 1998). La expresión del ARNm que codifica para la subunidad α y β de la LH es mayor, cuando se presenta una alta frecuencia de secreción de la GnRH (fase folicular), pero cuando la secreción de la GnRH es poco frecuente (fase lútea) se incrementa la síntesis de la subunidad β de la FSH (Dhillon *et al.*, 1997; Nett *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de la GnRH, consiste en su unión al receptor específico localizado en la membrana celular del gonadotropo (Chabbert-Buffet *et al.*, 2000); la interacción hormona-receptor, induce la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato presente en la membrana y se forma el inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol, simultáneamente, comienza la remoción del calcio intracelular. El diacilglicerol, se encarga de activar la proteína cinasa que fosforila a las proteínas, en tanto que el inositol de trifosfato, aumenta la entrada de calcio extracelular y vacía el calcio intracelular, para activar la liberación de las gonadotropinas (Clayton y Catt, 1981; Catt y Stojilkovic, 1989). Los mecanismos que dependen de la concentración de calcio intracelular, son los responsables de la liberación inmediata de los gránulos secretorios, además de contribuir con la síntesis de la subunidades de las gonadotropinas.

2.2.2 Esteroides

2.2.2.1. Estrógenos

Se ha demostrado que el estradiol regula la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario en diversas especies. Hamernik *et al.* (1987) observaron que al administrar estradiol a ovejas previamente ovariectomizadas, se presenta una liberación de la LH, semejante al pico preovulatorio de ésta; debido a que se incrementa la síntesis de receptores para la GnRH en el gonadotropo en un tiempo corto (4 a 6 h; Gregg *et al.*, 1990). A su vez, se presenta una secreción constante de la GnRH, de 12 a 15 h después de la administración de estradiol (Moenter *et al.*, 1991). Lo anterior permite deducir que el estradiol es el encargado de inducir el pico preovulatorio de la LH, al ejercer una retroalimentación positiva en el hipotálamo dándose una liberación de forma incrementada y sostenida de la GnRH, provocando la liberación de la LH que induce la ovulación, actuando a nivel de la hipófisis al hacer más sensible el gonadotropo a la GnRH (Nett *et al.*, 2002).

De esta forma durante la fase folicular del ciclo estral, las altas concentraciones de estradiol circulante, inducen la secreción del pico preovulatorio de la LH. En algunos estudios se ha observado que es necesaria una cantidad mínima de estradiol (3 a 4 pg/ml), para potencializar la magnitud de descarga de la LH durante el pico preovulatorio, se precisa de una concentración de 7 a 10 pg/ml de estradiol para inducir artificialmente un pico preovulatorio de la LH similar al que ocurre durante el ciclo estral (Gallegos-Sánchez y Rodríguez, 2002). Mientras que durante la fase lútea el estradiol controla la secreción tónica de la LH a través del mecanismo de retroalimentación negativa, (Thiéry *et al.*, 1978; Przekop y Domanski, 1980).

La administración prolongada de estradiol en animales ovariectomizados, va en decremento de la expresión del ARNm que codifica para ambas subunidades de las gonadotropinas (Nett, 1990), a pesar de estos hallazgos no se conoce del todo como se da la participación del estradiol a nivel genómico. Nett *et al.* (2002) observaron la acción directa del estradiol en la síntesis y secreción de las gonadotropinas en los gonadotropos de las ovejas, encontrando que la expresión del gen, que codifica para las subunidades de la LH aumenta, lo anterior se refleja por un incremento en la cantidad de la LH que se almacena y en la cantidad que es secretada; en contraste observaron una disminución de la FSH secretada, demostrando así, la existencia de un mecanismo de liberación diferenciado para las gonadotropinas, debido principalmente, a que el gen que codifica para la subunidad β de la LH es regulado positivamente por el estradiol, siendo inversa a la expresión del gen que codifica para la subunidad β de la FSH (Nett, 1990).

La influencia que ejerce el estradiol en la expresión del ARNm que codifica para la GnRH, es dependiente del área en que se encuentran localizadas las neuronas en el hipotálamo; por ejemplo, los estrógenos estimulan la expresión del ARNm de las neuronas que se encuentran en el área preóptica. Se ha descrito que bajas concentraciones de estrógenos, inhiben la expresión del ARNm que codifica para la GnRH en ratas ovariectomizadas (Herbison, 1998).

2.2.2.2 Progesterona

La progesterona ejerce su acción a nivel genómico mediante la unión a su receptor intracitoplasmático regulando la expresión de su propio gen, además de tener acción a nivel de la membrana (control no genómico) en los canales iónicos

(paso del calcio), receptor de neurotransmisores y de otras hormonas como la oxitocina (Gina y Nett, 1995; Chabbert-Buffet *et al.*, 2000).

La progesterona regula la pulsatilidad de la GnRH en el hipotálamo, mientras que en la hipófisis reduce el número de receptores para la GnRH en el gonodotropo, al inhibir la transcripción del gen que codifica el ARNm para este. Por lo que la progesterona disminuye la cantidad de la LH secretada al regular la liberación de la GnRH (Gina y Nett, 1995).

En la oveja la progesterona es un importante esteroide inhibitorio al presentar una correlación inversa entre progesterona periférica y la secreción pulsátil de la LH durante el ciclo estral, así cuando se incrementa la concentración de progesterona la frecuencia de los pulsos de la LH se reduce y cuando la progesterona disminuye durante la lúteolisis la pulsatilidad de la LH se incrementa (Gallegos-Sánchez y Rodríguez, 2002).

Cuando hay una alta concentración de progesterona disminuye la expresión de los genes que codifican para la subunidad α y β de la LH, posiblemente se deba a la remoción del tallo poly A del ARNm (Gina y Nett, 1995).

Existen evidencias que demuestran que la síntesis del receptor de la progesterona requiere de niveles altos de estradiol de manera previa, sin embargo la progesterona regula de forma negativa la presencia de receptores tanto suyos como de estradiol. Por otra parte no se ha demostrado la presencia de receptores para progesterona en las neuronas que sintetizan la GnRH, lo que significa que actúa de manera indirecta a través de neuronas periféricas, quizá mediante el sistema opioide colinérgico y mediante el GABA (Robinson, 1995).

2.3 Ciclo estral de la oveja

A partir de la pubertad, las hembras desarrollan la capacidad para liberar gametos funcionales en forma cíclica, aproximadamente cada 17 días durante su vida reproductiva. El ciclo estral de la oveja se puede dividir en dos fases; la fase folicular que se caracteriza por el crecimiento y desarrollo folicular, durante este periodo ocurre la manifestación del estro así como la ovulación. Mientras que la fase lútea, se distingue por la formación y actividad del cuerpo lúteo y la presencia de niveles altos de progesterona (Baird y McNeilly, 1981).

En ambas fases la secuencia de cambios en el ovario se encuentra relacionada con los cambios endocrinos (Goodman y Hoodge, 1983). Así, durante la fase lútea la LH se libera en forma de pulsos de alta amplitud y baja frecuencia (Baird y Scaramuzzi, 1976); mientras que, en la fase folicular se incrementa tanto la amplitud y la frecuencia de dichos pulsos, con lo que se estimula el crecimiento folicular final, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. La FSH presenta dos incrementos importantes en sus niveles, el primero coincide con el aumento preovulatorio de la LH y el segundo se da días después de la ovulación (Wheaton *et al.*, 1984); durante la fase lútea existen dos incrementos menores, uno sobre en los días 4-5 y otro entre el 9-12 del ciclo sexual. La FSH incorpora y selecciona folículos en el proceso de crecimiento (Baird y McNeilly, 1981).

El control endocrino del ovario se establece a través de diferentes hormonas procedentes del hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el útero (eje neuroendocrino central). En la fase lútea, el cuerpo lúteo que se forma de la ovulación secreta progesterona, siendo esta hormona la encargada de mantener la gestación, impidiendo una nueva ovulación al inhibir la secreción de la LH al

ejercer una retroalimentación negativa a nivel de la GnRH (Wheaton *et al.*, 1984). Mientras que la FSH estimula constantemente el desarrollo folicular, secretando estos folículos, estrógenos e inhibina (Baird *et al.*, 1975), las cuales ejercen un efecto negativo sobre la liberación de la FSH (Finday y Clarke, 1987).

La síntesis y liberación de las prostaglandinas $F_{2\alpha}$ se da a nivel uterino (Inskeep y Murdoch, 1980), al secretarse genera la lisis del cuerpo lúteo; para ello se requiere de una presensibilización por parte de la oxitocina que es secretada por la hipófisis posterior y el cuerpo lúteo (Donaldson, 1969).

Al descender los niveles de la progesterona y aumentar los niveles de estradiol permite la secreción de la GnRH, acelerando la frecuencia de liberación de la LH a un pulso cada hora (Baird *et al.*, 1991), provocando así la descarga preovulatoria de la LH, horas después de comenzado el estro. La luteinización del folículo ovulatorio se encuentra regulada por la LH, generándose así un cuerpo lúteo y el comienzo de un nuevo ciclo con la presencia de los eventos endocrinos antes descritos (Goodman y Hoodge, 1983).

2.4 Isoformas de las glicoproteínas

Las hormonas glicoproteicas no están constituidas por una estructura única, sino que presentan variaciones en el arreglo estructural de los carbohidratos, así como ser de tipo sializados o sulfatados, para determinada hormona (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 1996).

2.4.1 Tipos de isoformas de las glicoproteínas

Se han identificado diferentes tipos de isoformas que se clasifican por su pH en formas; ácidas (pH <6.4), neutras (pH 6.5 a 7.4) y básicas (pH >7.5; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2000; Rojas, 2003; Perera

et al., 2004). Asimismo pueden ser clasificadas de acuerdo a la unidad de pH en que eluyen (Perera, 2003; Rojas, 2003). Se han identificado diferentes isoformas de la LH utilizando la técnica del cromatofoco en un gradiente de pH de 10.5 a 4 (Zalesky *et al.*, 1992, Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Castro-Fernández *et al.*, 2000; Perera, 2003; Rojas, 2003).

2.4.2 Características de las isoformas de las glicoproteínas

El ácido siálico y los sulfatos, presentes en los oligosacáridos de las gonadotropinas determinan su tasa de depuración metabólica, a la vez que, modulan la potencia biológica *in vivo* de la hormona; así los aminoácidos terminales sulfatados son removidos de la circulación al pasar por las células reticuloendoteliales hepáticas, uniéndose a un receptor específico (Fiete *et al.*, 1991; Perlman *et al.*, 2003; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2003), en contraste el ácido siálico tiene una menor afinidad por el receptor lo que le permite tener una mayor vida media en circulación (Morell *et al.*, 1971). Moore *et al.* (2000) encontraron que la vida media de las isoformas de la FSH es mayor en ovejas ovariectomizadas, debido a que presentan una mayor proporción de formas ácidas.

La variación en la distribución de las isoformas de las gonadotropinas para la especie humana ha sido documentada en varias condiciones fisiológicas por ejemplo; al inicio de la pubertad (Phillips *et al.*, 1997), durante el ciclo menstrual (Zambrano *et al.*, 1995) y en la senectud (Anobile *et al.*, 1998), así como, en mujeres con síndrome del ovario poliquístico (Ropelato *et al.*, 1999) y en hombres obesos (Castro-Fernández *et al.*, 2000).

2.4.3 Factores que modifican el patrón de heterogeneidad de las isoformas de las glicoproteínas

Existen factores como la edad (Moore *et al.*, 2000), el estado reproductivo de los animales y nutricional de los animales que modifican los patrones de heterogeneidad de secreción de las gonadotropinas (Cooke *et al.*, 1996). Moore *et al.* (2000) observaron que la distribución de las isoformas hipofisarias de la FSH cambia con la edad de los animales así, las ovejas adultas presentan un mayor porcentaje de isoformas ácidas en comparación con las corderas.

También el patrón de las isoformas de la FSH y la LH se modifica en las diferentes fases del ciclo reproductivo en los ovinos, de tal manera que durante el anestro las isoformas de FSH son más ácidas en comparación con las isoformas identificadas en la época reproductiva (Moore *et al.*, 2000). Una importante diferencia entre ovejas en anestro y en época reproductiva es su ambiente endocrino, debido principalmente a que disminuye la secreción de la GnRH en las hembras durante el anestro, lo cual permite que las isoformas de la FSH que predominan sean muy ácidas.

Las hormonas gonadales (estrógenos/progesterona) modulan el patrón de las isoformas de las gonadotropinas en hipófisis, modificando el patrón de distribución de las isoformas de la LH. Zalesky *et al.* (1992) realizaron un estudio con extractos hipofisarios de ovejas, detectando un mayor porcentaje de isoformas de la LH básicas en la época reproductiva y un aumento de las isoformas ácidas en el anestro. Los cambios observados durante el anestro pudieran deberse a que hay un mayor número de receptores para estradiol en hipófisis en comparación con la época reproductiva, siendo el hipotálamo particularmente más sensible a la retroalimentación negativa. *In vitro* el patrón de

liberación de isoformas de LH con que cuenta la hipófisis son medianamente alcalinos (pH 9.3 a 9.1) siendo secretadas selectivamente (Zalesky *et al.*, 1992).

Keel *et al.* (1987) encontraron que la ovariectomía en las ovejas da como resultado un alto porcentaje de isoformas básicas, mientras que, al aplicar estrógenos de manera exógena da como resultado un alto porcentaje de isoformas ácidas (Stumpf *et al.*, 1992).

Por su parte Zalesky *et al.* (1992) sugieren que al presentarse un aumento en la concentración de estradiol circulante durante la fase folicular, da como resultado un alto porcentaje de isoformas ácidas siendo esto similar a lo observado en ovejas ovariectomizadas y tratadas con estradiol.

Diversos estudios señalan que los estrógenos y andrógenos modifican el patrón de heterogeneidad de la LH; por ejemplo, los estrógenos favorecen el incremento en el porcentaje de isoformas ácidas de la LH ovina; mientras que, con los andrógenos la proporción de formas básicas aumenta (Christianson *et al.*, 1998).

En un estudio realizado por Christianson *et al.* (1998) con corderos castrados, utilizaron implantes de 5 α -dihidrotestosterona (DHT), observaron que la DHT disminuye la concentración de la LH, en comparación con los corderos castrados sin implante y los corderos intactos. Los andrógenos pudieran anticiparse al aumento total de la biopotencia de la LH al incrementarse las isoformas que eluyen a un pH de 9.2 a 9.4; mientras que un alto porcentaje de isoformas medianamente básicas, refleja una mayor síntesis de formas menos maduras (Christianson *et al.*, 1998).

El polimorfismo de las gonadotropinas se debe en parte a la estructura de los oligosacaridos que las conforman, lo cual modifica la actividad biológica (*in vitro* e *in vivo*), generando características diferentes para cada familia de gonadotropinas, lo anterior ha sido documentado en humanos y algunos rumiantes en hipófisis y recientemente en suero en bovinos y caprinos. Es por ello que el trabajo se enfoco a conocer el patrón de heterogeneidad de la LH en circulación e hipófisis en ovinos.

III. OBJETIVO E HIPÓTESIS

OBJETIVO

Determinar el patrón de distribución de las isoformas séricas e hipofisiarias de la hormona luteinizante en ovinos durante la etapa de diestro.

HIPÓTESIS

Existen variaciones entre las isoformas a nivel sérico y las isoformas hipofisiarias en oveja.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Localización

El trabajo de campo se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el km 29 de la Carretera Federal México-Cuernavaca (19°13' LN) a 2760 msnm. El clima de la región es de tipo c(w) (w)b (ij), que corresponde a semifrío-semihúmedo, con lluvias en verano y una precipitación pluvial anual de 800 a 1200 mm (García, 1987).

4.1.1 Selección de los animales

Se utilizaron 16 ovejas adultas de la raza Pelibuey, se detectaron estros, dos veces al día desde el mes de Junio y hasta el mes de Diciembre mediante la introducción de un macho celador. Además se les tomó una muestra de sangre dos veces por semana mediante punción de la vena yugular utilizando tubos Vacutainer® (Becton Dickinson), con el objetivo de evaluar su actividad ovárica mediante la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona.

Su alimentación consistió en avena henificada, concentrado comercial para etapa de mantenimiento y agua *ad libitum*, lo que permitió conservar una condición corporal mayor de 2, dentro de una escala subjetiva de 1 a 5 (Thompson y Meyer, 1994).

4.2 Diseño del estudio

4.2.1 Estudio Previo

Una vez corroborada la actividad cíclica de las ovejas, se realizó un estudio para determinar el tiempo requerido para que se eleven, mantengan y descendan los niveles de la LH después de la aplicación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y con ello estimar el tiempo óptimo de sacrificio de los animales después del estímulo.

Para ello se sincronizó su actividad estral mediante una doble aplicación de prostaglandina (Preloban®, Hoechst Roussel Vet) con un intervalo de 11 días entre una y otra aplicación. Veinticuatro horas después de la segunda aplicación de prostaglandina, se realizó la detección de estros mediante la introducción de un macho celador tres veces al día; una vez detectado el estro se consideró como el inicio del ciclo estral (día 0). Nueve días después (diestro) se les administró 100 µg de GnRH (Fertagyl®, Intervet) por vía intramuscular, y se tomaron muestras sanguíneas por punción de la vena yugular a intervalos de 15 min durante 5 h.

Las determinaciones hormonales se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, mediante radioinmunoanálisis (RIA), en el caso de la progesterona por medio de un RIA en fase sólida, mientras que para la LH se empleó un sistema homólogo ovino en fase líquida.

4.2.2 Fase experimental

Una vez conocido el patrón de secreción de la LH después de aplicar la GnRH, se procedió a identificar el patrón de distribución de las isoformas de la LH tanto en la hipófisis como en el suero, en la etapa de diestro. Para ello, se sincronizó nuevamente a todas las ovejas con una doble aplicación de prostaglandina con un intervalo de 11 días entre una y otra. Veinticuatro horas después de la segunda aplicación de prostaglandina, se detectaron estros mediante la introducción de un macho celador tres veces al día, una vez detectado el estro se consideró como el día cero del ciclo estral. Nueve días después (diestro) los animales se distribuyeron al azar en cuatro grupos (n=4):

Grupo testigo (T₀): Las ovejas de este grupo recibieron 1 ml de solución salina por vía intramuscular y se sacrificaron inmediatamente post-estímulo colectándose las hipófisis (Figura 1).

Grupo 30 min (T-30): Se les administró 100 µg de la GnRH por vía intramuscular, treinta minutos después, los animales fueron sacrificados (en el ascenso de la LH post aplicación de la GnRH) y se colectaron las hipófisis; así como 500 ml de sangre (Figura 1).

Grupo 90 min (T-90): Se les administró 100 µg de la GnRH y 90 min después fueron sacrificados, considerado como el tiempo en que ocurre la mayor concentración de la LH post-tratamiento, se colectaron las hipófisis y 500 ml de sangre (Figura 1).

Grupo 180 min (T-180): Se les administró 100 µg de la GnRH y 180 min después se sacrificaron. Se consideró como el tiempo en que ocurre el descenso de la LH post-estímulo, se colectaron las hipófisis y 500 ml de sangre (Figura 1).

4.3 Procesamiento de las muestras biológicas

4.3.1 Suero

El volumen de sangre colectado de cada animal se mantuvo a temperatura ambiente con el fin de obtener el suero, el cual fue dializado en membranas con límite de exclusión de 12000 a 14000 daltons por un período de 48 h, posteriormente fue liofilizado y almacenado a 4°C hasta su utilización.

4.3.2 Homogeneizado de hipófisis

Cada adenohipófisis se homogeneizó en amortiguador Tris (50 mM), NaCl (150 mM), pH 7.4 que contenía 1 mM fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF), EDTA (1 mM) y 200 U/ml de aprotinina (1 ml/100 mg de tejido húmedo), mediante la utilización de un homogeneizado de tejidos (Tissue Tearor™, Biospec Products Inc). El homogeneizado se centrifugó a 16000 x g por 2 h a 4°C. El sobrenadante fue fraccionado en un volumen de 2 ml y liofilizado.

4.4 Determinación de la heterogeneidad de la hormona luteinizante

4.4.1 Cromatoenfoque

El patrón de elución de las isoformas de la LH presentes en el suero e hipófisis se determinó por medio del cromatoenfoque (CF), método por el cual las proteínas son separadas al interaccionar la carga de superficie de la molécula con un soporte de carga inmovilizado (intercambiador iónico). Se empleó el intercambiador iónico PBE™-118, (Pharmacia) empacado en columnas de 27 cm de longitud x 0.5 cm de diámetro, equilibradas con 20 volúmenes de Trietilamina®, 0.025 M pH 11.0 (Sigma-Aldrich).

Antes de depositar la muestra, se colocaron 3 ml de Pharmalyte™ 8-10.5, (Pharmacia) diluido 1:45 pH 7.0, con el fin de evitar la exposición de la muestra a gradientes extremos de pH.

La muestra de suero liofilizado (20 mg de proteína) y el extracto de hipófisis (6 mg de proteína) se resuspendieron en 5 ml y 3 ml de Pharmalyte respectivamente. Cada muestra una vez resuspendida, se agitó durante 30 min y al término se centrifugó a 3000 x g durante 30 min. El sobrenadante obtenido se aplicó a columnas independientes. Una vez incorporada la muestra al intercambiador iónico se inició la corrida con Pharmalyte pH 7.0 y se colectaron 80 fracciones (2 ml c/u) con un flujo de 7 ml/h. Posteriormente, el amortiguador fue sustituido por el Polybuffer™ 74, (Pharmacia) 1:8 pH 3.5 y continuó la corrida colectando un total de 50 fracciones. Al terminar de coleccionar dichas fracciones el amortiguador se sustituyó por una solución de NaCl 1 M con el fin de recuperar las proteínas que no eluyeron dentro del intervalo de pH de 10.5 a 3.5 y se colectaron 30 fracciones (Figura 2). Se midió el pH a cada fracción con el fin de conocer el gradiente de pH en que eluyó la proteína.

Una vez determinado el pH, las fracciones colectadas fueron neutralizadas con 200 µl de TRIS 1.1 M pH 7.4 (1 a 80 fracciones) y con 200 µl de Imidazol 1.1 M pH 7.0 (81 a 160 fracciones) y se determinó la concentración de la LH por duplicado en el RIA posteriormente descrito.

Todos los amortiguadores y la resina fueron desgasificados durante 30 min antes de ser empleados, para evitar la formación de iones de bicarbonato que produjeran fluctuaciones en el gradiente de pH.

La LH inmunoreactiva obtenida en cada cromatoenfoque de extractos hipofisarios y muestras séricas se agrupó por el pH correspondientes a proteínas ácidas ($\text{pH} \leq 6.4$), neutras ($\text{pH} 6.5$ a 7.4) y básicas ($\text{pH} \geq 7.5$) simultáneamente se analizó por unidad de pH (≥ 10 , 9.0 a 9.99 , 8.0 a 8.99 , 7.0 a 7.99 , 6.0 a 6.99 , 5.0 a 5.99 , 4.0 a 4.99 y 3.0 a 3.99) y finalmente se analizó por tipo de isoforma obtenida en cada cromatoenfoque.

4.5 Determinación hormonal

4.5.1 Radioinmunoanálisis para Progesterona

Se realizó con un kit comercial Diagnostic Products Corporation (Coat A Cont®, DPC) en fase sólida, la fracción unida se cuantificó en un espectrómetro de radiaciones gamma durante 1 min. El sistema presentó una sensibilidad de 0.1 ng/ml con un coeficiente de variación intraensayo de 6.41 % e interensayo de 5.68 %.

4.5.2 Radioinmunoanálisis para la Hormona Luteinizante

La concentración de la LH en las muestras de suero, así como las fracciones colectadas en cada uno de los cromatoenfoques desarrollados, se determinó con un sistema de RIA homólogo ovino en fase líquida con 120 h de incubación a 4°C, utilizando como sistema de separación al segundo anticuerpo.

Para la concentración de la LH en extractos hipofisarios y las fracciones colectadas en el cromatoenfoque se utilizó el mismo sistema de RIA ovino modificado en la disminución del tiempo de incubación que correspondió a 20 h a 4°C y se utilizó como sistema de separación a la proteína A del *Staphylococcus aureus* (Pansorbina® Cells, Calbiochem).

En ambos sistemas de RIA, se utilizaron los siguientes reactivos: como estándar de referencia al NIDDK-oLH-I-2 (AFP7071B) a una dosis de 0.03 a 16 ng/tubo, el primer anticuerpo (NIDDK-oLH-26) a una dilución final de 1:80000 y como trazador se empleó a la NIDDK-oLH-I-2 marcada con ^{125}I con el método de IODO-GEN (Perera *et al.*, 1996).

El sistema RIA para muestras séricas consistió en colocar en el tubo de reacción 100 μl del estándar y/o 300 μl de suero, con 200 μl de la dilución del primer anticuerpo (1:80000) que contenía suero normal de conejo (1:1600) e incubación por un periodo de 48 h a 4°C, al término de esta incubación se colocó 100 μl de la hormona marcada con ^{125}I (24000 cpm) y continuó la incubación por un periodo de 48 h.

La separación de la fracción unida (antígeno-anticuerpo) de la fracción libre, consistió en colocar 200 μl de segundo anticuerpo (1:80) el cual se incubó por 24 h, al término se adicionó 1 ml de amortiguador del ensayo (PBS-BSA al 0.1 %) y se centrifugó a 1500 x g a 4°C durante 15 min, previa incubación de 15 min a 4°C. La fracción unida se cuantificó durante 1 min en un espectrómetro de radiaciones gamma. y la concentración de la LH se determinó con el programa “riastat” precargado en el contador (Figura 3).

La sensibilidad del sistema fue de 0.03 ng/tubo con un coeficiente de variación intraensayo de 13.86 % e interensayo de 13.33 %. La especificidad del sistema correspondió a 0.005 ng/tubo para FSH y TSH. La GH y prolactina no fueron detectables.

El sistema RIA para muestras de hipófisis consistió en colocar en el tubo de reacción 100 µl del estándar y/o 100 µl, 50 µl, 25 µl, 10 µl, 5 µl según la fracción correspondiente del extracto hipofisiario, con 200 µl de la dilución del primer anticuerpo (1:80000) que contenía suero normal de conejo (1:1600) y 100 µl de la hormona marcada con ^{125}I (24000 cpm) con una incubación de 20 h a 4°C.

La separación de la fracción unida (antígeno-anticuerpo) de la fracción libre, consistió en colocar 1 ml de PBS 0.05M, pH 7.4 que contenía 15 µl/tubo de la suspensión de proteína A del *Staphylococcus aureus*, se centrifugó a 1500 x g a 4°C durante 15 min, previa incubación de 15 min a 4°C. La fracción unida se cuantificó durante 1 min en un espectrómetro de radiaciones gamma, y la concentración de la LH se determinó con el programa “riastat” precargado en el contador (Figura 4). El sistema presentó una sensibilidad de 0.03 ng/tubo con un coeficiente de variación intraensayo de 10.42 % e interensayo de 6.82 %.

4.6 Análisis Estadístico

El porcentaje de la LH eluida por grupo de pH, así como por unidad de pH y por tipo de isoforma en que eluyó la proteína de extractos hipofisarios y suero fueron transformados en arco seno, con la finalidad de normalizar los datos.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar las diferencias entre grupos (T_e, T-30, T-90 y T-180) y la prueba de t-student para determinar si hay diferencias entre hipófisis y suero para cada grupo, para lo cual se utilizó el paquete estadístico System Analisis Statistic (SAS, 1999).

V. RESULTADOS

5.1 Estudio Previo

Se observó un incremento significativo en la concentración sérica de la LH (8.40 ± 0.99 ng/ml) a los 30 min que se consideró como el período de ascenso de la LH, a los 90 min alcanzó una concentración de 17.00 ± 1.84 ng/ml que se tomó como el tiempo de mayor concentración de la LH posterior al estímulo, y finalmente a los 180 min ocurrió el descenso en la concentración de la LH (10.82 ± 1.25 ng/ml). Considerando estos resultados se decidió sacrificar a los animales a los 30, 90 y 180 min después de la aplicación de la GnRH. La Figura 5 muestra el patrón de secreción de la hormona luteinizante después de la aplicación de la GnRH en ovejas en diestro.

5.2 Fase experimental

5.2.1 Distribución de isoformas de la LH en extractos hipofisarios

5.2.1.1 Grupo de pH

El patrón de elución de los extractos hipofisarios ovinos analizados por medio del cromatoenfoque se muestran en la Figura 6, presentando el patrón de distribución de isoformas de una oveja por grupo.

En todos los grupos se observó una mayor proporción de isoformas de la LH básicas, que representó el 83.9 % en el grupo testigo (T_e) y el 80.6 % en el grupo T-30; mientras que las isoformas neutras representaron el menor porcentaje de elución, siendo el más bajo de 3.7 % (T_e) y el mayor de 8.6 % (T-30). Para las isoformas ácidas los porcentajes oscilaron entre 10.3 % (T-30) hasta el 12.2 % (T_e). No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre los porcentajes de distribución de las isoformas en hipófisis entre los grupos.

5.2.1.2 Tipo de isoformas

En todos los grupos se identificaron 10 isoformas de la LH en los extractos hipofisarios con el gradiente de pH utilizado (10.5 a 3.5); encontrando cuatro isoformas básicas (A, B, C, D), dos isoformas neutras (E y F), además de cuatro isoformas ácidas (G, H, I, J) predominando la isoforma B (pH 9.7 ± 0.04) con el mayor porcentaje de la LH recuperada en todos los grupos, mientras que para las isoformas ácidas predominó la forma G (pH 6.4 ± 0.03). No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre las isoformas identificadas en los extractos hipofisarios para los grupos. Sin embargo, al comparar los porcentajes de las diferentes isoformas dentro de cada grupo se observaron diferencias ($p < 0.05$), como se muestra en el Cuadro 1.

5.2.1.3 Unidad de pH

Al analizar los resultados por unidad de pH se encontró un alto porcentaje de LH eluída a pH de 9 a 9.99 siendo de 59.3 % (T-180) a 51.3 % (T-90). Mientras que, las isoformas eluídas a un pH de 4 a 4.99 correspondieron a un 3.6 % (T-180) a 2.9 % (T_e). Al realizar la comparación por unidad de pH entre grupos no se encontró diferencia ($p > 0.05$), como se muestra en el Cuadro 2.

5.2.2 Distribución de isoformas de la LH en muestras séricas

5.2.2.1 Grupo de pH

El patrón de elución de las muestras séricas de ovinos analizadas por medio del cromatoenfoco se muestran en la Figura 4, presentando el patrón de distribución de isoformas de una oveja por grupo.

Independientemente al grupo, nuevamente se observó que el mayor porcentaje de isoformas de la LH se encuentra a pH básico, con un 54.2 % para el grupo T-180 y del 47.8 % para el grupo T-90; sin embargo, a pH neutro, se observó un aumento (22.6 %) en el grupo T-180 y una disminución (16.7 %) en el grupo T-30. Mientras que para las isoformas ácidas los porcentajes oscilaron entre el 31.9 % (T-30) hasta el 23.2 % (T-180). No se encontraron diferencias ($p>0.05$) en el porcentaje de distribución de isoformas séricas entre los grupos.

5.2.2.2 Tipo de isoformas

El análisis por tipo de isoforma permitió identificar cuatro isoformas de la LH en suero con el gradiente de pH aplicado (10.5 a 3.5), encontrando dos isoformas básicas (A y B), una neutra (C) y una isoforma ácida (D). No hay diferencia entre el porcentaje de las diferentes isoformas en el suero entre los grupos ($p>0.05$). Sin embargo, al comparar el promedio de las diferentes isoformas séricas, se encontró diferencia ($p<0.05$), predominando la isoforma B (pH 8.76 ± 0.05) con el mayor porcentaje de la LH recuperada en todos los grupos, como se muestra en el Cuadro 3.

5.2.2.3 Unidad de pH

El porcentaje de isoformas eluídas a un pH de 9 a 9.99 es el predominante al encontrar un alto porcentaje de la LH que va de 25.9 % (T-30) a 23.8 % (T-180); en contraste el porcentaje de isoformas eluídas a un pH de 3 a 3.99 corresponde un 8.1 % (T-180) a 6.1 % (T-90). Al realizar la comparación entre los grupos no se observó diferencia ($p>0.05$) para cada unidad de pH, como se muestra en el Cuadro 4.

5.2.3 Comparación de la distribución de isoformas de la LH presentes en extractos hipofisarios y muestras séricas

5.2.3.1 Grupo de pH

Cuando se comparó la proporción de isoformas presentes en los extractos hipofisarios y en el suero, se observó una mayor proporción de isoformas de la LH a pH ácido en suero el cual fue diferente ($p < 0.05$) para T-30; en tanto que, las isoformas eluidas a pH básico son diferentes ($p < 0.05$) entre los grupos comparados (T-30, T-90 y T-180). En las isoformas neutras hay diferencia ($p < 0.05$) para T-90 y T-180 y para T-30 no hay diferencia ($p > 0.05$), como se muestra en el Cuadro 5.

5.2.3.2 Tipo de isoformas

Cuando se comparó por tipo de isoformas presentes en los extractos hipofisarios y en el suero se realizó tomando en cuenta el pH al que eluyeron dichas isoformas por lo que en total se compararon cuatro isoformas siendo estas, isoforma B, D, F y H para los extractos hipofisarios y las cuatro isoformas séricas (A, B, C y D).

Encontrando que entre las isoformas D y B (pH 8.70 y 8.76) no hay diferencia ($p > 0.05$) en T-30 y T-90; en contraste con las otras isoformas que si son diferentes entre sí ($p < 0.05$) para todos los grupos, como se muestra en el Cuadro 6.

5.2.3.3 Unidad de pH

El análisis por unidad de pH al comparar los extractos hipofisarios y el suero, no hay diferencia ($p > 0.05$) a un pH de 10 para T-30 y T-90 pero sí ($p < 0.05$) para T-180. Hay diferencia ($p < 0.05$) entre extracto hipofisario y suero,

para los tres grupos en el porcentaje eluído a un pH de 9 y 3; en contraste no se encontró diferencia ($p>0.05$) a un pH de 6 y 4 entre el porcentaje de isoformas eluídas en hipófisis y suero. Para las isoformas de la LH a un pH de 8 se presenta diferencia ($p<0.05$) solo en T-30 y a un pH de 7 no hay diferencia ($p>0.05$) para T-30, como se muestra en el Cuadro 7.

VI. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas determinan en parte la heterogeneidad de las mismas, debido a que su composición y estructura influyen en el ensamblaje de las subunidades, además de participar en la determinación de su vida media (Morell *et al.*, 1971; Fiete *et al.*, 1991; Burgon *et al.*, 1996; Cooke *et al.*, 1996; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1999; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001), como en la capacidad de inducir una respuesta biológica (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001).

Se han realizado estudios, tanto en humanos como en roedores, en relación a la heterogeneidad de las gonadotropinas a nivel hipofisiario o sérico (Chappel *et al.*, 1982; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001). En rumiantes existen diversos estudios en hipófisis (Keel *et al.*, 1992; Stumpf *et al.*, 1992; Zalesky *et al.*, 1992) y recientemente se han realizado estudios en suero (Rojas, 2003; Perera *et al.*, 2004), bajo diferentes condiciones fisiológicas. Sin embargo, no existen estudios que hayan comparado el patrón de heterogeneidad de la LH en hipófisis y suero, como lo realizado en el presente trabajo.

En este estudio se encontró que las ovejas en fase lútea presentan un mayor porcentaje de isoformas básicas en ambos compartimentos, aunque en circulación estas disminuyen en un 30 % en comparación con lo encontrado en los extractos hipofisarios (80 %); mientras que, en el suero el porcentaje de formas ácidas y neutras fue mayor al compararlo con la proporción encontrada en hipófisis (Cuadro 5). Este patrón de distribución, ha sido descrito para la FSH. Ulloa-Aguirre *et al.* (1995), identificó que las isoformas de la FSH en extractos hipofisarios eluyen a un pH menor de 5.5 y en suero la mayor parte de isoformas

de la FSH eluyen a un pH de 4.5; mientras que, en la orina las isoformas identificadas de la FSH eluyen a pH de 5.8 a 5.0.

Existe la posibilidad de que las diferencias observadas de las isoformas contenidas en los diferentes compartimentos, se deba a su diferente tasa de eliminación, ya que las formas ácidas permanecen mayor tiempo en la circulación, que aquellas que eluyen a pH básico (Burgon *et al.*, 1996; Cooke *et al.*, 1996; Stanton *et al.*, 1996). Así, la presencia de residuos terminales N-acetilgalactosamina-SO₄ o N-acetilglucosamina en los oligosacáridos terminales de la LH de las isoformas básicas favorecen la depuración metabólica de la misma por receptores específicos presentes en el endotelio hepático y en las células de Küpffer (Fiete *et al.*, 1991; Cooke *et al.*, 1996; Fiete y Baenziger, 1997).

A su vez, la diferencia en la proporción de isoformas de la LH en hipófisis y en circulación observada en este estudio, podrían deberse a la limitada capacidad de enlace que presenta el intercambiador iónico (PBE-118) a elevados pH (Keel *et al.*, 1987; Zalesky y Grotjan, 1991). Otra posibilidad, es que las diferencias encontradas se deban a que en la hipófisis la LH se encuentra en diferentes etapas de síntesis; y si bien, las isoformas de la LH presentes en la hipófisis son observadas en la circulación, las diferencias en la proporción relativa de éstas, pueden ser debidas a que las formas “maduras” únicamente son las liberadas a la circulación; mientras que en hipófisis, existen hormonas en las etapas de síntesis que podrían ser reconocidas por el anticuerpo utilizado en el sistema de cuantificación de la hormona (RIA), lo cual puede sugerir, que el distinto porcentaje observado entre las isoformas en suero e hipófisis se deban a la metodología empleada (Crowe *et al.*, 1997).

En este estudio, el mayor porcentaje de isoformas hipofisiaria eluyeron a pH de 9.7 (Cuadro 1), en comparación con las isoformas séricas donde la mayor proporción de éstas eluyen a pH de 8.7 (Cuadro 3). Además en suero se incrementó la proporción de isoformas neutras y ácidas. Estos hallazgos son semejantes a lo descrito en ovinos gonadectomizados en presencia de andrógenos donde las isoformas hipofisiarias de la LH eluyen a un pH de 9.4 (Christianson *et al.*, 1998); mientras que, Kojima *et al.* (1995) encontraron que en bovinos las isoformas hipofisiarias predominantes de la LH eluyen a pH de 9.3.

La información del polimorfismo de la LH presente en el suero es limitada, sin embargo, en humanos hay evidencias de que en condiciones fisiológicas normales y en algunas alteraciones hormonales, el patrón de distribución de las isoformas puede ser favorecida hacia formas básicas durante la pubertad (Phillips *et al.*, 1997), en sujetos extremadamente obesos (Castro-Fernández *et al.*, 2000), así como en mujeres con síndrome del ovario poliquístico (Ropelato *et al.*, 1999). Por otra parte, Perera (2003) observó en bovinos una mayor proporción de isoformas básicas en circulación que eluyeron a pH de 9, además de un aumento en isoformas ácidas durante la fase lútea del ciclo estral; siendo similar a lo observado por Keel *et al.* (1987) en ovinos y por Stumpf *et al.* (1992) en vaquillas; en contraste, Rojas (2003) observó un aumento en la proporción de isoformas ácidas circulantes en la fase folicular (pico preovulatorio de la LH), en cabras. Las evidencias antes descritas, indican la posibilidad de que el medio endocrino del animal, favorece la presentación de un patrón de distribución de isoformas de la LH diferente en la circulación, en este caso la relación progesterona/estradiol presente durante la fase lútea, puede influir en el incremento de formas básicas.

La participación de la progesterona en el proceso de glicosilación de las gonadotropinas se desconoce, sin embargo diversas investigaciones han dado a conocer en parte el mecanismo de regulación, el cual está dado por el ambiente endocrino hipotalámico de los animales. Se ha observado que la administración crónica de progesterona en ovejas ovariectomizadas disminuye la frecuencia pero no la amplitud de los pulsos de liberación de la LH (Goodman y Karsch, 1980). En un estudio realizado por Hamernik *et al.* (1987) bajo las condiciones fisiológicas descritas, observaron una reducción en la concentración de la LH sérica. Además, se ha observado que una elevada concentración de progesterona reduce la cantidad y síntesis de receptores de la GnRH en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (Hamernik *et al.*, 1987; Gina y Nett, 1995; Brown y McNeilly, 1997; Cowley *et al.*, 1998).

Además, se ha descrito que la progesterona regula de forma negativa el número de receptores para estradiol presentes en el gonadotropo (Koligian y Stormshak, 1977; Nett *et al.*, 2002); asimismo, el efecto inhibitorio de la progesterona hacia el estradiol pudiera explicar el incremento en isoformas de la LH de tipo básico, ya que las enzimas que incorporan sulfato y N-acetilgalactosamina están reguladas por el estradiol (Dharmesh *et al.*, 1993). La administración aguda de progesterona en cultivos celulares de hipófisis ovina disminuye la expresión del ARNm para la subunidad α y β de la LH por 24 h (Batra y Miller, 1985); así también, remueve el tallo poli A presente en el ARNm que es el encargado de codificar para ambas gonadotropinas en estudios *in vivo* (Gina y Nett, 1995).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio, no mostraron indicios de haberse presentado una modificación de la LH por la aplicación de la GnRH, lo cual puede deberse a una baja sensibilidad de la hipófisis al presentar un menor número de receptores para la GnRH (Cowley *et al.*, 1998). La administración de la GnRH, podría modificar las características de la LH liberada normalmente durante el diestro, al presentar un efecto a corto plazo, es decir, inducir la síntesis de *novo* de la LH en el gonadotropo, dándose un aumento de la transcripción del gene para β LH; no obstante, se ha documentado en diferentes especies el papel que tiene la GnRH al inducir un pico de liberación de la LH, al poder modificar o no el patrón de distribución de las isoformas de la LH; así como, la síntesis de *novo* por parte del gonadotropo bajo la influencia de un estímulo agudo de la GnRH. Wide y Bakos (1993) reportaron que la infusión pulsátil de la GnRH en niños incrementa la proporción de isoformas básicas de la LH en suero; mientras que, Burger *et al.* (2002) observaron un incremento en la transcripción del gene para la subunidad β -LH. Sin embargo, estudios realizados con la administración de una dosis única de la GnRH *in vitro* (Zalesky y Grotjan, 1991) e *in vivo* (Zambrano *et al.*, 1995; Castro-Fernández *et al.*, 2000), han demostrado que no se modifica el patrón de isoformas de la LH secretadas por los gonadotropos.

En particular, al estudiar el efecto de la administración de la GnRH en la especie ovina durante la fase lútea, se ha observado que aumenta la transcripción para la subunidad β -LH teniendo como respuesta síntesis de ARNm que codifica para dicha subunidad la cual tiende a ser inestable (Brown y McNeilly, 1997), por lo que la GnRH no modifica las características de la LH secretada. Con lo descrito anteriormente se puede especular que no hay efecto por parte de la GnRH al inducir la secreción de la LH como un estímulo agudo. Las evidencias

anteriores indican que un efecto agudo de la GnRH, difícilmente involucra la síntesis de *novo* de la LH, al menos durante el periodo estudiado (180 min). Estos antecedentes permiten proponer, que la LH hipofisiaria analizada en la etapa de diestro, es básicamente la hormona ya sintetizada en el gonadotropo y presente en circulación en esta etapa del ciclo estral.

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que en ovejas Pelibuey en fase lútea las isoformas de la LH predominantes, tanto en extracto hipofisiario como en el suero son las formas básicas.

El porcentaje de isoformas ácidas en el suero son significativamente mayor a la proporción encontrada en la hipófisis, sin embargo la variabilidad encontrada en el porcentaje de isoformas en suero fué mayor que la observada en la hipófisis.

La administración de la GnRH en dosis única y farmacológica, no modificó el patrón de distribución de las isoformas de la hormona luteinizante.

El porcentaje de isoformas básicas de la LH en extractos hipofisarios fue diferente al presente en circulación, lo que podría indicar los tipos de isoformas que llegan a la célula blanco.

VIII. LITERATURA CITADA

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;4:631-639.

Baenzinger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988;947:287-306.

Baird DT, Baker TG, McNatty KP, Neal P. Relationship between the secretion of the corpus luteum and the length of the follicular phase of the ovarian cycle. *J Reprod Fert* 1975;45:611-619.

Baird DT, Scaramuzzi RJ. Changes in the secretion of ovarian steroid and pituitary luteinizing hormone in the periovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J Endocrinol* 1976;70:237-245.

Baird DT, McNeilly AS. Gonadotropic control of follicular development and function during the estrous cycle in the ewe. *J Reprod Fert Suppl* 1981;30:129-133.

Baird DT, Campbell BK, Mann GE, McNeilly AS. Inhibin and estradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fert Suppl* 1991;43:125-137.

Barrios-De-Tomasi J, Timossi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Yding AC, Ulloa-Aguirre A. Assessment of the *in vitro* biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol* 2002;186:189-198.

Batra SK, Miller WL. Progesterone inhibits basal production of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cell culture. *Endocrinology* 1985;117:2443-2448.

Bauer-Dantoin AC, Weiss J, Jameson L. Roles of estrogen, progesterone and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropin surges. *Endocrinology* 1995;136:1014-1019.

Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 1978;102:1325-1338.

Breen CK. The role of protein glycosylation in the control of cellular N-sialyltransferase activity. *FEBS Letters* 2002; 517:215-218.

Brown P, McNeilly AS. Steroidogenic factor-1 (SF-1) and the regulation of expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone β -subunits in the sheep anterior pituitary *in vivo*. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:1513-1524.

Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, Haisenleer DJ, Marshall JC. GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes-assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 2002;143:3243-3249.

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

Caraty A, Fabre-Nys C, Delaleu B. Evidence that the medio-basal hypothalamus in the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ewe. *Endocrinology* 1998;139:1752-1760.

Castro-Fernández C, Olivares A, Soderlund D, López-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A, 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.

Catt KJ, Stojilkovic SS. Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 1989;1:15

Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 2000;65:613-620.

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

Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vit Horm* 1994;50:215-286.

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

Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981;2:186-209.

Combarnous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev* 1988;28:211-228.

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

Cowley MA, Rao A, Wright PJ, Illing N, Millar RP, 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 SA. 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.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Ulloa-Aguirre A, Campo S. Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of *in vitro* bioactivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;174:41-49.

Crowe MA, Padmanabhan V, Hynes N, Sunderland SJ, Enright WJ, Beitins IZ, Roche JF. Validation of a sensitive radioimmunoassay to measure serum follicle-stimulating hormone in cattle: correlation with biological activity. *Anim Reprod Sci* 1997;48:123-136.

Dharmesh SM, Baenzinger JU. Estrogen modulates expression of the glycosyltransferases that synthesize sulphated oligosaccharides of lutropin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1993;90:11127-11131.

Dhillon H, Dunn AM, Esquivel E, Hamernik DL, Wise ME. The estradiol-induced luteinizing hormone surge in the ewe is not associated with increased gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 1997;57:107-111.

Donaldson LE. Effect of continued daily injections of oxytocin on oestrous cycle length and reproductive tract morphology in the cow. *J Reprod Fert* 1969;18:259-263.

Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Ann Rev Physiol* 1998;60:461-496.

Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenzinger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for $\text{SO}_4\text{-4-GalNAc}\beta\text{1,4GlcNAc}\beta\text{1,2Man}\alpha$ that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 1991;67:1103-1110.

Fiete D, Baenzinger JU. Isolation of the $\text{SO}_4\text{-4-GalNAc}\beta\text{1,4GlcNAc}\beta\text{1,2Man}\alpha$ -specific receptor from rat liver. *J Biol Chem* 1997;272:14629-14637.

Finday JK, Clarke IJ. Regulation of the secretion of FSH in domestic animals. *J Reprod Fert Suppl* 1987;34:27-37.

Gallegos-Sánchez J, Rodríguez CJC. Fisiología de la reproducción en animales domésticos. Memorias del 1er Curso Internacional Sobre Feromonas y Bioestimulación Sexual. Febrero 6 a 8, México, DF. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2002:1-10.

García-Campayo V, Boime, I. Novel recombinan gonadotropins. *Trend Endocrinol Metabol* 2001;12:72-77.

García ME: Modificaciones al sistema de clasificación climatológica de Köppen. 4ª ed. México, DF. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, 1987.

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

Gina BG, Nett T. Estradiol and progesterone influence the syntesis of gonadotropins in the absence of gonadotropins-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 1995;53:166-172.

Goodman AC, Hoodge GD. The ovarian trial of the primate menstrual cycle. *Recent Prop Horm Res* 1983;39:1-73.

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

Green ED, Baenzinger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1988;263:36-44.

Gregg DW, Allen MC, Nett TM. Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biol Reprod* 1990;43:1032-1036.

Halvorson LM, Chin WW. Hormonas gonadotróficas: Biosíntesis, secreción, receptores y acción. Capítulo 3. 86-117. 4^a ed. 2001. Ed. Médica Panamericana. Editores: Yen SSC, Jaffe RB y Barbierti RL.

Hamernik DL, Kim KE, Maurer RA, Nett TM. Progesterone does not affect the amount of mRNA for gonadotropins in the anterior pituitary gland of ovariectomized ewes. *Biol Reprod* 1987; 37:1225-1232.

Hamernik DL. Molecular biology of gonadotropins. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:257-269.

Herbison AE. Neurochemical identity of neurons expressing oestrogen and androgen receptors in sheep hypothalamus. *J Reprod Fert* 1995;49:271-283.

Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews* 1998;19:302-330.

Hirschberg CD, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and golgi apparatus. *Annu Rev Biochem* 1987;56:63-87.

Inskeep EK, Murdoch WJ. Relation of ovarian function to uterine and ovarian secretion of prostaglandins during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe and cow. *Int Rev Physiol* 1980;22:325-356.

Ji I, Lee C, Song Y, Conn M, Ji HT. Cis- and Trans-Activation of hormone receptors: the LH receptor. *Mol Endocrinol* 2002;16:1299-1308.

Kalra SP. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endo Rev* 1993;14:507-537.

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

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

Koligian KB, Stormshak F. Nuclear and cytoplasmic estrogen receptors in ovine endometrium during the estrous cycle. *Endocrinology* 1977;101:524-533.

Krsmanovic LZ, Martines-Fuentes AJ, Arora KK, Mores N, Tomic M, Stojkovic SS, Catt KV. Local regulation of gonadotrophy function by pituitary gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 2000;141:1187-1195.

Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic gonadotropin-releasing hormone on incorporation of radioactive glucosamine and amino acids into luteinizing hormone and total protein by rat pituitaries *in vivo*. *Endocrinology* 1976;98:151-163.

Mahesh VB, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropins surge by endogenous steroids. *Steroid* 1998;63:616-629.

McNeilly AS. The generation of preovulatory LH surge. *Endocrine* 2000 Abstracts 3 S7.

Moenter SM, Caraty A, Lacatelli A, Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe existence of preovulatory GnRH surge. *Endocrinology* 1991;129:1175-1182.

Molter-Gérard C, Caraty A, Guérins, Fontaire J, Taragnat C. Dynamic changes in the gonadotrope cell subpopulations during an estradiol-induced surge in the ewe. *Biol Reprod* 2000;63:1084-1091.

Moore LG, Ng Chie W, Hudson NL, McNatty KP. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J Endocrinol* 2000;165:185-192.

Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in circulation. *J Biol Chem* 1971;246:1461-1467.

Nett TM. Regulation of genes controlling gonadotropin secretion. *J Anim Sci* 1990;68:3-17.

Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23:33-42.

Padmanabhan V, Miehler CD, Borondy M, I'Anson H, Wood RI, Landefeld TD, Foster DL, Beitins IZ. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating hormone isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 1992;131:213-220.

Perera MG, Falcón AA, Salas VA. Estandarización de la técnica de radiomarcaje con Iodo-Gen. Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Septiembre 24 a 26, Puebla (Puebla), México. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, AC.1996:40.

Perera MGJ. Patrón de distribución de isoformas de la hormona luteinizante (LH) intrahipofisaria y sérica en la especie bovina (tesis de doctorado). México, DF, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2003.

Perera G, Murcia C, Rojas S, Hernández J, González E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during oestrus and the luteal phase in Holstein heifers. *Anim Reprod Sci* 2004 en prensa.

Perlman S, Hazel VDB, Christiansen J, Gram-Nielsen S, Jeppesen BC, Andersen VK, Halkier T, Okkels S, Schambye TH. Glycosylation of an N-Terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3227-3235.

Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, 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.

Phogat JB, Smith RF, Dobson H. Effect of transport on pituitary responsiveness to exogenous pulsatile GnRH and oestradiol-induced LH release in intact ewes. *J Reprod Fert* 1999;116:9-18.

Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981;50:465-469.

Przekop F, Domanski E. Abnormalities in the seasonal course of oestrous cycles in the ewes after lesions of suprachiasmatic area of the hypothalamus. *J Endocrinol* 1980;85:481-486.

Roa CV. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertility Sterility* 2001;76:1097-1100.

Robinson JE. Gamma amino-butiric acid and the control of GnRH secretion in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1995;49:221-230.

Rojas MS. Distribución de isoformas de la hormona luteinizante (LH) en el suero de cabras (tesis de maestría). México, DF, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2003.

Ropelato MG, García-Rudaz MC, Castro-Fernández C, Ulloa-Aguirre A, Escobar ME, Barontini M, 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;84:4629-4936.

Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Atger M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet* 1990;54:77-79.

Roux N, Milgrom E. Inherited disorders of GnRH and gonadotropins receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:83-87.

Ryan RJ, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T. Structure-function relationships of gonadotropins. *Rec Prog Horm Res* 1987; 43:383-429.

Salvador ML, Maizels E, Hales BD, Miyamoto E, Yamamoto H, Hunzicker-Dunn M. Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 2002;143: 2986-2994.

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

Smith MJ, Jennes L, Wise PM. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 2000;141:4317-4320.

Smith MJ, Jennes L. Neuronal signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrus cycle. *Reprod* 2001;122:1-10.

Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996;125:133-141.

Statistical Analysis System (SAS/STAT®) versión 8.0. SAS Institute, North Carolina, 1999.

Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima N, Heji K, Kittok RJ, Grotjan HE, Kinder JE. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biol Reprod* 1992;46:442-450.

Thiéry JC, Pelletier J, Signoret JP. Effect of hypothalamic deafferentation on LH and sexual behaviour in ovariectomized ewes under hormonally induced oestrus cycle. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 1978;18:1413-1426.

Thompson JM, Meyer H. Body Condition Scoring of Sheep. Department of Animal Sciences, Oregon State University 1994.

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

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999;11:205-215.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Méndez JP. Is there any physiological role gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod* 2001;16:599-604.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-De-Timosi J, Maldonado A, Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from *in vitro* and *in vivo* models. Biol Reprod Minireview 2003;69:379.

Vogel DL, Magner JA, Scherins RJ, Weitraub BD. Biosynthesis, glycosylation and secretion of rat luteinizing hormone α and β -subunits: differential effects of ovariectomy and gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology 1986;119:202-213.

Wheaton JE, Mullet MA, Cornelius SG. Plasma FSH and LH patterns during the estrous cycle of ewes. Theriogenology 1984;21:989-995.

Wide L, Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular and luteal phase. J Clin Endocrinol Metab 1993;76:885-889.

Zalesky DD, Grotjan HE. Comparasion of intracellular and secreted isoforms of bovine and ovine luteinizing hormone. Biol Reprod 1991;44:1016-1024.

Zalesky DD, Nett TM, Grotjan HE. 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, Mendez JP, Guerrero L, Diaz-Cueto L, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 1995;80:1647-1656.

IX. ANEXOS

Cuadro 1. Tipos de isoformas de la hormona luteinizante en extractos hipofisarios de ovejas en fase lútea (promedio \pm error estándar).

Tipo de Isoformas	pH	Grupos				
		T _e	T-30	T-90	T-180	
Básicas	A	10.2 \pm 0.04	0.01 \pm 0.005	0.03 \pm 0.02	0.01 \pm 0.003	0.005 \pm 0.003
	B	9.7 \pm 0.04	53.8 \pm 5.6 ^a	48.3 \pm 6.7 ^a	47.7 \pm 4.7 ^a	53.8 \pm 5.3 ^a
	C	9.2 \pm 0.02	4.4 \pm 0.8	6.8 \pm 2.5	3.7 \pm 0.5	5.5 \pm 1.4
	D	8.7 \pm 0.04	24.6 \pm 3.3 ^b	25.2 \pm 1.2 ^b	29.5 \pm 3.8 ^b	23.5 \pm 4.0 ^b
Neutras	E	7.4 \pm 0.04	1.9 \pm 0.6	4.0 \pm 1.5	2.5 \pm 0.5	2.0 \pm 0.4
	F	7.1 \pm 0.02	2.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.5	2.3 \pm 0.2
Ácidas	G	6.4 \pm 0.03	9.7 \pm 2.3 ^c	7.7 \pm 1.4 ^c	9.4 \pm 1.7 ^c	8.5 \pm 1.3 ^c
	H	4.9 \pm 0.04	2.7 \pm 0.09	3.5 \pm 0.3	3.4 \pm 0.9	3.6 \pm 0.3
	I	3.6 \pm 0.02	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.7 \pm 0.09	0.6 \pm 0.2
	J	4.8 \pm 0.08	0.2 \pm 0.02	0.3 \pm 0.09	0.2 \pm 0.04	0.22 \pm 0.01

Distinta literal indica diferencia ($p < 0.05$) entre el mismo grupo.

Cuadro 2. Análisis de la hormona luteinizante eluída por unidad de pH en extracto hipofisiario ovino (promedio \pm error estándar).

Unidad de pH	Grupos			
	T _e	T-30	T-90	T-180
10	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02	0.01 \pm 0.003	0.005 \pm 0.003
9	58.2 \pm 6.8	55.8 \pm 4.2	51.3 \pm 5.0	59.3 \pm 6.4
8	24.6 \pm 3.7	25.6 \pm 1.5	29.5 \pm 4.4	23.5 \pm 4.7
7	3.9 \pm 1.1	6.2 \pm 2.1	5.5 \pm 1.1	4.3 \pm 0.5
6	9.7 \pm 2.7	7.9 \pm 1.7	9.5 \pm 2.0	8.5 \pm 1.5
4	2.9 \pm 0.1	3.5 \pm 0.3	3.4 \pm 1.0	3.6 \pm 0.3
3	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
NaCl	0.2 \pm 0.02	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.02

No se encontró diferencia ($p > 0.05$) estadística.

Cuadro 3. Porcentaje de isoformas de la hormona luteinizante presente en suero ovino (promedio \pm error estándar).

Tipo de Isoformas		pH	Grupos		
			T-30	T-90	T-180
Básicas	A	9.8 \pm 0.05	17.7 \pm 3.4	14.4 \pm 4.5	16.1 \pm 2.9
	B	8.76 \pm 0.05	40.8 \pm 8.4 ^a	40.6 \pm 7.9 ^a	39.6 \pm 4.5 ^a
Neutra	C	7.12 \pm 0.02	14.7 \pm 4.0 ^b	14.5 \pm 3.0 ^b	25.4 \pm 3.1 ^b
Ácida	D	5.27 \pm 0.09	26.8 \pm 9.2	30.8 \pm 11.2	19.2 \pm 3.8

Distinta literal indica diferencias ($p < 0.05$) entre el mismo grupo.

Cuadro 4. Análisis de la hormona luteinizante eluída por unidad de pH en suero ovino (promedio \pm error estándar).

Unidad de pH	Grupos		
	T-30	T-90	T-180
10	5.65 \pm 2.7	4.13 \pm 1.8	2.18 \pm 1.1
9	25.90 \pm 6.2	25.87 \pm 6.0	23.79 \pm 4.9
8	18.37 \pm 2.5	16.72 \pm 8.2	26.38 \pm 4.7
7	18.36 \pm 6.0	21.37 \pm 5.4	22.65 \pm 2.4
6	6.21 \pm 1.7	5.04 \pm 1.7	5.61 \pm 3.1
4	4.62 \pm 0.8	9.64 \pm 5.9	3.78 \pm 0.7
3	7.75 \pm 1.2	6.14 \pm 2.2	8.11 \pm 3.5

No se encontró diferencia ($p > 0.05$) estadística.

Cuadro 5. Porcentaje de hormona luteinizante obtenida en hipófisis y suero por grupo de pH en ovinos (promedio \pm error estándar).

Grupo de pH	Grupos											
	T _e		T-30		T-90		T-180					
	Hipófisis	Suero	Hipófisis	Suero	Hipófisis	Suero	Hipófisis	Suero				
Básicas (pH > 7.5)	83.88 \pm 2.93	51.43 \pm 4.73 ^b	80.63 \pm 3.95 ^a	51.43 \pm 4.73 ^b	81.46 \pm 2.80 ^a	47.84 \pm 9.59 ^b	82.95 \pm 1.97 ^a	54.22 \pm 5.99 ^b				
Neutras (pH 7.4 - 6.5)	3.72 \pm 0.59	16.67 \pm 3.35	8.64 \pm 3.15	16.67 \pm 3.35	6.63 \pm 1.49 ^a	20.21 \pm 6.01 ^b	4.97 \pm 0.43 ^a	22.61 \pm 2.33 ^b				
Ácidas (pH < 6.4)	12.19 \pm 2.35	31.9 \pm 7.27 ^b	10.28 \pm 1.25 ^a	31.9 \pm 7.27 ^b	11.68 \pm 1.42	31.85 \pm 9.55	11.83 \pm 1.63	23.17 \pm 5.53				

Distinta literal denota diferencia ($p < 0.05$) en pH entre hipófisis y suero dentro de un mismo grupo.

Cuadro 6. Comparación entre el porcentaje de isoformas de la hormona luteinizante presente en hipófisis y suero ovino (promedio \pm error estándar).

Tipos de Isoformas		pH		Grupos					
		Hipófisis	Suero	T-30		T-90		T-180	
B	A	9.70 \pm 0.04	9.80 \pm 0.05	48.3 \pm 6.7 ^a	17.7 \pm 3.4 ^b	47.7 \pm 4.7 ^a	14.4 \pm 4.5 ^b	53.8 \pm 5.3 ^a	16.1 \pm 2.9 ^b
D	B	8.70 \pm 0.04	8.76 \pm 0.05	25.2 \pm 1.2	40.8 \pm 8.4	29.5 \pm 3.8	40.6 \pm 7.9	23.5 \pm 4.0 ^c	39.6 \pm 4.5 ^b
F	C	7.10 \pm 0.02	7.12 \pm 0.02	2.0 \pm 0.2 ^a	14.7 \pm 4.0 ^b	3.0 \pm 0.5 ^a	14.5 \pm 3.0 ^b	2.3 \pm 0.2 ^a	25.4 \pm 3.1 ^b
H	D	4.90 \pm 0.04	5.27 \pm 0.09	3.5 \pm 0.3 ^a	26.8 \pm 9.2 ^b	3.4 \pm 0.9 ^a	30.8 \pm 11.2 ^b	3.6 \pm 0.3 ^a	19.2 \pm 3.8 ^b

Distinta literal denota diferencia ($p < 0.05$) en las isoformas entre hipófisis y suero dentro de un mismo grupo.

Cuadro 7. Análisis de la hormona luteinizante eluida por unidad de pH en extracto hipofisiario y suero ovino (promedio \pm error estándar).

Unidad de pH	Grupos					
	T-30		T-90		T-180	
	Hipófisis	Suero	Hipófisis	Suero	Hipófisis	Suero
10	0.03 \pm 0.02	5.65 \pm 2.7	0.01 \pm 0.003	4.13 \pm 1.8	0.005 \pm 0.003 ^a	2.18 \pm 1.1 ^b
9	55.8 \pm 4.2 ^a	25.90 \pm 6.2 ^b	51.3 \pm 5.0 ^a	25.87 \pm 6.0 ^b	59.3 \pm 6.4 ^a	23.79 \pm 4.9 ^b
8	25.6 \pm 1.5 ^a	18.37 \pm 2.5 ^b	29.5 \pm 4.4	16.72 \pm 8.2	23.5 \pm 4.7	26.38 \pm 4.7
7	6.2 \pm 2.1	18.36 \pm 6.0	5.5 \pm 1.1 ^a	21.37 \pm 5.4 ^b	4.3 \pm 0.5 ^a	22.65 \pm 2.4 ^b
6	7.9 \pm 1.7	6.21 \pm 1.7	9.5 \pm 2.0	5.04 \pm 1.7	8.5 \pm 1.5	5.61 \pm 3.1
4	3.5 \pm 0.3	4.62 \pm 0.8	3.4 \pm 1.0	9.64 \pm 5.9	3.6 \pm 0.3	3.78 \pm 0.7
3	0.3 \pm 0.1 ^a	7.75 \pm 1.2 ^b	0.7 \pm 0.1 ^a	6.14 \pm 2.2 ^b	0.6 \pm 0.2 ^a	8.11 \pm 3.5 ^b

Diferente literal de renglón denota diferencia estadística ($p < 0.05$) por unidad de pH dentro del mismo grupo entre hipófisis y suero.

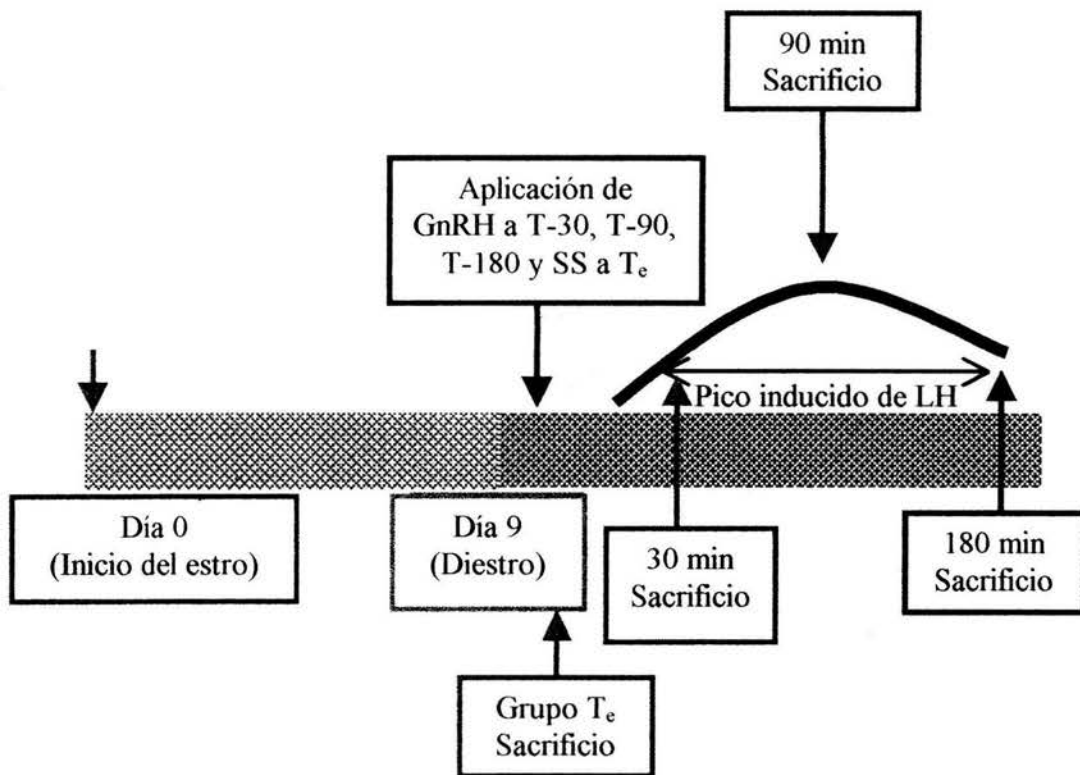


Figura 1. Tiempo de sacrificio de las ovejas para la obtención de suero e hipófisis, después de la aplicación de solución salina (SS; grupo T_e) o la GnRH (Grupos T-30, T-90 y T-180).

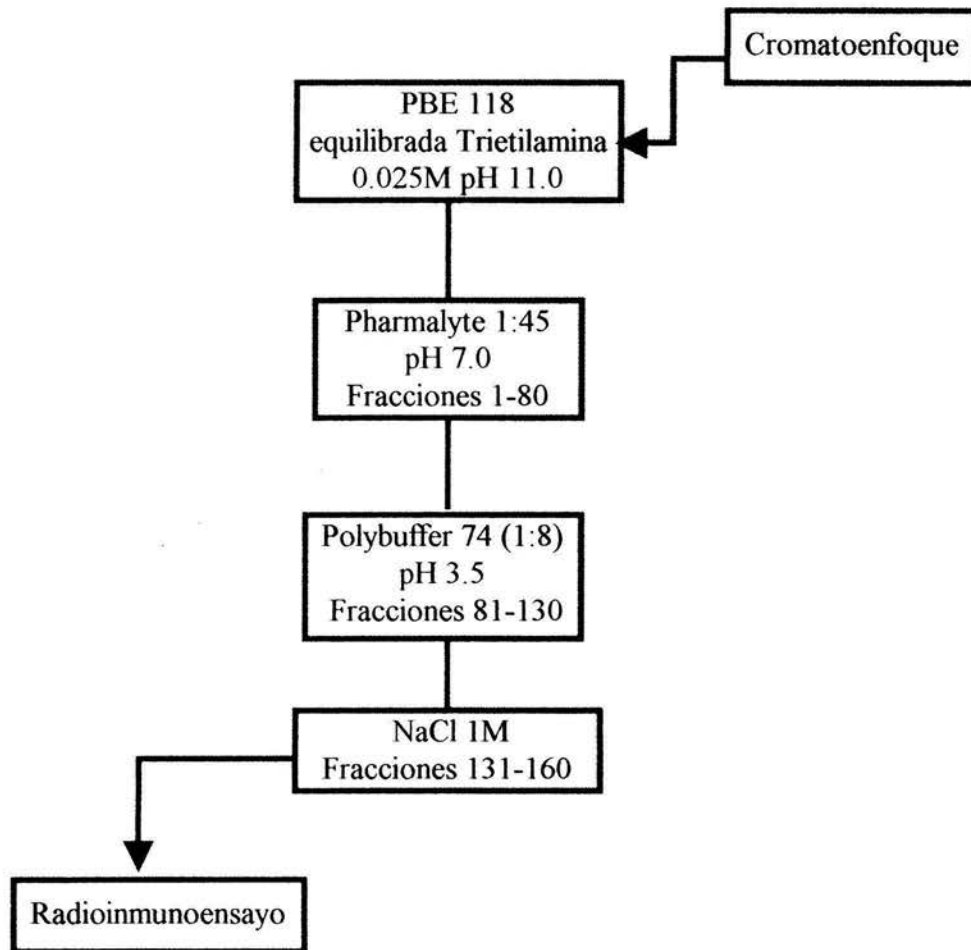


Figura 2. Cromatoenfoco de la LH para extractos hipofisarios y muestras séricas.

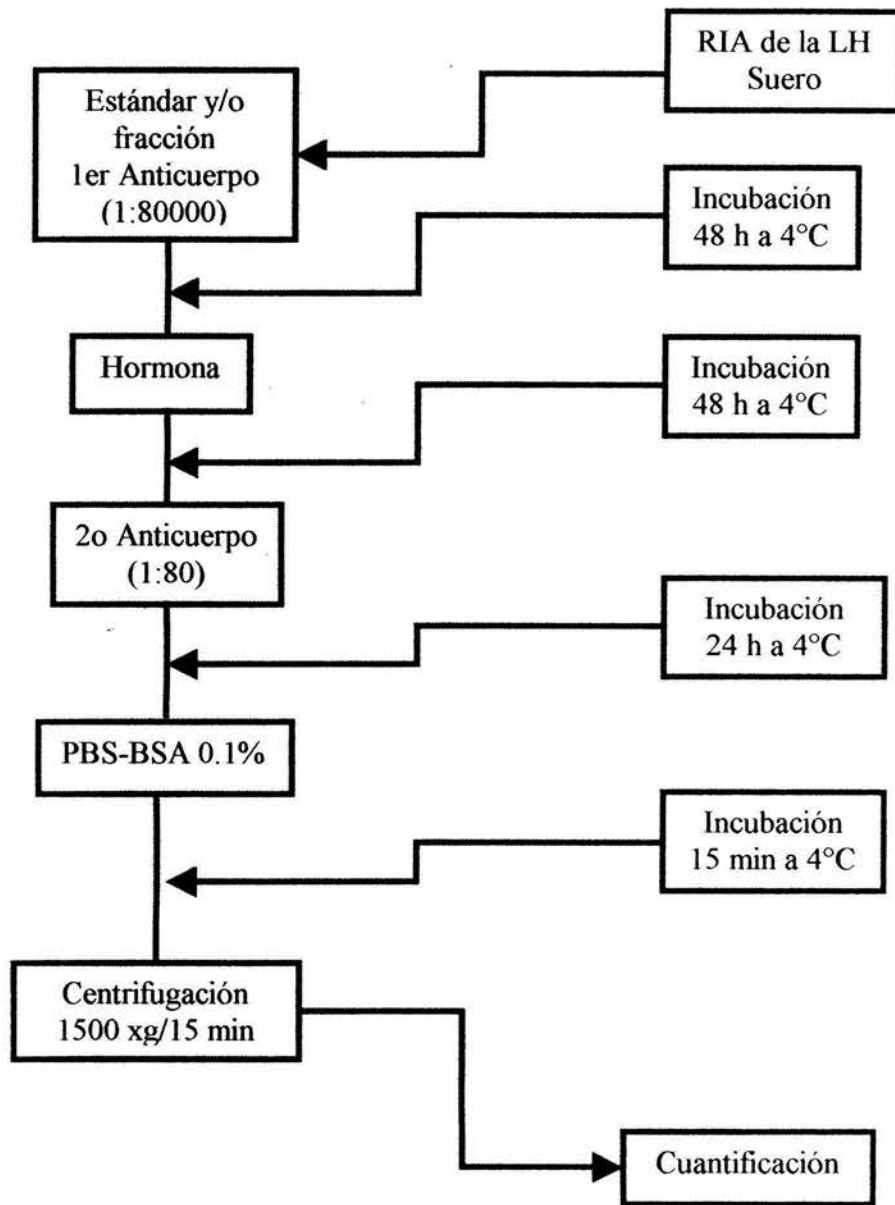


Figura 3. Radioinmunoanálisis de las muestras séricas de ovinos.

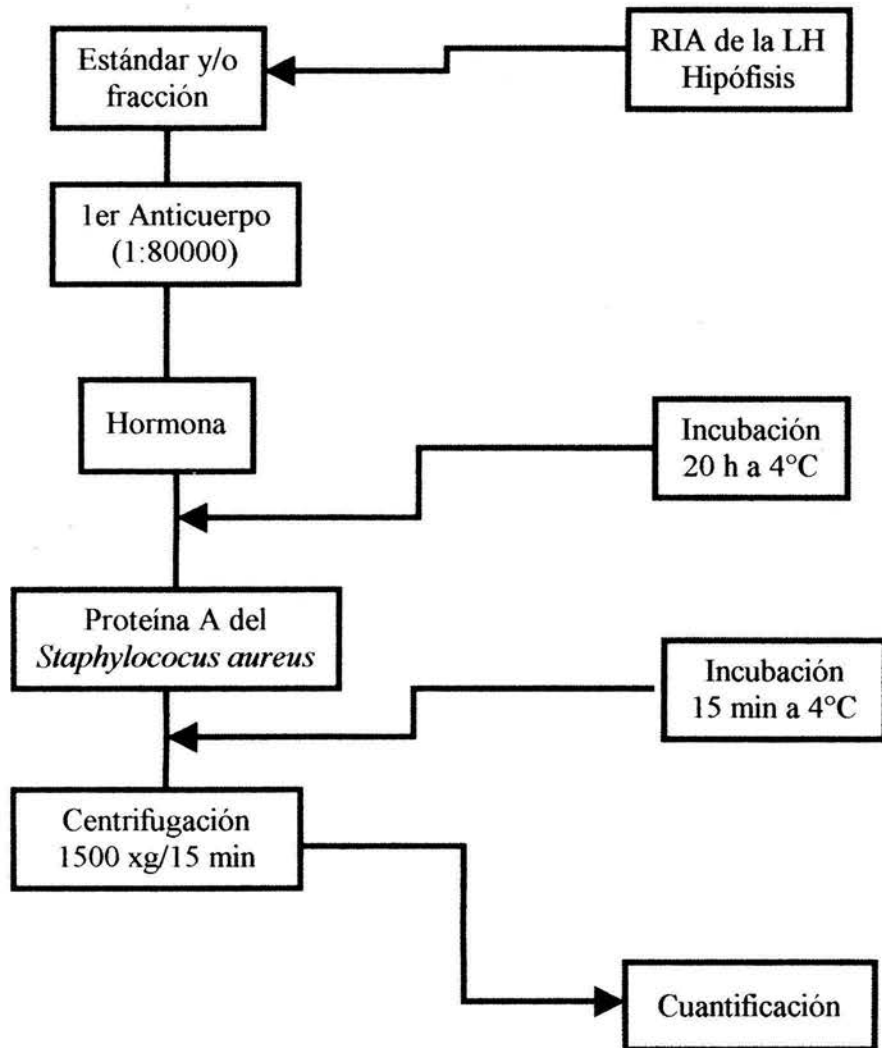


Figura 4. Radioinmunoanálisis de los extractos hipofisarios ovinos.

Respuesta al estímulo de la GnRH

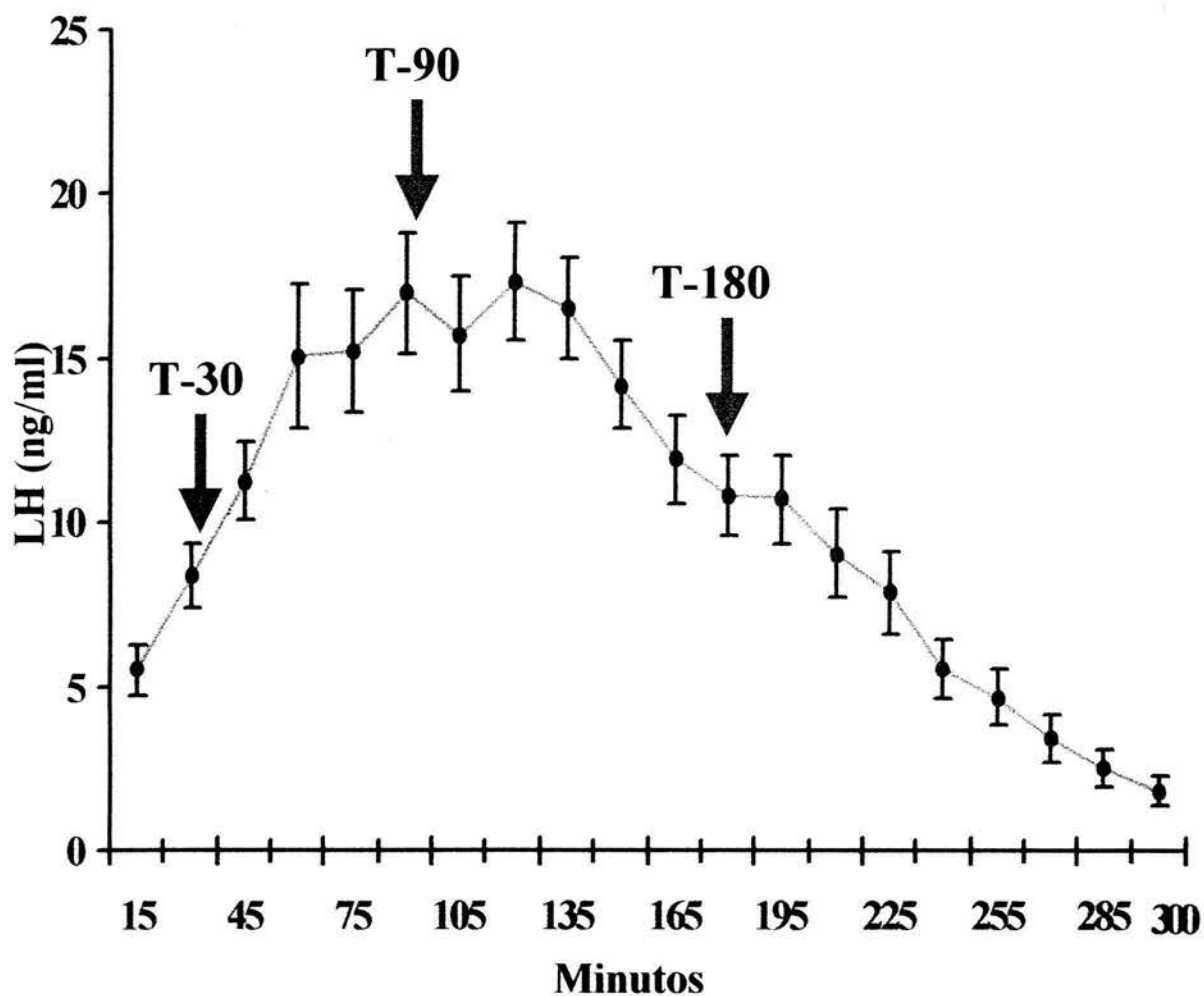


Figura 5. Concentraciones séricas (promedio \pm error estándar) de la LH en muestras colectadas a intervalos de 15 min durante 5 h, después de aplicar 100 μ g de la GnRH a las ovejas (n=16).

Las flechas indican los tiempos considerados para sacrificar a las ovejas T-30 (30 min), T-90 (90 min) y T-180 (180 min).

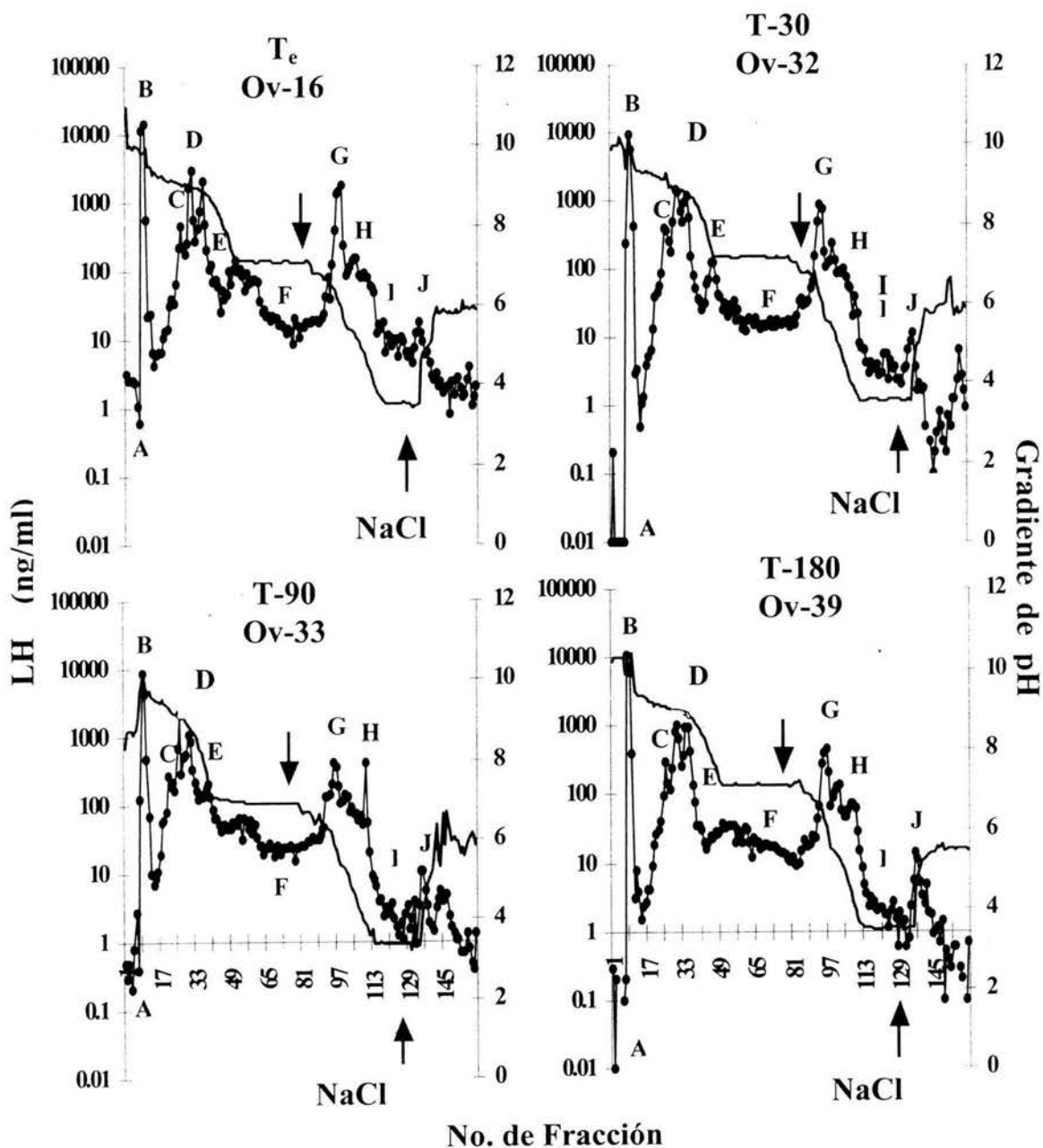


Figura 6. Patrón de elución representativo de una oveja de cada grupo de la LH hipofisiaria ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

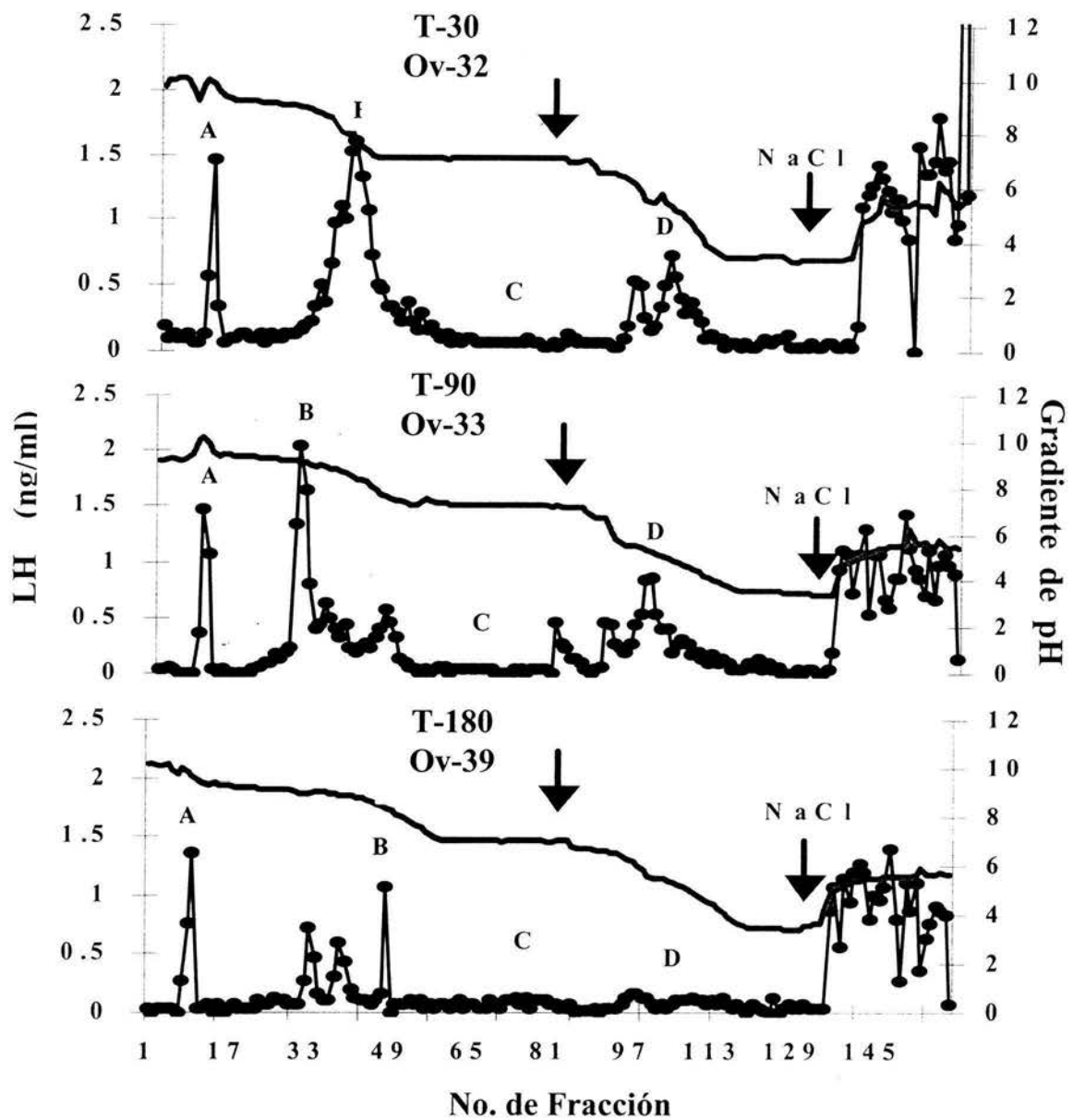


Figura 7. Patrón de elución representativo de la LH sérica se presenta una oveja por grupo.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatofoco.

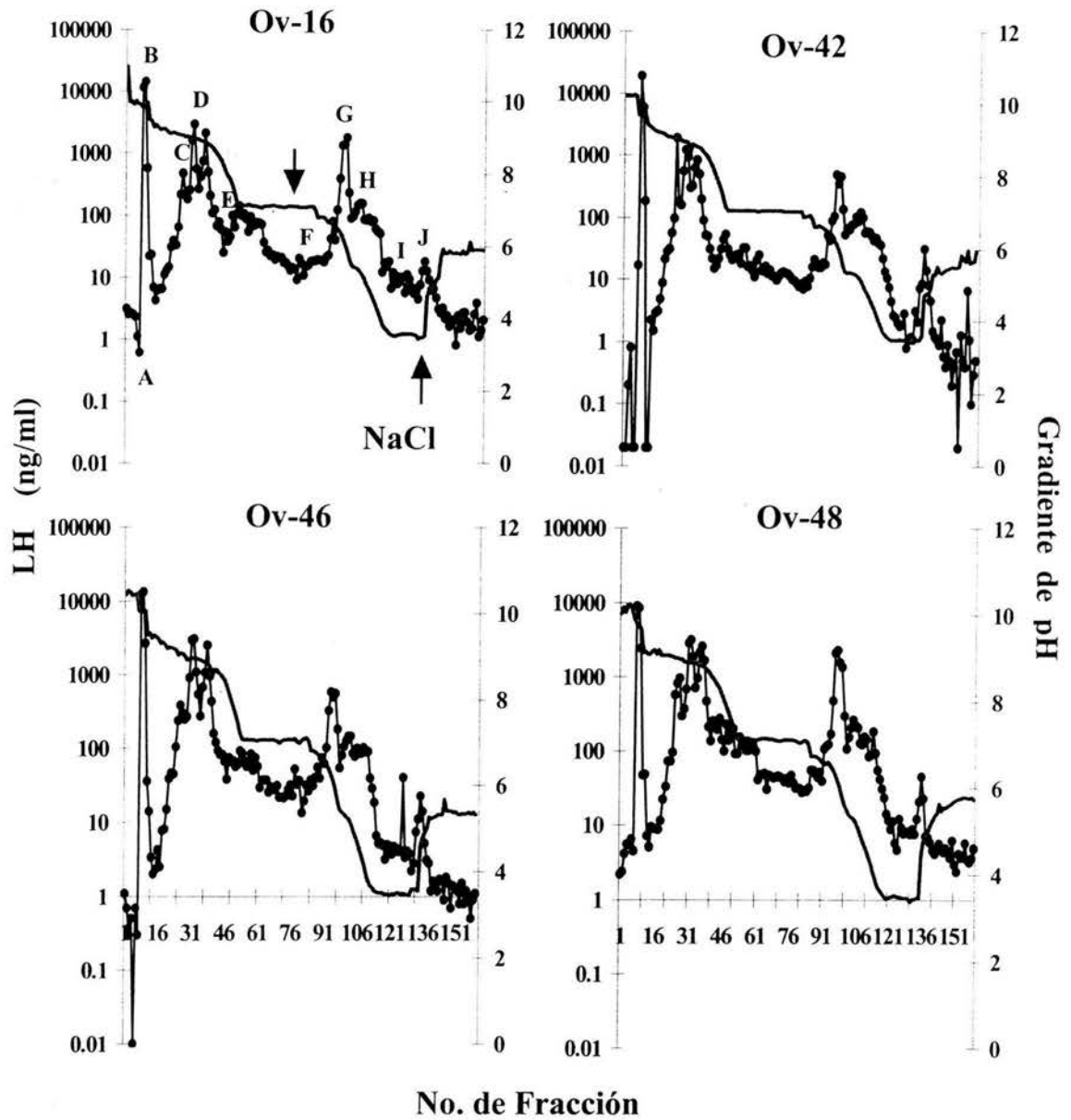


Figura 8. Patrón de elución de las isoformas del grupo T_e de la LH hipofisiaria ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

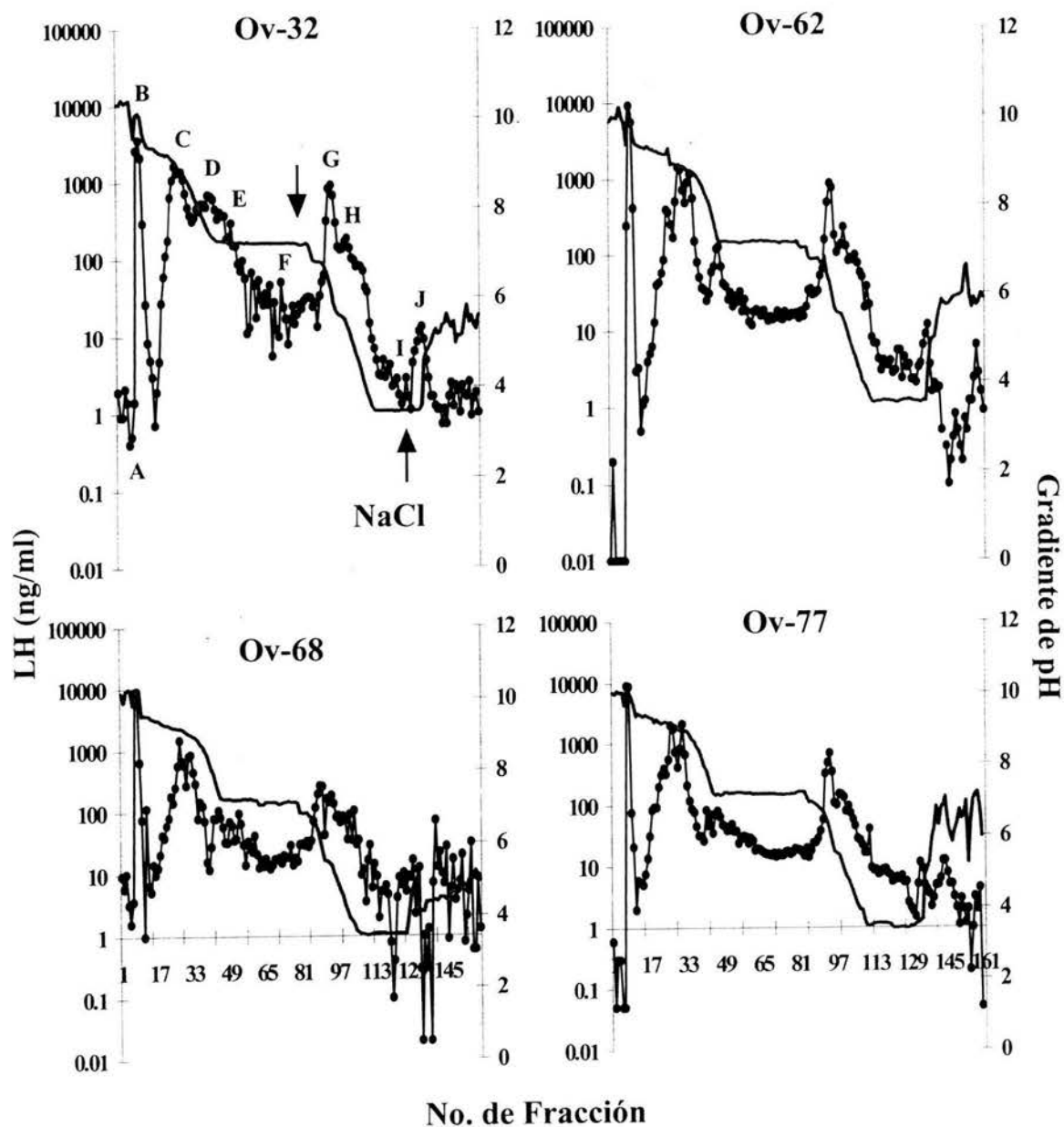


Figura 9. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-30 de la LH hipofisiaria ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador. Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

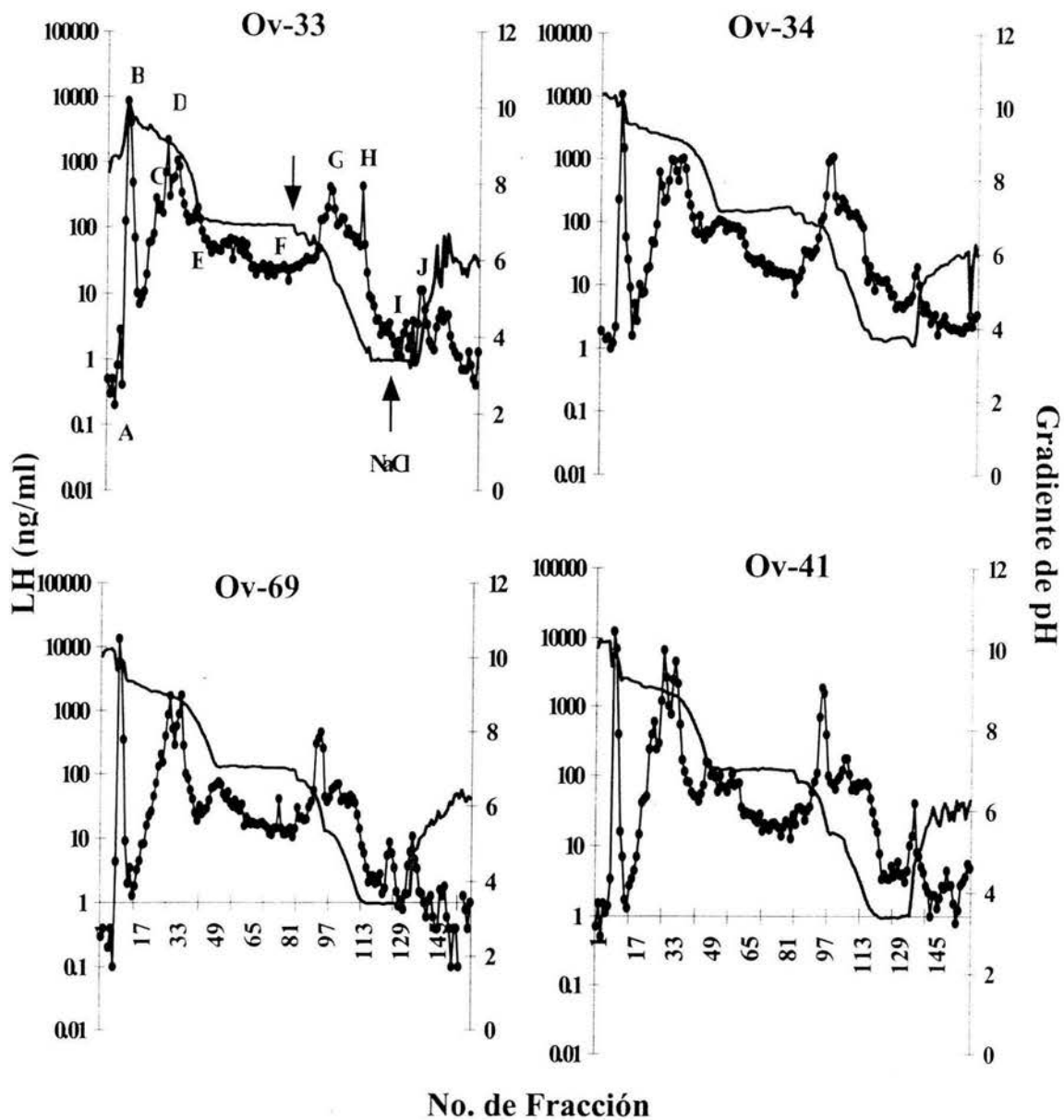


Figura 10. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-90 de la LH hipofisiaria ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

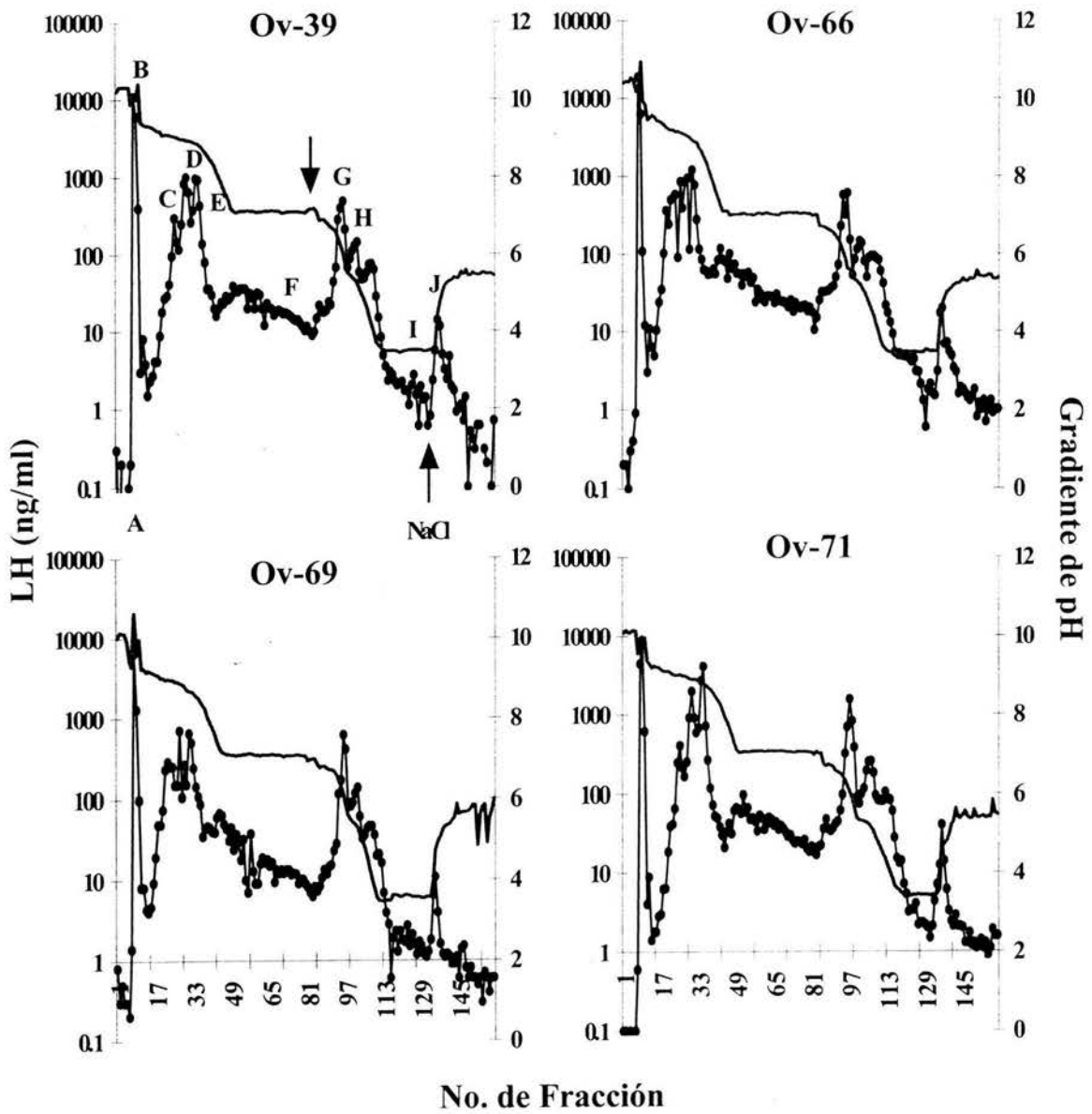


Figura 11. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-180 de la LH hipofisiaria ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador. Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

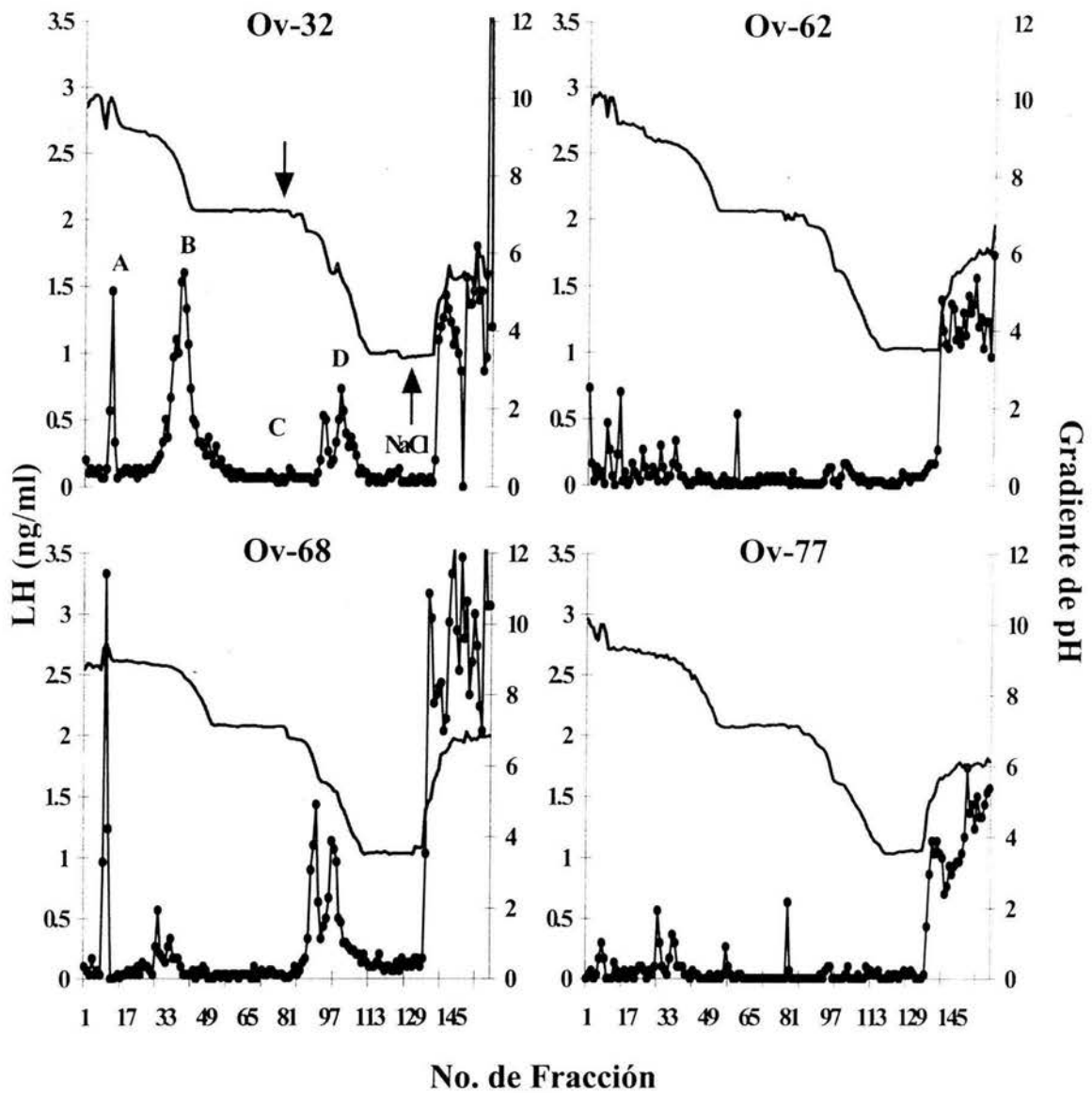


Figura 12. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-30 de la LH sérica ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

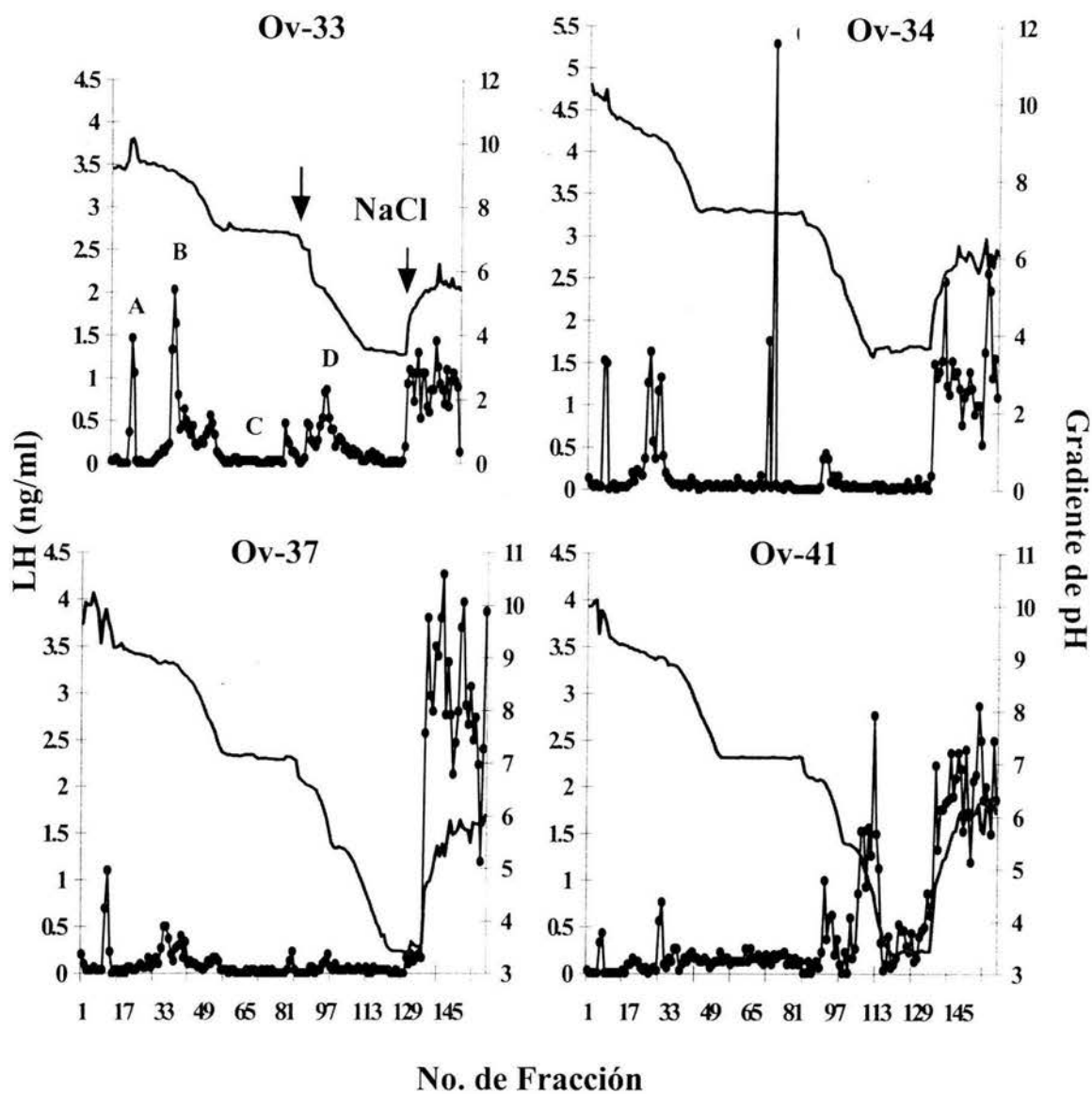


Figura 13. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-90 de la LH sérica ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

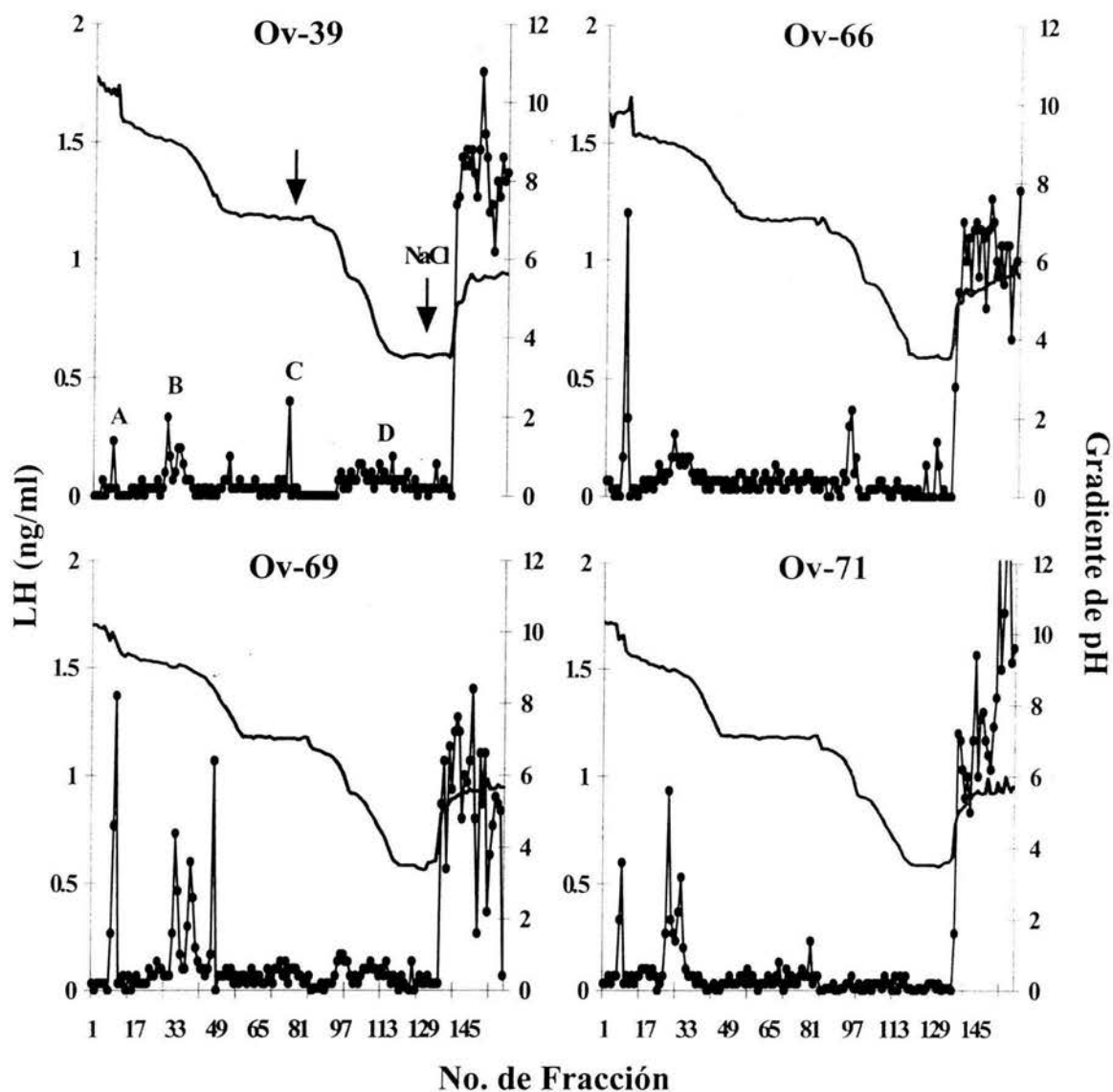


Figura 14. Patrón de elución de las isoformas del grupo T-180 de la LH sérica ovina.

La línea continua indica el gradiente de pH de elución de las fracciones colectadas. La línea punteada indica la concentración de la LH para cada fracción. Las flechas muestran los cambios de amortiguador.

Las letras señalan los diferentes tipos de isoformas de la LH identificadas en el cromatograma.

“En mi final está mi principio” –dice T.S. Eliot–