



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**LA DESENSIBILIZACIÓN DE LA PITUITARIA DURANTE LA GESTACIÓN
AUMENTA LAS ISOFORMAS BÁSICAS DE LH EN LA PITUITARIA DEL
BECERRO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:

OMAR NAVA SÁNCHEZ

TUTOR: CARLOS GUTIÉRREZ AGUILAR

COMITÉ TUTORAL: JOEL HERNÁNDEZ CERÓN
MA. TERESA SÁNCHEZ TORRES

MEXICO, D.F; 2009



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.

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 la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

Omar Nava Sánchez

DEDICATORIAS

A mis padres:

Eloy Nava Damián y María Sánchez García, por su apoyo incondicional durante mi formación académica y personal.

A mi esposa e hijo:

Itzel Estrada Medina por su amor y apoyo incondicional desde 2003 y a mi hijo que esta en camino.

A mis hermanas:

Nancy y Nelly por apoyarme durante mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y comité tutorial:

Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar.

Dr. Joel Hernández Cerón.

Dra. Ma. Teresa Sánchez Torres.

Al Dr. Héctor Basurto Camberos

Por su apoyo durante la realización del proyecto.

Al Dr. Gerardo Perera Marín, Dra. Clara Murcia Mejía y MVZ. Cecilia Vizcaya

Sánchez:

Por su apoyo y enseñanza en la determinación de las isoformas.

A CONACYT.

Por otorgarme la beca.

A mis compañeros del Clarín:

Juan Heberth, Chucho, Toxon, Martha, Izel, Félix, Ángeles, Luis, Gerardo, Areli,
Leslie y Juan Carlos.

Proyecto financiado por la Universidad de Nottingham “El papel del GnRH en el desarrollo de la hipófisis y gónadas durante el desarrollo fetal”

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1.0 INTRODUCCIÓN.....	3
2.0 HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	5
3.0 REVISIÓN DE LITERATURA	
➤ Gonadotropinas.....	6
➤ Heterogeneidad de las gonadotropinas.....	6
➤ Actividad biológica de las isoformas de las gonadotropinas.....	7
➤ Heterogeneidad de la Hormona luteinizante.....	8
➤ Control de la secreción de GnRH.....	9
➤ Estradiol, secreción de GnRH e isoformas de las gonadotropinas.....	10
➤ Progesterona, secreción de GnRH e isoformas de las gonadotropinas.....	11
➤ Administración prolongada de un agonista de GnRH.....	12
➤ Administración prolongada de GnRH durante la vida embrionaria.....	13
➤ Administración de GnRH e isoformas de las gonadotropinas.....	14
4.0 MATERIAL Y MÉTODOS	
➤ Animales y manejo.....	16
➤ Evaluación de la respuesta aguda de la pituitaria y toma de muestras sanguíneas.....	16
➤ Eutanasia de becerros, colección de pituitarias y procesamiento.....	17
➤ Preparación de las pituitarias.....	18
➤ Determinación de las isoformas de las gonadotropinas por cromatoenfoco.....	18
➤ Radioinmunoensayo para la LH de las fracciones del cromatoenfoco.....	19

➤ Radioinmunoensayo para LH de las muestras de plasma.....	20
➤ Radioinmunoensayo para FSH de las muestras de plasma.....	20
➤ Análisis Estadístico.....	21
5.0 RESULTADOS.....	22
6.0 DISCUSIÓN.....	27
7.0 CONCLUSIÓN.....	33
8.0 REFERENCIAS.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS	TITULO	PAGINA
Figura 1	Esquema de la administración de GnRH y muestreo sanguíneo.	16
Figura 2	Concentración de LH en eluidos de extracto pituitario, de acuerdo al punto isoeléctrico de la isoforma, presentes en la pituitaria de becerros nacidos de madres desensibilizadas con GnRH (grupo tratado) y becerros nacidos de madres no desensibilizadas (grupo control).	21
Figura 3	Porcentaje de isoformas básicas, neutras y acidas en la pituitaria de becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH y becerros controles, nacidos de madres no desensibilizadas a GnRH.	22
Figura 4	Concentración plasmática de LH en respuesta a la aplicación de 10 y 100 µg de GnRH en becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH, grupo tratado y grupo control.	24
Figura 5	Concentración plasmática de FSH (ng/ml) en respuesta a la aplicación de 10 y 100 µg de GnRH en becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH, grupo tratado y grupo control.	25
CUADROS	TITULO	
Cuadro 1	Concentración y proporción de Isoformas de LH, agrupados por unidad de pH, presentes en la pituitaria de becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH (grupo tratado) y becerros nacidos de madres no desensibilizadas a GnRH (grupo control).	23

RESUMEN

La desensibilización de la Pituitaria durante la gestación aumenta las Isoformas Básicas de LH en la pituitaria del becerro.

Nava SO, Gutiérrez ACG, Hernández CJ, Sánchez TMT.

El objetivo fue analizar si la desensibilización de la pituitaria a GnRH durante la gestación afecta la proporción de isoformas de LH y la respuesta de LH y FSH de la pituitaria a un reto con GnRH. Se utilizaron 6 becerros control (Grupo Ctrl) y 6 becerros (Grupo TX) nacidos de vacas con la pituitaria desensibilizadas desde el día 90 de gestación hasta el parto. La desensibilización de la pituitaria se logró mediante implantes de bombas osmóticas que secretaron continuamente 2.5 µl/hr de Buserelin (15.75 mg/ml). Todas las gestaciones transcurrieron normalmente y los partos ocurrieron a los 280 días. A las 8 semanas de vida, la pituitaria de los becerros se evaluaron mediante la inyección de 10 µg de GnRH (tiempo 0) y nuevamente 100 µg a los 180 minutos. Las concentraciones de gonadotropinas se evaluaron en muestras seriadas por los 270 minutos posteriores al inicio del reto con GnRH. Los becerros se sacrificaron y se extrajo la pituitaria. La concentración de LH y FSH se determinaron por Radioinmunoensayo (RIA). La proporción de isoformas de LH se determinaron por Cromatofoco y RIA. El tratamiento aumentó la proporción de isoformas básicas (rango pH 8 - 8.99) de LH en el grupo TX, siendo la isoforma 8.91 la predominante ($P \leq 0.05$). Igualmente, se observó una disminución en la proporción de isoformas de pH 6-6.99, siendo la isoforma ácida 6.15 la que se presentó en menor proporción ($P \leq 0.05$). En el grupo TX se produjo una menor respuesta de la FSH al desafío con 100 µg de GnRH natural, reflejado a los 270 minutos posteriores a la primera inyección. En conclusión, la desensibilización de la pituitaria a un agonista de GnRH en la vaca gestante, aumenta la proporción de isoformas básicas y disminuyen la isoformas ácidas en la pituitaria del becerro.

Palabras clave: Isoformas, gonadotropinas, GnRH, desensibilización pituitaria.

ABSTRACT

Pituitary desensitization during pregnancy increases the Basic LH isoforms in the pituitary calf

Nava SO, Gutiérrez ACG, Hernández CJ, Sánchez TMT.

The objective was to analyze whether desensitization of the pituitary to GnRH during pregnancy affects the proportion LH and FSH isoforms and the pituitary response to a GnRH challenge. Six calves were used Control (Ctrl Group) and 6 calves (Group TX) born to cows which the pituitary was desensitized from day 90 of pregnancy until delivery. Desensitization of the pituitary was achieved through osmotic pump that continuously secreted 2.5 μ l / hr of Buserelin (15.75 mg / ml). All pregnancies and births took place normally. The calve pituitary was assessed by injecting 10 g μ GnRH (time 0) and again 100 μ g at 180 minutes when calves were 8 weeks old. Gonadotrophins were evaluated by serial samples in 270 minutes after GnRH administration. Calves were sacrificed and extracted the pituitary. LH and FSH concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA). The proportion LH isoforms were determined by chromatofocusing and RIA. Treatment increased the proportion of basic LH isoforms (pH range 8 - 8.99), with the predominant isoform being 8.91 ($P \leq 0.05$). Similarly, there was a decrease in the proportion of acid isoforms pH 6-6.99 ($P \leq 0.05$). The treated group had lower FSH response to 100 μ g GnRH naturally 270 minutes after the first injection. In conclusion, chronic treatment of the pregnant cow with a GnRH treatment increased the proportion of basic isoforms in the pituitary of their calves and reduces the acidic isoforms.

Key words: Isoforms, gonadotropins, GnRH, pituitary desensitization

1.0 INTRODUCCIÓN

La microheterogeneidad de las gonadotropinas es diferente en cada individuo. El polimorfismo de la Hormona luteinizante depende del tipo y estructura de sus oligosacáridos, así como de sus residuos de sulfato y/o ácido siálico terminal (Ulloa-Aguirre *et al*; 2003). La relación entre isoformas de la LH presentes en el suero y en la glándula pituitaria es poco conocido. Isoformas más neutras y ácidas están presentes en el torrente sanguíneo que en la pituitaria. El porcentaje de isoformas básicas en la pituitaria aumenta cuando los niveles de estradiol son altos y progesterona son bajos (Perera-Marín *et al*; 2007). Es de interés conocer la concentración y tipo isoformas de la LH en pituitaria y las concentraciones circulantes de la misma. La potencia biológica *in vivo* de las gonadotropinas dependerá del tipo específico de residuos terminales de los oligosacáridos en sus estructuras (Moore *et al*; 2000). La extensión de la terminal con siliación y/o sulfonación es el principal factor que determina la carga global de las moléculas.

De Leeuw *et al* (1996), encontraron que las isoformas más ácidas de la FSH con punto isoeléctrico conocido (pI 4.27) tuvieron una vida media con eliminación terminal de 24 horas, en comparación con 12 h de las menos ácidas (pI 5.49). Las formas menos ácidas pueden ser más activas a nivel de los receptores, aunque tienen vida media corta pueden ser más potentes que las de vida media más larga. El principal determinante de la vida media *in vivo* de la LH es la interacción de la Isoforma con la célula blanco, no tanta como la tasa metabólica de eliminación (<biblio>). También *in vivo* e *in vitro*, la actividad biológica se correlacionó positivamente con el contenido de ácido siálico. FSH sin ácido siálico tienen mayor actividad *in vitro* que las que lo tienen, sin embargo *in vivo* tienen poca actividad biológica debido a su rápida eliminación. (Galway *et al* 1990, Lambert *et al* 1998). La actividad biológica de las isoformas de las gonadotropinas depende de su microheterogeneidad, también se ven afectadas por el estado fisiológico en cada individuo. Recientemente, con el cromatoenfoco, el polimorfismo de la LH se ha identificado en el suero de caprinos, bovinos y ovinos (Arrieta *et al*; 2006, Perera *et al*; 2005). Se han

descrito trece isoformas de LH en extractos pituitarios de hembras bovinas (Perera-Marín 2003) y ovinas, (Arrieta *et al*; 2006). Predominando las isoformas básicas. Dependiendo del estado fisiológico y neuroendocrino al momento de la colecta de la hipófisis, se puede encontrar que durante la fase folicular del ciclo estral del bovino (Ulloa-Aguirre *et al*; 1999) la proporción de isoformas menos ácidas de la FSH se incrementan (mayor bioactividad *in vitro*). Mientras que en la fase lútea, la proporción de isoformas ácidas disminuye (menor bioactividad *in vitro*) (Ulloa-Aguirre *et al*; 1999, Perera-Marín *et al*; 2005). En bovinos, en la fase folicular hay un aumento en el porcentaje de isoformas ácidas de la LH y las isoformas básicas de la FSH, en la fase lútea hay un aumento en el porcentaje de isoformas básicas de la LH y las isoformas mas ácidas de la FSH aumentan (Perera-Marín *et al*; 2005). Dependiendo del estado fisiológico del individuo, puede verse afectada la proporción de isoformas de la LH en la pituitaria debido al tratamiento crónico con GnRH. La administración prolongada de GnRH en bovinos, conduce a la supresión de la secreción de gonadotropinas, lo que conlleva a una disminución en la concentración de la LH y la FSH en la circulación (Counis, 2005; Gong *et al* 1996). En fetos de oveja desensibilizados a GnRH puede existir alguna alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Brooks *et al*; 1995). La respuesta de la LH al desafío de GnRH es la mejor prueba para mostrar la desensibilización pituitaria por un agonista de GnRH (Scheele *et al*; 1996). Sin embargo, no hay informes sobre el efecto de la supresión de actividad gonadotrópica en la vaca gestante y la repercusión de este tratamiento en la cría. La administración prolongada de un agonista de GnRH tiene repercusiones en la concentración de gonadotropinas fetales y desarrollo gonadal (Brooks *et al*; 1996). Es por ello que toma relevancia estudiar el efecto del tratamiento prolongado con un agonista de GnRH en la madre y su efecto en el feto desde el día 90 de gestación y el estudio posnatal de la cría, se especula que en becerros nacidos de vacas desensibilizadas a GnRH, la proporción de isoformas de la LH en la pituitaria será alterada y las concentraciones plasmáticas de la LH y FSH, serán menores en respuesta al estímulo específico de GnRH natural.

2.0 HIPÓTESIS

En becerros nacidos de vacas desensibilizadas contra GnRH, la proporción de isoformas de la LH en la pituitaria es alterada y las concentraciones plasmáticas de la LH y FSH son menores en respuesta al estímulo específico de GnRH natural.

OBJETIVO

Determinar la heterogeneidad de las isoformas de la LH de extractos pituitarios de becerros, cuyas madres gestantes fueron desensibilizadas contra GnRH y las concentraciones circulantes de la LH y FSH en respuesta a la administración de 10 y 100 µg de GnRH natural a los 60 días de vida.

3.0 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Gonadotropinas

Las gonadotropinas son proteínas heterodiméricas, en las cuales la subunidad α es común en estas hormonas y para otras hormonas como la HCG y TSH. Las gonadotropinas poseen enlace no covalente a una subunidad β específica de cada hormona. Las gonadotropinas tienen diferentes funciones que activan caminos de señalización intracelulares, como el AMP (cAMP)/ Adenilciclase y calcio/fosoinositol. Cada hormona es responsable de diferentes funciones. En la hembra, las gonadotropinas se producen de manera secuencial y ejercen funciones en el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos, la secreción de estrógenos, la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y secreción de progesterona. La FSH controla el reclutamiento, crecimiento y maduración folicular, además de la esteroidogénesis, particularmente del estradiol. La LH controla el estímulo principal para la ovulación, formación del cuerpo lúteo y secreción de progesterona (Lambert *et al*; 1998). Los carbohidratos que conforman a las glicoproteínas cambian dependiendo de la edad, época del año y estado fisiológico del animal (Perera *et al*; 2005), lo que se conoce como microheterogeneidad.

3.1.1 Heterogeneidad de las gonadotropinas

La proporción relativa de cada grupo de isoformas depende del estado fisiológico del individuo. Un medio endocrino con mayores concentraciones de estradiol circulante se ha asociado con un mayor porcentaje de isoformas LH-ácidas y FSH-básicas en la glándula pituitaria y la disminución en la concentración de estradiol circulante, en cambio, la inhibición de GnRH, favorece un aumento en el porcentaje de isoformas LH-básicas y FSH-ácidas (Kojima *et al*; 1995). En bovinos, la progesterona es el principal regulador de la secreción de GnRH durante la fase lútea del ciclo estral.

La edad y el sexo determinan la proporción y tipo de isoformas de las gonadotropinas, las diferencias de las isoformas de FSH y LH durante el desarrollo puberal y en niños es escasa. En la pubertad, en niñas existe un pequeño giro a más ácidas, mientras que en los varones se producen isoformas menos ácidas. (Phillips *et al*; 1997). Estradiol y progesterona tienen un papel importante en la regulación del medio endocrino y tipo de isoformas de las gonadotropinas, las cuales tienen diferente actividad biológica.

3.1.2 Actividad biológica de las isoformas de las gonadotropinas

La potencia biológica *in vivo* de las gonadotropinas dependerá del tipo específico de residuos terminales de oligosacáridos en sus estructuras, la terminal con siliación y/o sulfonación es el principal factor que determina la carga global de las moléculas (Moore *et al*; 2000). De Leeuw *et al* (1996) encontraron que las isoformas más ácidas de la FSH con punto isoeléctrico conocido (pI 4.27) tuvieron una vida media de 24 horas, en comparación con 12 h de las menos ácidas (pI 5.49). Las formas menos ácidas pueden ser más activas a nivel de los receptores, aunque tienen vida media corta pueden ser más potentes que las de vida media más larga (De Leeuw *et al* 1996). El principal determinante de la vida media *in Vivo* de la LH es la interacción de la isoforma con la célula blanco. *In Vivo* e *in Vitro*, la actividad biológica se correlacionó positivamente con el contenido de ácido siálico. FSH sin ácido siálico tienen mayor actividad *in vitro* que las que lo tienen, sin embargo *in Vivo* tienen poca actividad biológica debido a su rápida eliminación (Galway *et al* 1990, Lambert *et al*; 1998). La actividad biológica de las isoformas de las gonadotropinas depende de su microheterogeneidad y esta se ve afectada por cambios fisiológicos en cada individuo.

3.2 Heterogeneidad de la Hormona luteinizante

La LH es una glicoproteína, pertenece a una familia de hormonas entre las que se encuentran la hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), la gonadotropina coriónica humana (hGC) y la gonadotropina coriónica equina (eCG) (Pierce y Parson; 1981, Gharib; 1990).

La LH en la hembra participa en la regulación ovárica, actuando sobre las células de la teca interna del folículo estimulando la producción de andrógenos. Induce la maduración folicular, la ovulación, el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona (Campbell *et al*; 1995). En el macho, la LH, básicamente regula en la secreción de testosterona (Niswender 2000).

La LH es una proteína compuesta por dos subunidades glicosiladas α y β , es sintetizada por los gonadotropos de la hipófisis anterior, estos se dividen en mono-hormonales (son reconocidos específicamente por anticuerpos anti-LH o anti-FSH) y bi-hormonales si producen ambas gonadotropinas. La proporción de gonadotropos varía de acuerdo a la fase del ciclo estral (Combarnous; 1988).

La carga de la LH dependerá del tipo de oligosacáridos que la conformen. La LH contiene oligosacáridos conformados por una o dos ramificaciones, que presentan como residuo final sulfato, ácido siálico o manosa, formando estructuras de oligosacáridos del tipo mono-sulfatados, di-sulfatados y/o sulfatados-sializados. El tipo de ramificación varía dependiendo de la especie, por ejemplo, la LH bovina y ovina se caracterizan por presentar un a proporción de oligosacáridos con residuos sulfatados (mono y bisulfatados), con un 76 % de ramas bi-sulfatadas y un 24 % de mono-sulfatadas, mientras que la LH de origen humano presenta tanto residuos sulfatados como sializados. Estas variaciones constituyen las bases químicas de la formación de las isoformas o la heterogeneidad estructural de la LH. (Baenziger y Green; 1988). El 30% de las gonadotropinas son carbohidratos.

La adición de oligosacáridos postraduccionales en estas hormonas determina sus propiedades y funciones (Lambert *et al*; 1988). Los oligosacáridos en la LH contendrán un residuo N-acetilglucosamina y se unirá a un grupo amida de una asparagina (Asn). El plegamiento de la proteína, el ensamblaje de las

subunidades α/β , la maduración conformacional y secreción del heterodímero, la tasa metabólica, la afinidad de unión a su receptor y la capacidad de la hormona para activar a su receptor de manera eficiente e inducir una señal intracelular, está determinada por el tipo y proporción de las isoformas de las gonadotropinas (Vitt *et al*; 1998, Pérez y Apfelbaum; 1996). El patrón de distribución de las isoformas es regulada por hormonas como GnRH, el estradiol y la progesterona, estas hormonas participan en la regulación de la cantidad relativa de la LH y FSH en la hipófisis y en suero de rumiantes.

Mediante el uso del cromatofoco el polimorfismo de las gonadotropinas se ha identificado en primates no humanos (Chappel *et al*; 1984), caballos (Matteri and Papkoff; 1987), roedores (Ulloa-Aguirre *et al*; 1988), cerdos (Nomura *et al*; 1989), aves (Krishnan *et al.*, 1994), humanos (Ulloa-Aguirre *et al*; 1995), bovinos (Perera-Marín *et al*; 2005), ovinos (Arrieta *et al*; 2006) y caprinos (Rojas-Maya *et al* 2007).

3.3 Control de la secreción de GnRH

La función fundamental de GnRH, es la inducción de la secreción de las gonadotropinas. Sin embargo, se cuestiona si solamente GnRH o la combinación con otras hormonas y/o factores puede también regular la síntesis de la LH y de FSH. La LH se almacena en gránulos y su liberación es regulada por GnRH. La FSH se libera principalmente a través de una vía constitutiva (Farworth; 1995, McNeilly *et al*; 2003). La inhibina previene la “up regulation” de los receptores por

bloquear la estimulación de la síntesis de receptor GnRH producida por la misma hormona, mientras que la activina estimula la síntesis del receptor a GnRH, en cultivo de células hipofisiarias.(Prieto-Gómez y Velázquez-Paniagua)

La Gametogénesis y la esteroidogénesis, son altamente dependientes de la secreción pulsátil de la GnRH hipotalámica, que se une con alta afinidad a receptores presentes en la superficie del gonadotropo, el receptor mamífero de GnRH tiene una estructura heptahelical clásica acoplado a proteínas G, sin embargo, una característica única, la carencia de la porción terminal C, por

consiguiente, no desensibiliza en el estricto sentido, y lo internaliza pobremente (McArdle *et al*; 2002).

GnRH afecta el gen de su mismo receptor y a un número de genes adicionales que incluyen alguno implicado en la señalización celular y la regulación auto-paracrina. GnRH es liberada de forma pulsátil, la frecuencia de pulsos varia, regulando la biosíntesis y secreción de las gonadotropinas en la hipófisis anterior. En fase folicular, la pulsatilidad de la GnRH/LH es de 1 pico/h y culmina en el pico preovulatorio en vacas. En fase lútea la LH es secretada con menor frecuencia (1 pico/4 h en la vaca), generando pulsos de mayor amplitud (Nett *et al*; 2002).

Los receptores de GnRH en mamíferos tienen características especiales que influyen en la investigación de este decapeptido. La secuencia de aminoácidos de los receptores de la GnRH se dedujo en un principio en el ratón, clonado a partir de la línea celular pituitaria α T3, se han descrito dos tipos de receptores de GnRH en mamíferos: tipo I y tipo II, GnRH I regula la secreción de gonadotropinas y GnRH II es un neuromodulador y estimula el desarrollo sexual (Millar; 2005).

3.3.1 Estradiol, secreción de GnRH e isoformas de las gonadotropinas.

Los estrógenos regulan la producción y secreción de las gonadotropinas en los animales domésticos. Estradiol es un importante regulador en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, provoca un aumento en el número de receptores para GnRH en la pituitaria y se requiere tanto la transcripción de mRNA como la síntesis de proteínas. Se estudió en borregas la administración aguda de estradiol, provocando un pico similar al preovulatorio de LH (Greg *et al*; 1990). Involucra dos fases, a corto plazo de 4 a 6 horas, que consiste en la síntesis y generación de receptores de GnRH en la membrana del gonadotropo y la segunda que incluye la secreción de la GnRH por el hipotálamo 12 a 15 h después (Moenter *et al*; 1991).

El pico pre-ovulatorio inducido por estradiol se da por un incremento en la sensibilidad de la pituitaria a GnRH, provocando un incremento en la liberación

de GnRH y una descarga masiva de LH por el gonadotropo, necesaria para la inducción de la ovulación (Nett *et al*; 2002). Este efecto de estradiol probablemente juega un papel importante en el aumento de la sensibilidad de la hipófisis a GnRH antes del pico preovulatorio de LH (Gregg *et al*; 1990). Estradiol regula la expresión del ARNm que codifica para las subunidades α y β de LH, modifica la síntesis y regulación de GnRH y regula el proceso de glicosilación de las gonadotropinas (De Gregorio *et al* 1995). El sistema KiSS-1/GPR54 es un sistema ligando-receptor, en el que se ha encontrado una estrecha correlación entre los niveles circulantes de gonadotropinas y la expresión de KiSS-1 en el núcleo arcuato, lo que sugiere que éste es un elemento clave en la retroalimentación negativa de la secreción de LH y FSH por esteroides gonadales. KISS-1 se expresa y es regulado por los esteroides sexuales, activa directamente a las neuronas productoras de GnRH, para inducir la secreción de GnRH y una potente liberación de gonadotropinas (Tena-Sempere; 2005). La participación del estradiol en la heterogeneidad de las gonadotropinas se ha mencionado en bovinos que aumenta las isoformas ácidas de LH (Stumpf *et al*; 1992).

3.3.2 Progesterona, secreción de GnRH e isoformas de las gonadotropinas

La Progesterona es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, es secretada por el cuerpo lúteo después de la ovulación. En el hipotálamo, regula la liberación pulsátil de la GnRH (Niswender *et al* 2000). La progesterona modula la frecuencia de pulsos de GnRH, y evita una segunda oleada de LH y los subsecuentes picos. La progesterona en adenohipófisis disminuye la síntesis de receptores a GnRH (Chabbert-Buffet 2000). La Progesterona disminuye la expresión de los genes que codifican para la subunidad α común de todas las glicoproteínas y de la subunidad LH β , además reduce el ARNm para las diferentes subunidades al modificar la estabilidad del ARNm, al eliminar su cadena polyA. (De Gregorio *et al* 1995) (Wu y Miller 1991). Progesterona reduce la expresión del ARNm para los receptores de la GnRH, Estradiol y Progesterona. Perera-Marín *et al*. (2006), analizando la cantidad

relativa de las isoformas de las gonadotropinas en la hipófisis anterior de bovinos, en vaquillas no ovariectomizadas encontraron una alta proporción de isoformas básicas de la LH, mientras que la proporción de las isoformas ácidas de la FSH en vaquillas ovariointactas se incrementaron en la fase lútea del ciclo estral, en tanto que las isoformas neutras disminuyeron. Esta proporción observada en vaquillas en la fase lútea del ciclo estral, fue similar a la proporción de isoformas de la LH presente en el suero de humanos en la fase lútea del ciclo menstrual (Anobile et al 1998). Pueden existir otros factores intraováricos aunados a la progesterona, que pueden estar involucrados en la regulación de las isoformas de las gonadotropinas y su distribución durante la fase lútea del ciclo estral (Perera et al 2007).

3.4 Administración prolongada de un agonista de GnRH

Altas dosis de un agonista natural de GnRH desensibiliza al gonadotropo y resulta en un decremento de la LH y FSH y disminución de la función ovárica y testicular. (Millar; 2005). Este mecanismo de una posible desensibilización se ha estudiado en ratas (Horvat et al; 2002), en niñas y niños prepúberes (Wide et al; 1996), en becerras (Gong et al; 1996, Madgwicka et al; 2005), cerdas (Schneider y Brüssow 2006), toros jóvenes (Bergfeld et al; 1996) y ovejas prenatales (Brooks et al; 1996). La respuesta de la LH al desafío de GnRH es la mejor prueba para mostrar la desensibilización de la pituitaria por un agonista de GnRH (Scheele et al 1996).

Los atributos del efecto de autoestimulación de la GnRH sobre sus receptores en el gonadotropo sólo se expresan en la periodicidad fisiológica de (60 a 90 min.) a través de la regulación positiva de los receptores de GnRH, una frecuencia más alta o la exposición constante a GnRH induce respuestas refractarias a la LH que conduce a una regulación negativa (Yen et al 2001).

En este estudio se analiza si desensibilización de la pituitaria por una administración prolongada de una agonista de GnRH en la vaca gestante tiene repercusión en la heterogeneidad de las gonadotropinas del becerro.

3.5 Administración prolongada de GnRH durante la vida embrionaria.

La administración prolongada de GnRH en la madre durante las fases tempranas del embarazo en humanos (6-8 semanas), al parecer no afecta al embrión ni la organogénesis, llevándose a término todos los embarazos (Taskin *et al*; 1999). Sin embargo, fetos ovinos con implante biodegradable subcutáneo que secretó de manera continua GnRH produjo desensibilización de los gonadotropos pero no provee evidencia suficiente del papel de la secreción gonadotrópica sobre el desarrollo gonadal en esta etapa fetal (Brooks y McNeilly; 1992).

Un momento crítico para la pituitaria anterior, es la formación de la bolsa de Rathke. Durante ese tiempo, el primordio ectodermal de los lóbulos anterior e intermedio de la pituitaria hacen contacto con el neuroectodermo del diencefalo, las interacciones entre estos tejidos son necesarias para su desarrollo (Treier y Rosenfeld; 1996). En los fetos humanos las estructuras rudimentarias de la glándula hipófisis ya son evidentes en la 4ª o 5ª semanas de vida y el sistema hipotalámico-hipofisiario sufre una diferenciación hacia una capacitación para su función endocrina. Las hormonas gonadotrópicas: hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son producidas en la adenohipófisis a las cinco semanas de gestación en el humano, así como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida por el hipotálamo. Pero la acción de GnRH sobre la adenohipófisis solo puede ocurrir después de la formación de los vasos portales, que comienzan a formarse en la séptima semana de gestación, a través de los cuales la hormona es transportada a la hipófisis (Cummings y Kavlock; 2004).

FSH y LH séricas pueden ser detectadas en el desarrollo fetal, con niveles máximos a mitad de la gestación en humanos. Debido a una retroalimentación por el aumento de estrógenos placentarios durante la segunda mitad del embarazo, niveles fetales de FSH y LH disminuyen durante el tercer trimestre (Cheung y Lustig; 2007). Las gónadas empiezan a producir hormonas en el curso del desarrollo fetal, ocurren interacciones entre los testículos y el eje hipotalámico-hipofisiario a pesar que las células de Leydig en el humano se

diferencian hasta la 7^a y 8^a semana de gestación, comenzando con la producción de andrógenos bajo la regulación de la hormona gonadotrópica coriónica humana (hCG) hasta observarse un pico de testosterona después de las 12 semanas (Cummings y Kavlock; 2004) de tal forma que esta interacción “programa” al hipotálamo del feto y le da el potencial para expresar las características sexuales secundarias en la pubertad y expresarse como un varón en su etapa adulta (Cummings y Kavlock; 2004).

El aumento en esteroides gonadales provoca una supresión de los gonadotrofos hipofisarios, conduciendo a una disminución en la concentración de la LH. Existe ausencia de la actividad de la LH que se mantiene después del nacimiento y hasta aproximadamente 10 semanas de edad, cuando la actividad pulsátil postnatal de la LH es evidente (Rodríguez y Wise; 1989).

3.6 Administración de GnRH e isoformas de las gonadotropinas.

El estado fisiológico y el momento en que se realice el desafío de GnRH determinan la proporción de isoformas de las gonadotropinas en la pituitaria y en la circulación.

Durante la administración de una dosis de 100 µg de GnRH, durante la fase lútea, predominan las isoformas básicas en la pituitaria de ovinos (Arrieta *et al*; 2006). Sin embargo, en humanos, la infusión de GnRH incrementa la proporción de las isoformas básicas de la LH en el suero (Wide y Bakos; 1993).

En el ovino, la inmunización contra la GnRH disminuye su pulsatilidad y aumenta las isoformas de LH básicas en la pituitaria (Zalesky *et al*; 1993). GnRH pueden inducir cambios no sólo en cantidad (mayor número de moléculas), sino también en la calidad (moléculas más glucosiladas) de LH secretada por actuar directamente en la traducción y la glicosilación a nivel distal (Perez y Apfelbaum; 1996).

El efecto agudo de la GnRH parece no inducir síntesis *de novo* de LH y únicamente participa en la liberación de la LH presente en los gránulos de

secreción del gonadotropo. Se especula que la LH presente en pituitaria y suero, en las diferentes condiciones fisiológicas, es regulada en parte por la pulsatilidad de la GnRH. (Perera-Marin *et al*; 2005).

4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y manejo

Todos los procedimientos experimentales fueron autorizados por el CICUAE-FMVZ-UNAM.

Tratamiento de las vacas durante la gestación

Doce vacas con aproximadamente 90 días de gestación, en pastoreo rotacional intensivo con pasto estrella de Santo domingo (*Cynodon nlemfuensis*), sales minerales y agua *add libitum*, con un ordeño al día por las mañanas fueron seleccionadas. A 6 vacas se le administró 2.5 µg/h de un agonista de GnRH (Acetato de Buserelín Ltd ®, Hoechst Marion Roussel) en forma continua por medio de bombas osmóticas (2 ML4 ALZET®), las cuales contenían 2 ml de Acetato de Buserelín a una concentración de 15.75 mg/ml. La bomba se colocó subcutáneamente. Para insertarla se insensibilizó el área detrás de la escápula infiltrando 4 ml de lidocaína, se rasuró, lavó y embrocó con antiséptico el área. Se hizo una incisión de aproximadamente 5 cm en la piel del animal, se separó piel de tejido conectivo para crear un espacio y poder depositar la bomba, se introdujo la bomba y finalmente se suturó piel con 2 puntos separados. La bomba fue reemplazada cada 28 días para mantener la liberación continua hasta su retiro inmediatamente después del parto.

Tratamiento a los becerros.

Se utilizaron 12 becerros nacidos de vacas F1 cruce cebú x Holstein, se dividieron en dos grupos: el control (Ctrl) lo conformaron 6 becerros nacidos de vacas sin tratamiento y el grupo con tratamiento (TX) integrado por 6 becerros nacidos de vacas tratadas con el agonista de GnRH.

Evaluación de la respuesta aguda de la pituitaria y toma de muestras sanguíneas

Canulación venosa:

A los 12 becerros con 8 semanas de edad se les rasuró y embrocó el cuello en la región de la yugular y se les colocó un catéter endovenoso del número 20. Se administró una inyección intravenosa de 10 µg de GnRH (Gonadorelin) para evaluar la respuesta de la pituitaria. Se colectaron 5 ml de sangre en tubos vacutainer con 200µl de citrato de sodio (0.35g/ml) dos veces antes de la primera inyección de GnRH (-15 y 0 minutos), y a los 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 minutos posteriores a la inyección de GnRH. Una segunda inyección de GnRH se realizó a los 180 minutos posteriores a la primera inyección con 100 µg de GnRH (Gong *et al*; 1996). Continuaron las muestras a los 190, 200, 210, 225, 240, 255 y 270 minutos después de la primera inyección de GnRH.

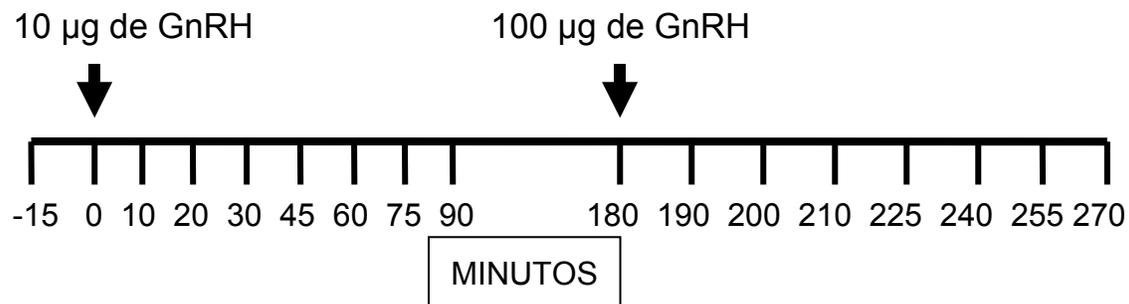


Figura 1. Esquema de la administración de GnRH y muestreo sanguíneo.

Eutanasia de becerros, colección de pituitarias y procesamiento

Al terminar el segundo desafío de GnRH los becerros de cada grupo se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico. Se confirmó la muerte e inmediatamente después se removieron las cabezas, se abrieron los cráneos y se colectaron las pituitarias de 6 becerros, 3 del grupo TX y 3 del grupo Ctrl. La mitad de cada hipófisis se almacenó a -70°C.

Preparación de las pituitarias

Se disecaron las hipófisis separándolas del tejido adyacente y se pesaron. La mitad de cada lóbulo anterior se homogeneizó en una solución amortiguadora que contenía: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM ajustado a pH de 7.2 (1ml/100 mg de tejido), que contenía 1 mM fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF). El extracto hipofisiario homogeneizado fue centrifugado, el sobrenadante obtenido se dializó en membranas sintéticas a 4°C con el fin de excluir péptidos menores a 12 kDa. Se mantuvieron en agua desionizada con agitación constante durante 24h, realizando 3 cambios del agua desionizada y después en bicarbonato de amonio al 1% a un pH de 7.5 por 48 h, realizando 3 veces al día cambio del bicarbonato de amonio. Finalmente se liofilizaron para su posterior análisis por cromatoenfoco (Perera-Marín *et al*; 2005).

Determinación de las isoformas de las gonadotropinas por cromatoenfoco

Se utilizó una columna de vidrio (27cm de largo X 0.7cm de diámetro interno) que contenía resina PBE-118 polibuffer, equilibrada con trietilamina-HCl desgasificada (25 mM, pH 11.0 a 4°C). Se preparó Pharmalyte a una dilución de 1:45 con agua desionizada, ajustada a pH 7 y desgasificada. La muestra liofilizada se mezcló con 1.5 ml de Pharmalyte, se centrifugó y separó el sobrenadante. Para colocar la muestra en la columna, primero se depositaron 3 ml de Pharmalyte para evitar la exposición de la muestra a un pH extremo. Una vez comenzada la elución de las proteínas, se añadió el sobrenadante de la muestra mezclada con Pharmalyte de cada extracto hipofisiario en su respectiva columna. La velocidad de elución se controló con un colector que permitía 52 gotas por tubo. Al llegar a un pH de 7.0 y estabilizarse, aproximadamente en la fracción 70, se cambia el buffer por Polybuffer 74, diluido con agua desionizada 1:8 ajustado a un pH de 3.5 con HCl 5N. Se continuó la elución hasta que se estabilizó a pH 3.5, esto ocurrió aproximadamente en la fracción 120. Finalmente se eluyeron el resto de las proteínas que pudieron quedar en la resina con NaCl 1.0 M hasta la fracción 150. Determinamos el pH de las 150 fracciones y se

neutralizaron para el radioinmunoensayo de la LH. A las primeras 70 fracciones colectadas con pharmalyte a pH 7.0 se les agregaron 200µl de una solución Tris-HCl 1.1M, pH 7.4 y a las 80 fracciones restantes 200µl de imidazol 1.1M, pH 7 (Perera-Marín *et al*; 2005).

Radioinmunoensayo para la LH de las fracciones del cromatofoque

A cada fracción se le determinó la concentración de la LH. A cada tubo se le agregó un volumen variable de la muestra de acuerdo a la concentración de LH encontrada en estudios anteriores (Perera-Marín *et al*; 2005) : 100 µl de las fracciones 1-10, 5 µl de la 11-18, 10 µl de una dilución 1/100 de las fracciones 19 y 20, 10 µl de una dilución 1/1000 de las fracciones 21-28, 10 µl de una dilución 1/100 de las fracciones 29-41, 10 µl de las fracciones 42-60, 50 µl de las fracciones 61-74, 5 µl de las fracciones 75-87 y 20 µl de las fracciones 88-150. A cada tubo con muestra se le agregaron 200µl de la dilución del primer anticuerpo anti-oLH-26 1:30000 con suero normal de conejo 1:1600 y se dejó incubar por 24 hr. Posterior a la incubación se agregaron 100µl de trazador (NIDDK-oLH AFP 8614B; 20000 c.p.m. aproximadamente), la reacción se incubó 24 h a 4°C. La separación del Antígeno-Anticuerpo fue con la adición de 200 µl de suero de burro anti Ig de conejo (2° Anticuerpo) 1:80, e incubación 24 h a 4°C. Finalmente se adicionó 1ml de solución salina fosfatada-Albumina sérica bovina al 0.1% (PBS-BSA) y se centrifugó 15 minutos a 1500 g a 4 °C. La sensibilidad del ensayo fue de 0.1 ng por tubo con un coeficiente de variación intra e inter ensayo de 5.25% y 8.80% respectivamente (Perera-Marín *et al*; 2005, Arrieta *et al*; 2006).

Radioinmunoensayo para LH de las muestras de plasma

A cada tubo con 100 µl de muestra se le agregaron 100 µl del primer Anticuerpo (NIDDK-conejo anti-oLH-1 dilución 1:45,000 en amortiguador de fosfatos con 0.1% de BSA) excepto a las cuentas totales y no específicas, se agitó en un vortex e incubó por 48h a 4°C. Posterior a la incubación se añadieron 100 µl del trazador diluido en amortiguador de fosfatos con 0.1% de BSA (0.05M PBS +

0,1% BSA y el 0,1% de azida sódica, pH 7.4 a 9000-15000 cpm) a todos los tubos, se agitaron en un vortex e incubaron 48h a 4°C. Para preparar el segundo anticuerpo se utilizó suero normal de conejo dilución 1:900 en PBS-BSA, a continuación, se añadió el 2^{do} anticuerpo a dilución 1:128, se agitó en vortex y se añadieron 100 µl a todos los tubos excepto a cuentas totales. Se Incubaron 24 h a 4°C. Después de la incubación se añadió 1 ml de PBS 0.05M a todos los tubos excepto a cuentas totales. Se centrifugó 45 minutos a 3500 rpm. Por último, se retiró el sobrenadante y se contó el pellet resultante en un gamma master (1277 Gammamaster; LKB, Wallace, Stockholm, Sweden). La sensibilidad fue de 0.12ng/mL con un coeficiente intraensayo de 8,8%; e Interensayo de 14.2% (Campbell *et al*; 2000).

Radioinmunoensayo para FSH de las muestras de plasma

Se añadieron 200 µl de muestra a cada tubo, después 50 µl del primer anticuerpo (NIDDK-conejo anti-oFSH-1 dilución 1:16,000 en PBS-BSA 0.1% para una concentración final de 1: 160000) a todos los tubos excepto a uniones no específicas, se agitó en un vortex e incubó por 24h a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se añadieron 100 µl del 2° anticuerpo (suero de burro anti-conejo 1:40 y suero normal de conejo 1:400) e incubación por 48h a 4°C. Luego se añadieron 0.5 ml de PBS a todos los tubos excepto a las cuentas totales. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm a 4°C por 30 min., se retiró el sobrenadante y se contó el pellet resultante en un gamma master (1277 Gammamaster; LKB, Wallace, Stockholm, Sweden). La sensibilidad fue de 0.09 ng/ml con un coeficiente de variación Intraensayo de 5,6% (Campbell *et al*; 1990).

Análisis Estadístico

Para definir el pico de una isoforma, se tomó en cuenta el aumento de la concentración de LH, que se diera 3 fracciones consecutivas y por arriba de dos desviaciones estándar encima de la concentración media. Las isoformas de la LH se agruparon por pH en: básicas ($\text{pH} \geq 7,5$), neutras ($\text{pH } 7,4-6,5$) y ácidas ($\text{pH} \leq 6,4$), para encontrar diferencia en la proporción de isoformas básicas, neutras y ácidas se realizó una prueba de Ji cuadrada y después se agruparon en 5 rangos de pH de elución ($\text{pH} \geq 9.9-9.0$, $8.99-8.0$, $7.99-7.0$, $6.99-6.0$ y $5.99-5.0$), se obtuvo la proporción de isoformas y se buscaron diferencias, se realizó un prueba de t por isoforma y rango de pH entre grupos, Las concentraciones plasmáticas de la LH y FSH se analizaron con análisis de varianza de muestras repetidas. Se utilizó el software estadístico SAS® para todos los análisis.

5.0 RESULTADOS

ISOFORMAS DE LH EN LA PITUITARIA

Las isoformas de la LH en la pituitaria se clasificaron de acuerdo a su pH de elución, 6 isoformas básicas de LH, $\text{pH} \geq 7.5$, 2 isoformas neutras, $\text{pH} 7.4-6.5$ y 2 isoformas ácidas, $\text{pH} \leq 6.4$ (Figura 2).

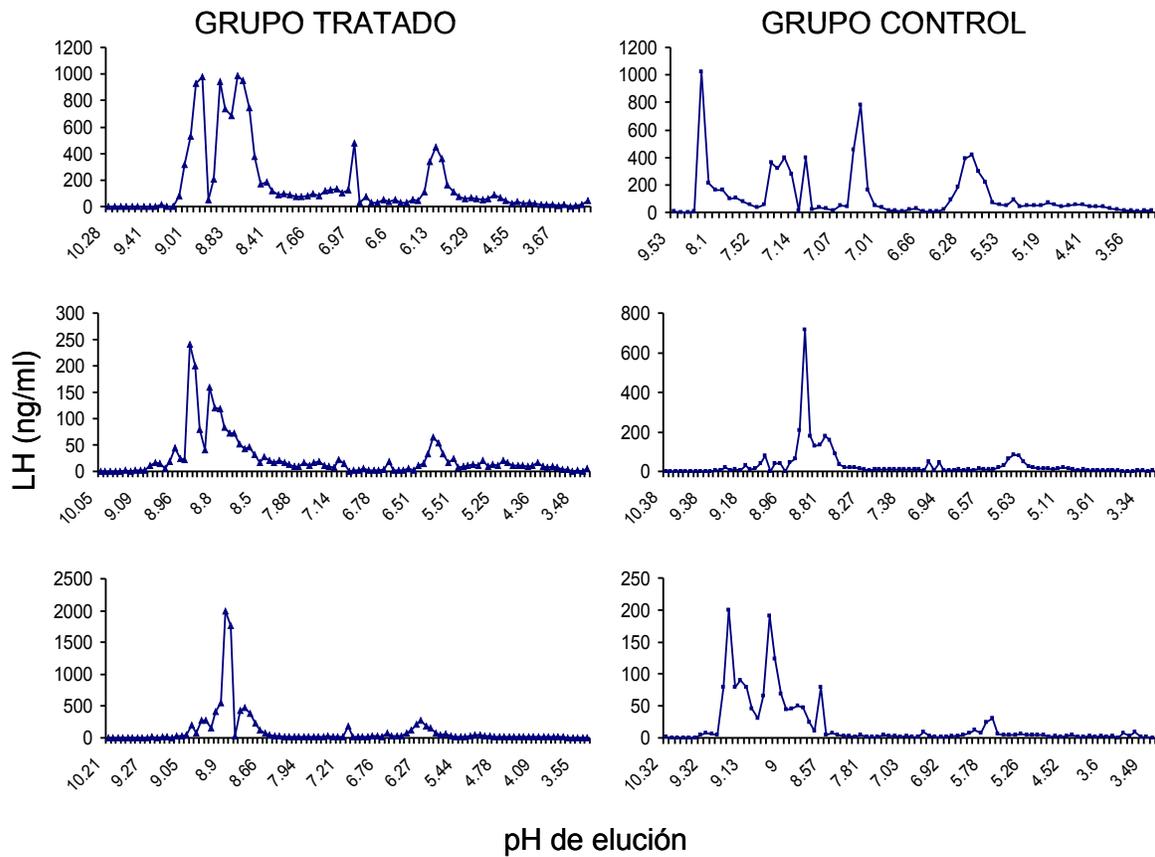


Figura 2. Concentración de LH en eluidos de extracto pituitario, de acuerdo al punto isoeléctrico de la isoforma, presentes en la pituitaria de becerros nacidos de madres desensibilizadas con GnRH (grupo tratado) y becerros nacidos de madres no desensibilizadas (grupo control).

La distribución de las isoformas básicas, neutras y ácidas de las gonadotropinas difiere ($P=0.005$). Dos isoformas básicas eluyeron en el rango de pH 9.05-9.16 y 4 en el rango de 8.39-8.97, representando para el grupo TX 84% de las isoformas y 68% para el grupo Ctrl (Figura 3). Se encontró diferencia estadística solo en la proporción de la isoforma 8.91 ($P=0.017$), siendo mayor en el grupo TX. Dos isoformas neutras entre el rango de pH de 7.04-7.37, representaron el 3% para el grupo TX con sólo un dato y 15.7% para el grupo Ctrl con dos datos. (Figura 3), por lo que no resulta factible comparar entre grupos. Finalmente, dos isoformas ácidas de LH en el rango de 5.30-6.15, representando el 13% para el grupo TX y 16.3% para el grupo Ctrl (Figura 3). Se encontró diferencia estadística solo en la proporción de la isoforma 6.15 ($P=0.009$), siendo menor en el grupo Tratado.

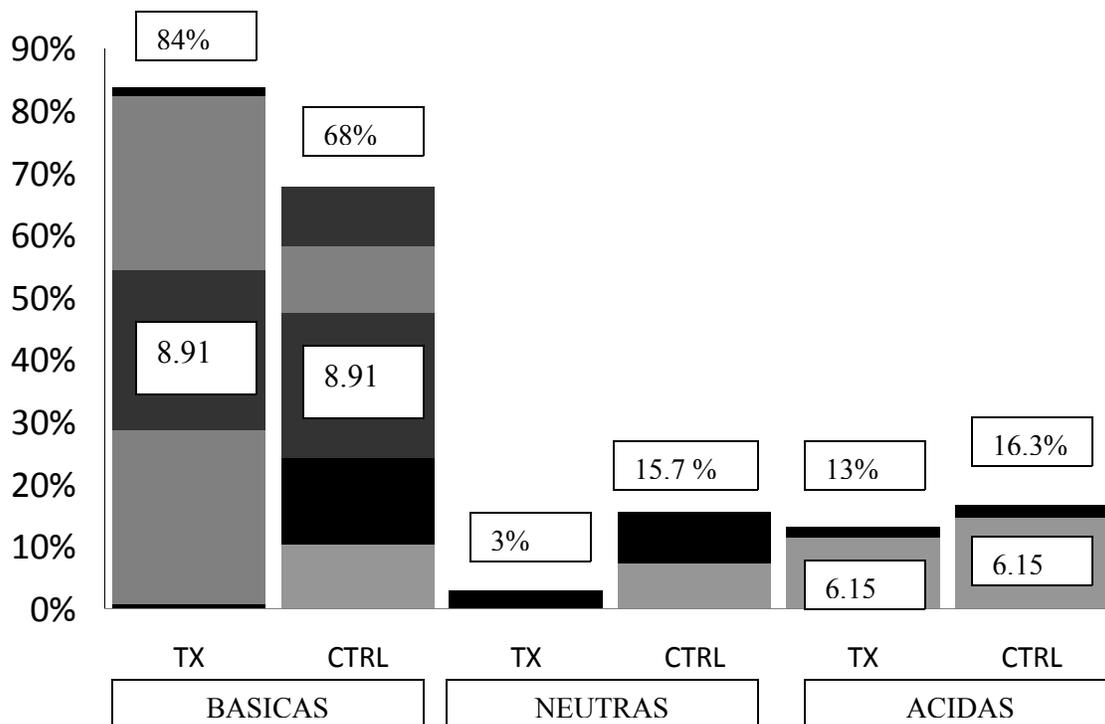


Figura 3. Porcentaje de isoformas básicas, neutras y ácidas en la pituitaria de becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH y becerros controles, nacidos de madres no desensibilizadas a GnRH.

Isoformas de la LH agrupadas por unidad de pH en la pituitaria

Al agrupar las isoformas por unidad de pH en rangos que fueron de 9-9.99, 8-8.99, 7-7.99, 6-6.99 y 5-5.99 (Cuadro 1), la proporción y concentración de las isoformas de pH 9-9.99 en el grupo TX fue del 1% (500 ng/g) y en el grupo Ctrl del 24.3% (9040 ng/g), las isoformas de pH 8-8.99 en el grupo TX una proporción del 83% (277815 ng/gr.) y en el grupo Ctrl el 43.6% (43690 ng/gr.), en el rango de 7-7.99 en el grupo TX fue del 3% (8820 ng/gr) y en el grupo Ctrl del 15.5% (30798 ng/gr), en el rango de 6-6.99 en el grupo TX fue del 11.5% (32620 ng/g), en el grupo Ctrl el 14.6% (21261 ng/gr) y en el rango de 5-5.99 en el grupo TX fue del 1.5% (3060 ng/gr) y en el grupo Ctrl el 2% (685 ng/g), La proporción de las isoformas en los rangos de 8-8.99 (P=0.004) fue mayor y 6-6.99 (P=0.008) fue menor en el grupo TX que en el grupo Ctrl (Cuadro 1).

	Grupo tratado		Grupo control	
Rango (PH)	∑ LH ng/g.	LH%	∑ LH ng/g.	LH%
9 - 9.99	500	1	9040	24.3
8 - 8.99	277815	83*	43690	43.6*
7 - 7.99	8820.8	3[!]	30798	15.5
6 - 6.99	32620	11.5*	21261	14.6*
5 - 5.99	3060	1.5	685	2
TOTAL	322815.8	100	105474.0	100

* **Diferencia = (P≤0.05)**

[!] **Solo un dato**

Cuadro 1. Concentración y proporción de Isoformas de la LH agrupados por unidad de pH, presentes en la pituitaria becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH (grupo tratado) y becerros nacidos de madres no desensibilizadas a GnRH (grupo control).

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LA LH EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO AGUDO CON GnRH NATURAL

Después de la administración de 10µg de GnRH, en ambos grupos los niveles de LH en plasma aumentaron sin diferencia entre grupos (P≥0.05) (Figura 4). La

respuesta a la inyección de 100 µg de GnRH, 180 minutos después de la primera aplicación aumentó los niveles de la LH en plasma, de manera similar en ambos grupos ($P \geq 0.05$) (Figura 4). Los niveles basales de la LH después de la inyección con 10 µg y 100 µg de GnRH aumentaron en ambos grupos, sin embargo la amplitud de la curva en ambos grupos no fue diferente ($P \geq 0.05$) (Figura 4).

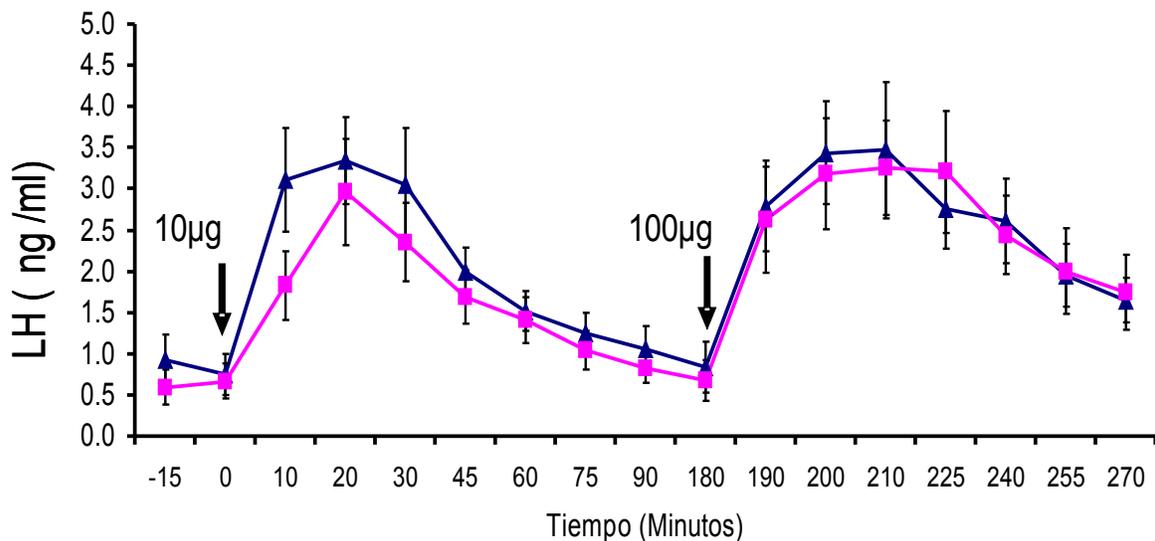


Figura 4. Concentración plasmática de LH en respuesta a la aplicación de 10 y 100 µg de GnRH en becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH, grupo tratado (▲) y grupo control (■).

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE LA FSH EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO AGUDO CON GnRH NATURAL

La respuesta a los 90 minutos posteriores a la administración de 10µg de GnRH en ambos grupos no fue diferente ($P > 0.05$) (Figura 5). Sin embargo, la respuesta

a 100 µg de GnRH a los 270 minutos posteriores a la primera inyección fue diferente entre grupos ($P \leq 0.05$), siendo de 0.32 ± 0.07 ng/ml en el grupo TX y 0.54 ± 0.04 ng/ml en el grupo Ctrl (Figura 5).

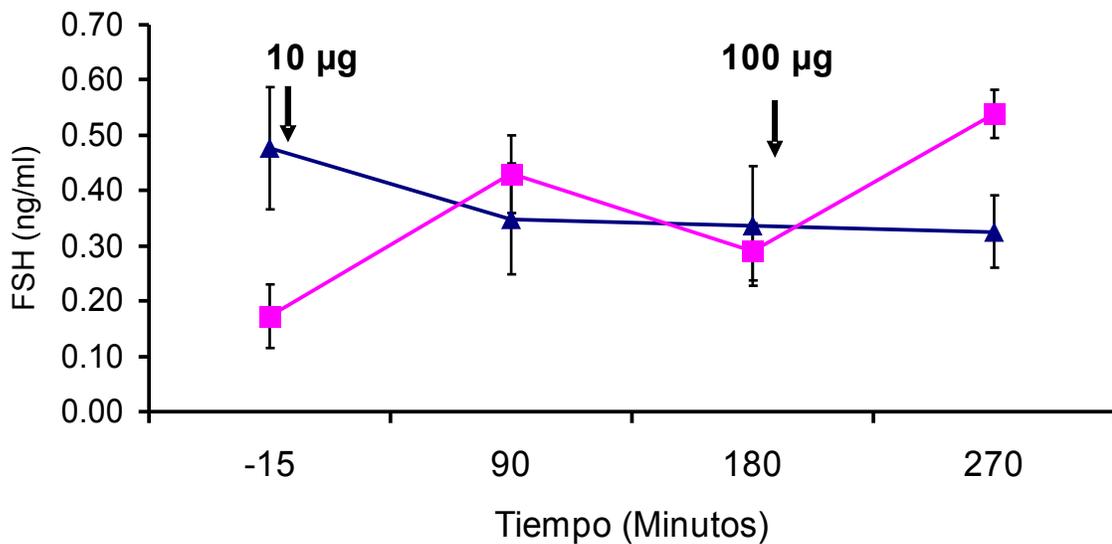


Figura 5. Concentración plasmática de FSH (ng/ml) en respuesta a la aplicación de 10 y 100 µg de GnRH en becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH, grupo tratado (▲) y grupo control (■).

6.0 DISCUSIÓN

Este estudio muestra que el tratamiento crónico con GnRH en la vaca gestante entre el día 90 de gestación y el parto no afecta el funcionamiento de la pituitaria

de los becerros. La secreción de LH en respuesta al estímulo de GnRH en becerros no se ve afectada, sin embargo la respuesta de FSH se ve disminuida por el estímulo consecutivo de GnRH en becerros de vacas tratadas crónicamente con el agonista de GnRH. La distribución de las isoformas de LH en la pituitaria de los becerros nacidos de madres tratadas con GnRH se modificó aumentando la cantidad de isoformas básicas.

Administración de GnRH y el desarrollo embrionario de la pituitaria

El funcionamiento de la pituitaria del becerro no se ve afectado por el tratamiento crónico con GnRH en la vaca gestante desde el día 90 hasta el parto. Los factores ambientales pueden influir en el desarrollo del feto, la pituitaria, salud y productividad en vida adulta humana o animal, ocasionando cambios en la estructura y/o la fisiología del cerebro y cambios en el eje hipotálamo-pituitaria y perfiles endocrinos alterados (Rhind *et al* 2003).

La formación de la bolsa de Rathke es un momento crítico para la pituitaria anterior (Treier y Rosenfeld; 1996). En los fetos humanos estructuras rudimentarias de la glándula hipófisis son evidentes en la 4ª o 5ª semanas de vida y el sistema hipotalámico-hipofisiario sufre una diferenciación hacia una capacitación para su función endocrina.

Las hormonas gonadotópicas: hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) son producidas en la adenohipófisis a las cinco semanas de gestación en el humano, así como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida por el hipotálamo. Pero la acción efectiva de GnRH sobre la adenohipófisis solo puede ocurrir después de la formación de los vasos portales, que inicia en la séptima semana de vida, a través de los cuales la hormona es transportada a la hipófisis (Cummings y Kavlock; 2004).

La administración de GnRH en la vaca gestante se realizó al día 90 de gestación, una vez terminada la organogénesis y la diferenciación sexual. En bovinos la organogénesis termina el día 45 de gestación, la masculinización comienza el día 45 y termina el día 70 (Hamernik *et al*; 1987). La repercusión que puede tener este tipo de tratamientos se han reportado en humanos, en los

que la administración de GnRH fue durante la gestación temprana, llevándose a término la mayoría de las gestaciones.

Taskin y *col* (1999) reportan que la administración prolongada de GnRH a la madre durante las fases tempranas del embarazo en humanos (6-8 semanas), al parecer no afecta al embrión ni la organogénesis, llevándose a término todos los embarazos. Sin embargo fetos ovinos con implante biodegradable subcutáneo, que secretó de manera continua GnRH, produjo desensibilización de los gonadotropos pero no provee evidencia suficiente del papel de la secreción gonadotrópica en el desarrollo gonadal durante esa etapa fetal (Brooks y McNeilly; 1992).

La administración prolongada de un agonista de GnRH en la madre no afecta el mantenimiento de la gestación, no resulta embriotóxico, administrado antes o después de la organogénesis no tiene repercusiones al nacimiento, ni afecta el desarrollo gonadal. Lahat y *col* en 1999 reportaron casos de niños que nacieron después de la administración prolongada con un agonista de GnRH durante las primeras semanas de gestación, naciendo un niño con malformación congénita y cuatro niños que demostraron anomalías en el neurodesarrollo. Las becerras y el becerro nacidos de madres desensibilizadas a GnRH desde el día 90 de gestación hasta el parto al parecer no tuvieron efectos adversos en el desarrollo gonadal. Las gonadotropinas fetales al final de la gestación determinan el desarrollo testicular y la cantidad de células de sertoli, que repercutirán en la vida reproductiva adulta (Brooks y Thomas 1995).

La pituitaria ya desarrollada y funcional puede desensibilizarse durante la gestación, como ya se ha mostrado por Brooks y *col* (1996) cuando se administra GnRH directamente al feto, sin embargo la pituitaria de vacas gestantes se ha logrado desensibilizar (Toriz; 2008) y se observó el efecto de dicha desensibilización en las crías después del nacimiento, sin tener repercusiones evidentes en la formación y desarrollo de la pituitaria.

Respuesta de la pituitaria

En este estudio, los becerros nacidos de madres desensibilizadas a GnRH, una vez retirado el estímulo de GnRH por parte de la madre, se muestra un retorno a sensibilizar la pituitaria de los becerros, mostrando respuesta a la administración de GnRH natural, no encontrándose diferencias en la respuesta de LH en ambos grupos. La respuesta de la LH a los agonistas de GnRH es consistente y predecible y reversible. Al principio existirá un aumento en las concentraciones de la LH e irán decreciendo conforme se mantenga el estímulo constante del agonista de GnRH. Dosis repetidas de un agonista natural de GnRH desensibilizan al gonadotropo y resulta en un decremento de la LH y FSH y disminución de la función ovárica y testicular (Millar; 2005). La respuesta de la LH al desafío de GnRH muestra la desensibilización de la pituitaria mediante un agonista de GnRH (Scheele *et al*; 1996).

Dependiendo del sexo, edad y estado fisiológico del animal determinará el retorno a la actividad ovárica y testicular, siendo muy variable el tiempo (Gong *et al*; 1996, Kostanski *et al*; 2001). En el presente experimento, el reto con GnRH natural se realizó a las 8 semanas de edad, no pudiendo comprobarse la desensibilización. Tal vez un momento ideal bajo estas condiciones de tratamiento resultaría al nacimiento de los becerros. El pico de la LH en respuesta a LHRH en toros tratados previamente con deslorelin aumentó al día 12 y después continuó siendo constante al día 20 después del cese del tratamiento (Bergfeld *et al*; 1996). Vacas con tratamiento prolongado con GnRH mostraron estro aproximadamente a los 22 días del cese del tratamiento. (D'Occhio *et al*; 1995). En becerras en las que se estudio el desarrollo folicular y dependencia de las gonadotropinas, al cese del tratamiento continuo con GnRH, mostraron celo, entre 8 y 11 días después del término del tratamiento (Gong *et al*; 1996).

La respuesta de la FSH al estímulo de 100 μ g después del cese del estímulo *in utero* del agonista de GnRH, parece mostrarnos una posible desensibilización de la pituitaria, al ser menor la respuesta del grupo tratado. Al existir un continuo estímulo de la síntesis y liberación de la FSH y al recibir un estímulo a dosis bajas de GnRH (10 μ g) se obtiene un respuesta y se libera la FSH sintetizada, al

ser su liberación constitutiva y recibir dosis altas (100µg), la respuesta es menor en becerros con estímulo previo *in utero* con un agonista de GnRH. Se cuestiona si solamente GnRH o la combinación con otras hormonas y/o factores puede también regular la síntesis de la FSH, tanto la biosíntesis y la secreción de estas hormonas. La LH se almacena en gránulos y su liberación es regulada por GnRH. La FSH se libera principalmente a través de una vía constitutiva (Farworth; 1995, McNeilly *et al*; 2003).

La secreción de FSH parece estar regulada por un doble mecanismo, un mecanismo de control basal (constitutiva) y el otro un pulsátil (regulada). Una parte sustancial de FSH circulante refleja la secreción constitutiva y no depende de inmediato estímulo de secreción. Activina, inhibina y follistatina no solo se producen en las gónadas, sino también en la pituitaria y, por tanto, tienen el potencial para ejercer efectos locales moduladores en la secreción de FSH (Padmanabhan y McNeilly; 2001). La transcripción del gen que codifica para la subunidad beta de la FSH es mayor cuando los gonadotropos son estimulados con pulsos de GnRH de baja frecuencia que con pulsos de alta frecuencia. En ovejas adultas ovariectomizadas inmunizadas contra GnRH, la secreción pulsátil de LH se suprimió completamente, mientras que la secreción de FSH se redujo parcialmente. La administración posterior de un análogo de GnRH restauró los pulsos de LH pero no las concentraciones de FSH, y dependiendo de la frecuencia de estimulación aumentó la concentración de FSH en los gonadotropos (Molter-Gerard *et al*; 1999), lo cual reafirma el concepto de la regulación diferencial de la LH y FSH basada en la frecuencia de estimulación (Recabarren *et al*; 2006).

Proporción de isoformas de LH en la pituitaria

La proporción y tipo de isoformas de la LH en la pituitaria de los becerros se vio afectada por el tratamiento crónico con GnRH en la vaca gestante. El tratamiento crónico con GnRH en la vaca gestante, altera la proporción de isoformas básicas en la pituitaria de los becerros, aumentando las isoformas básicas (pH 8-8.99), lo que nos muestra que tuvo efecto el estímulo previo *in utero*, y a mayor estímulo con GnRH puede aumentar la proporción de isoformas básicas en la pituitaria. En niños prepúberes hay mayor concentración de isoformas básicas de la LH y FSH al inicio de la pubertad, cambiando drásticamente a más ácidas conforme avanza la pubertad en niños (Phillips *et al*; 1997).

Después del estímulo con GnRH natural se ha demostrado que predominan las isoformas básicas en niños en desarrollo puberal (Wide y Phillips 1996). Wide y *col* (1996) reportaron que las isoformas básicas en suero de la LH predominan después de una administración prolongada con un agonista de GnRH en niños prepúberes.

La proporción de isoformas básicas predominan en la pituitaria dependiendo del ambiente endocrino, edad y sexo del animal. Se muestra menor proporción de isoformas ácidas (pH 6-6.99) en el grupo TX. Mayores concentraciones de estradiol circulante se han asociado con un mayor porcentaje de isoformas LH-ácidas y FSH-básicas en la glándula pituitaria. La disminución en la concentración de estradiol circulante y la inhibición de GnRH, favorece un aumento en el porcentaje de isoformas LH-básicas y FSH-ácidas (Kojima *et al*; 1995). Estradiol regula la expresión del ARNm que codifica para las subunidades α y β de la LH, modifica la síntesis y regulación de GnRH y regula el proceso de glicosilación de las gonadotropinas (De Gregorio *et al*; 1995), lo que refleja que a menor estímulo con GnRH las isoformas de pH 6-6.99 se muestran en menor proporción en el grupo TX debido al estímulo prolongado *in utero* con un agonista de GnRH.

7.0 CONCLUSIÓN

La desensibilización de la pituitaria mediante un agonista de GnRH en la vaca gestante, aumenta la proporción de isoformas básicas y disminuye las isoformas ácidas en la pituitaria de la cría. Sin embargo, la concentración de LH liberada en respuesta a GnRH no se ve afectada.

8.0 REFERENCIAS

- Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V and Robertson WR. Glycoforms composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Molecular Human Reproduction*, 1998; 4: 631-639.
- Arrieta E, Porrás A, González-Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera-Marín G. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase. *Reproduction and Fertility Development*, 2006; 18: 15-30.
- Baenziger JU and Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988; 947: 287-306.
- Bergfeld EGM, D' Occhio MJ and Kinder JE. Continued desensitization of the pituitary gland in young bulls after treatment with the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone agonist Deslorelin. *Biology of Reproduction*, 1996, 54, 769-775.
- **Brooks AN and McNeilly AS**. Inhibitory effects of a luteinizing-hormone-releasing hormone agonist implant on ovine fetal gonadotrophin secretion and pituitary sensitivity to luteinizing-hormone-releasing hormone. **J. Reprod Fertil., 1992; 96 2: 785-92.**
- Brooks AN, McNeilly AS and Thomas GB. Role of GnRH in the ontogeny and regulation of the fetal hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sheep. J Reprod Fertil Suppl., 1995; 49:163-75.

- Brooks AN and Thomas GB. Ontogeny and function of the pituitary-gonadal axis during fetal development in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 1995; 30: 158-162.
- Brooks AN, Hagan DM, Sheng C, McNeilly AS and Sweeney T. Prenatal gonadotrophins in the sheep *Animal Reproduction Science*, 1996; 42: 471-481.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ and Webb R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, 1995; 49: 335-350.
- Campbell BK, Mann GE and McNeilly AS. Baird DT. The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe *Endocrinology*, 1990; 127: 227-235.
- Chappel SC, Bethea CL and Spies HG. Existence of multiple forms of follicle stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology*, 1984; 115: 452–461.
- Cheung CC and Lustig RH. Pituitary development and physiology. *Pituitary*, 2007; 10:335–350.
- Combarous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reproduction, nutrition, development*, 1988; 28: 211-228.

- Counis R, Laverrièrejn Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoud J, Lerrant Y, Kottler MI and Magre S. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reprod. Nutr.* 2005; 45: 243–254.
- Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A and Bouchard P. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids*, 2000; 65: 613-620.
- Childs GV. Division of labor among gonadotropes. *Vitamins and hormone*, 1994; 50: 215-286.
- Cummings AM and Kavlock RJ. Function of Sexual Glands and Mechanism of Sex Differentiation. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2004; 29: 167-178.
- De Gregorio GB and Nett T. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropins-releasing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 166-172.
- De Leeuw R, Mulders J and Voortman G. Structure–function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Mol Hum. Reprod.*, 1996, 2: 361–369.
- Farworth PG. Gonadotropin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotrope. *J. Endocrinol*, 1995; 145: 387–395.
- Ford JJ and D’Occhio MJ. Differentiation of sexual behaviour in cattle, sheep and swine. *Journal of Animal Science*, 1989; 67: 1816-1823.

- Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, Yamoto M, Fausser BCJM and Boime I. In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. Endocrinology, 1990; 127: 93-100.

- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA and Chin WW. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocrinology Review, 1990; 11: 177-199.

- Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR and Robert Webb. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. Biology of reproduction, 1996; 55: 68-74.

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

- Hamernik DL, McFarland SY, De Avila D, Becker SR and Reeves JJ. Endocrine and body growth traits in heifers exposed to testosterone-propionate during fetal development. Journal of Animal Science, 1987; 64: 1858.

- Horvath JE, Bajo AM, Schally AV, Kovacs M, Francine Herbert and Groot K. Effects of long-term treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist Decapeptyl and the LHRH antagonist Cetrorelix on the levels of pituitary LHRH receptors and their mRNA expression in rats. PNAS November 12, 2002; 99: 23, 15048–15053.

- Kostanski JW, Jiang G, Dani BA, *et al*: Return to fertility after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *BMC Cancer*, 2001; 1: 18.
- Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Roberson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. Effects of 17 beta-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.
- Krishnan KA, Proudman JA and Bahr JM. Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from chicken pituitary gland. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 1994; 108: 253–265.
- Lahat E, Raziel A, Friedler S, Schieber-Kazir M and R. Ron-El. Long-term follow-up of children born after inadvertent administration of a gonadotrophin-releasing hormone agonist in early pregnancy. *Human Reproduction*, 1999; 14, 2656-2660.
- Lambert A, Talbot JA, Anobile CJ and Robertson WR. Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction* 1998; 4: 7: 619–629.
- Matteri RL and Papkoff H. Characterization of equine luteinizing hormone by chromatofocusing. *Biol. Reprod.* 1987; 36: 261–269.
- McArdle CA, Franklin J, Green L and Hislop JN. Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *Journal of Endocrinology*, 2002; 173: 1–11

- McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, and McNeilly JR. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reprod. Suppl.* 2003; 61: 463–467.
- Madgwicka S, Evans ACO and Beard AP. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. *Theriogenology* 2005; 63: 2323–2333.
- Millar PR. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 2005; 88: 5–28.
- Moenter SM, Caraty A, Lacatelli A and Karsch FJ. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 1991; 129: 1175-1182.
- Molter-Gerard C, Fontaine J, Guerin S and Taragnat C. Differential regulation of the gonadotropin storage pattern by gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the ewe. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1224-1230.
- Moore LG, Chie WNG, Hudson NL and McNatty KP. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J. Endocrinol.*, 2000; 165:185–192.
- Nett TM, Turzillo AM, Baratta M and Rispoldi LA. Pituitary effects of steroid hormone on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002; 23: 33-42.
- Niswender GD, Jennifer LJ, Patrick JS, Keith R and Eric WMc. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol.*, 2000; 80: 1–29.

- Nomura K, Ohmura K, Nakamura Y, Horiba N, Shirakura Y, Ujiharam Ohki K, and Shizume K. Porcine luteinizing hormone isoforms: relationship between their molecular structures and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology* 1989;124: 712–719.
- Padmanabhan V and McNeilly AS. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*, 2001; 121: 21–30
- Perez GT and Apfelbaum ME. GnRH-stimulated glycosylation (proximal and distal) of luteinizing hormone by cultured rat pituitary cells. *Neuroendocrinology*, 1996; 64: 6: 456-61.
- Perera-Marín G. Patrón de distribución de isoforms de la hormona luteinizante (LH) intrahipofisaria y sérica en la especie bovina (tesis de doctorado). México, D.F. FMVZ-UNAM, 2003.
- Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernández-Cerón J and González-Padilla E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phase in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science*, 2005; 86: 53-69.
- Perera-Marín G, Murcia C and González-Padilla E. Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science*, 2007; 101: 187 - 207.
- Peters AR, Benboulaid M. Studies on the timing of ovulation after synchronization treatments in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 1998; 33: 313–315.

- Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K and Wide L. Changes In the Isoforms of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone during Puberty In Normal Children Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997; 82: 9.
- Pierce JG and Parsons TF. Glycoprotein hormones structure and function. Annual Review of Biochemistry, 1981; 50: 465-495.
- Prieto-Gómez B, Velázquez-Paniagua M. Monografía Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Rev. Fac. Med. UNAM 2002; 45: 6.
- Recabarren SE, Muñoz P, Lobos A, Vilches C y Parilo J. Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. Arch. Med. Vet. 2006; 38: 1
- Rhind SM, Rae MT and Brooks AN. Environmental influences on the fetus and neonate—timing, mechanisms of action and effects on subsequent adult function Domestic Animal Endocrinology, 2003; 25: 3–11.
- Rojas-Maya S, González-Padilla E, Murcia-Mejía C, Olivares-Segura A, Hernández-Cerón J and Perera-Marín G. Caprine luteinizing hormone isoforms during the follicular phase and anestrus. Animal Reproduction Science, 2007; 100: 280–290.
- Rodriguez RE and Wise ME. Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. Endocrinology, 1989, 124: 248-256.

- Scheele F, Hompes PGA, Lambalk CB, Schoute E, Broekmans FJ and Schoemaker J. The GnRH challenge test: a quantitative measure of pituitary desensitization during GnRH agonist administration. *Clinical Endocrinology*, 1996; 44 (5): 581–586.
- Schneider F and Brüssow KP. Effects of a preovulatory administered depot gonadotrophin-releasing hormone agonist on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in gilts. *Reproduction, Fertility and Development*, 2006; 18: 857–866.
- Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Zalesky DD, Cupp AS, Werth LA, Kojima N, Hejl KL, Kittok RJ, Grotjan HE and Kinder JE. A similar distribution of gonadotropin isohormones is maintained in the pituitary throughout sexual maturation in the heifer. *Biology of Reproduction*, 1992; 46: 442-450.
- Taskin O, Gokdeniz R, Atmaca R and Burak F. Normal pregnancy outcome after inadvertent exposure to long-acting gonadotrophin-releasing hormone agonist in early pregnancy. *Case Reports. Human Reproduction*, 1999; 14 (5): 1368–1371.
- Tena-Sempere M. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology*, 2005; 146: 3683-3685.
- Toriz HTD. Disminución de la secreción de la hormona luteinizante por medio de un agonista de GnRH para estudiar la dependencia gonadotrópica del cuerpo lúteo en la vaca gestante (Tesis de Maestría). México (D.F). México. UNAM, 2008.
- Treier M and Rosenfeldt MG. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996; 8: 833-843.

- Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales I and Dominguez R. Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric pattern throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 1988; 38: 70–78.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley Jr R, Beitins IZ, Padmanabhan V, Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr.* 1995; *Rev.* 16: 765–787.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios De Tomasi, Maldonado A and Nayudu P. Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: studies derived from in vitro and in vivo models. *Biology of Reproduction*, 2003; 69: 379-389.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JWM, Kiesel PS, Bete S and Nayudu PL. Isoforms of human recombinant follicle-stimulating hormone: Comparison of effects on murine follicle development in vitro. *Biology of Reproduction*, 1998; 59: 854-861.
- Wide L and Bakos O. More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 1993; 76: 885-889.
- Wide L, Albertsson-Wikland K, Phillips DJ. More Basic Isoforms of Serum Gonadotropins during Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Therapy in Pubertal Children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1996; 81: (1).

- Wu JC and Miller WL. Progesterone shortens poly (A) tails of the mRNAs for alpha and beta subunits of ovine luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 1991; 45: 215-220.

- Yen S., Jaffe R. y Barbier R. *Endocrinología de la reproducción*. 2001.4ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

- Zalesky DD, Schanbacher BD, Grotjan HE. Effect of immunization against LHRH on isoforms of LH in the ovine pituitary. J Reprod Fertil. 1993; 99(1): 231-235.