



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y PRODUCCION ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA E INMUNOLÓGICA DE LAS
ISOFORMAS DE LA GONADOTROPINA CORIÓNICA DE GESTACIONES
INTERESPECIE DE EQUIDOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

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

PRESENTA

JOSE DANIEL GARCIA SILVA

TUTOR:

FMVZ-UNAM Dr. JOSÉ GERARDO PERERA MARÍN

COMITÉ TUTORAL:

FMVZ-UNAM Dra. Ana Myriam Boeta Acosta

IMSS Gineco-obstetricia No. 4 Dra. Aleida Olivares Segura

México D.F. Octubre del 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DECLARACION

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

José Daniel García Silva

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Daniel García García y Graciela Silva Orozco

Por su darme la vida, su apoyo incondicional y su gran amor hacia a mí, realmente no saben cuánto los amo y admiro, gracias por enseñarme a ser la persona que soy el día de hoy.

A MIS HERMANAS:

Ana Lilia García Silva y María del Socorro García Silva

Por apoyarme en todo momento y sus sabios consejos, no saben cuánto las amo y espero que siempre sigamos juntos.

A MIS SOBRINOS:

Aarón, Mariana, Karen y Natalie

Por sus sabias palabras y ayuda incondicional
Los amo mis niños

A MIS CUÑADOS:

Paco y Héctor:

Por su apoyo en todo momento y su comprensión en los momentos más difíciles

A MIS PROESORES DEL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCION:

**Dr. Gerardo Perera, Dr. Luis Zarco, Dra. Ana Myriam Boeta y Dr. Carlos Esquivel y
Dra. Ana Rodríguez**

Muchas gracias por su apoyo y sus conocimientos.

ESPECIALMENTE A:

ADRIANA MENESES BALBOA:

Gracias por todo tu amor, tu tiempo y paciencia
Por enseñarme a vivir y demostrarme que el amor si existe
Te amo: eres mi luz mi fe y mi esperanza

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de continuar con mi carrera académica

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para este estudio.

A los miembros del comité tutorial: Dr. José Gerardo Perera Marín, Dra. Ana Myriam Boeta Acosta y Dra. Aleida Olivares Segura.

A la Dra. Anita Rodríguez y Dra. Clara Murcia por la asistencia en las determinaciones hormonales.

Principalmente al Dr. Gerardo Perera Marín por sus sabios consejos y conocimientos.

RESUMEN

La gonadotropina coriónica (CG) equina y humana, al igual que los otros miembros de la familia de glicoproteínas de origen hipofisarios, son producidas y secretadas en múltiples formas moleculares o isoformas, proteínas que difieren entre sí, por la estructura de sus oligosacáridos, propiedades biológicas e inmunológicas. Aunque se cuenta con esta información, actualmente no se han descrito evidencias de la posible heterogeneidad molecular de la CG presente en el suero de cruza equinas inter-especie (Mula y Burdégano). Por ello, el objetivo del estudio se encaminó al análisis del patrón heterogéneo de la CG de estas cruza equinas, por lo tanto, el trabajo se dividió, primeramente en purificar la CG del suero de ambas cruza e identificar el patrón de distribución de las isoformas. Para ello, las glicoproteínas del suero de burra y burdégano, se obtuvieron mediante un gradiente de concentración con etanol, a pH neutro y ácido, una vez obtenida la fracción rica en glicoproteínas, se purificó en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) y la fracción rica en CG, se analizó en el cromatofoco preparativo, herramienta analítica que permitió identificar proteínas con diferentes puntos isoeléctricos. La actividad específica de CG (UI/mg de proteína) en cada paso del proceso de extracción, purificación y análisis de la heterogeneidad molecular, se determinó mediante el sistema de inmunodiagnóstico (ELISA) para gonadotropina coriónica equina. El patrón de distribución de las isoformas de la CG purificada del suero de cruza equinas inter-especie, indicó un alto porcentaje de isoformas de tipo básico semejante en ambos productos, en contraste, el porcentaje de isoformas ácidas presentes en la CG del burdégano fue mayor cuando se comparó con la mula, de forma similar en la mula se presentó un incremento significativo con relación al burdégano en el porcentaje de isoformas neutras. Esta serie de resultados, describen un procedimiento rápido de obtención de CG del suero, además por primera vez se presenta el patrón heterogéneo de esta proteína obtenida del suero de cruza equinas inter-especie.

Palabras claves: Purificación, Cruza equinas inter-especie, Heterogeneidad, Gonadotropina Coriónica (CG).

ABSTRACT

Chorionic gonadotropin (CG) equine and human, like other members of the family of origin pituitary glycoproteins are produced and secreted in multiple molecular forms, isoforms that differ from one another by their oligosaccharide structure, biological properties and immunological.

Although this information has not currently have described evidence of possible molecular heterogeneity of GC present in the serum of equine inter-species crosses (mule and hinny). Therefore, the objective of the study corresponded to the heterogeneous pattern analysis of these crosses the equine GC, therefore, work is underway, first to purify the serum of both GC and immediately cross to identify the distribution pattern GC isoforms. To this end, serum glycoproteins donkey and hinny, were obtained using a gradient of ethanol concentration at neutral pH and acid, after obtaining the glycoprotein-rich fraction was purified on a cation exchange chromatography (CM-Sepharose) and GC-rich fraction was analyzed in the cromatofocussing preparative, analytical tool that allowed us to identify proteins with different isoelectric points. The specific activity (UI/mg protein) of CG in every step of the process of extraction, purification and analysis of molecular heterogeneity was determined by specific immunodiagnostic system (ELISA) for equine chorionic gonadotropin. The distribution pattern of the GC isoforms purified from serum of equine interspecies crosses, indicated a high percentage of basic isoforms of similar type in both products, in contrast, the proportion of acidic isoforms present in the GC of the hinny was greater when compared with the mule, similar to the mule was an increase hinny significant in relation to the percentage of neutral isoforms. This series of results, described a rapid procedure for obtaining serum GC also for the first time presents the heterogeneous pattern of this protein obtained from the serum of equine interspecies crosses.

Keywords: Purification, pregnancy inter-specie, Heterogeneity. Chorionic gonadotropin, (CG).

CONTENIDO

	Página
DECLARACION.....	I
DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
CONTENIDO.....	VI
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. HIPÓTESIS.....	2
4. REVISION DE LITERATURA.....	3
4.1. Estructura de las glicoproteínas.....	3
4.1.1. Subunidad alfa.....	3
4.1.2. Subunidad beta.....	4
4.2. Heterogeneidad Molecular de las Gonadotropinas.....	6
4.2.1. Mecanismo de glicosilación.....	6
4.2.2. Tipo de carbohidratos.....	7
4.2.3. Mecanismo de acción.....	9
4.3. Gonadotropina Coriónica.....	10
4.3.1. Gonadotropina coriónica equina (eCG).....	10
4.3.2. Gonadotropina coriónica de burro (dCG).....	11
4.3.3. Comparación de la estructura y función de la eCG y de la dCG.....	11
4.3.4. Gonadotropina coriónica de mula.....	12
4.3.5. Gonadotropina coriónica de Burdégano.....	12
4.4. Fisiología de la Gestación Equina.....	12
4.4.1. Endocrinología de la gestación temprana.....	12

4.4.2.	Formación y desarrollo de las copas endometriales.....	14
4.4.3.	Destrucción de las copas endometriales.....	15
4.5.	Cuerpo Lúteo.....	16
4.5.1.	Desarrollo del cuerpo lúteo.....	16
4.5.2.	Cuerpo Lúteo Primario.....	18
4.5.3.	Cuerpos Lúteos Suplementarios.....	19
4.5.4.	Producción y secreción de progesterona.....	19
5.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
5.1.	Animales.....	21
5.2.	Inseminación artificial.....	21
5.3.	Diagnóstico de gestación y actividad ovárica.....	22
5.4.	Determinación hormonal.....	22
5.4.1.	Progesterona.....	22
5.4.2.	Gonadotropina Coriónica Equina.....	22
5.5.	Obtención y purificación de la eCG.....	23
5.5.1.	Preparación de la muestra.....	23
5.5.2.	Extracción de eCG cruda.....	23
5.5.3.	Purificación de la eCG.....	24
5.6.	Heterogeneidad Molecular.....	24
5.6.1.	Cromatoenfoco.....	26
5.7.	Caracterización de la Gonadotropina Coriónica.....	27
5.7.1.	Cuantificación de proteínas.....	27
5.7.2.	ELISA.....	27
5.8.	Análisis Estadístico.....	27
5.8.1.	Hormonas.....	27
5.8.2.	Isoformas.....	28
6.	RESULTADOS.....	29
6.1.	Concentraciones hormonales de progesterona y gonadotropina coriónica.....	29
6.1.1.	Gestación tipo Mular.....	29
6.1.2.	Gestación tipo burdégano.....	30
6.2.	Extracción de la Gonadotropina Coriónica.....	31

6.3. Purificación de la Gonadotropina Coriónica.....	32
6.4. Heterogeneidad Molecular.....	33
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES.....	43
9. REFERENCIAS.....	44
10. ANEXO.....	52

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 14.....29

Patrón de secreción de progesterona y eCG en suero obtenido durante la gestación de tipo mular proveniente de la cruce de yeguas inseminadas con semen de burro. Los puntos representan la media \pm EE. La producción de cada hormona se comparó mediante un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni tomando como referencia el pico de producción de la hormona; semana 7 para eCG y semana 6 para progesterona. Para cada hormona los puntos debajo de los corchetes indican niveles similares ($p>0.05$).

Figura 15.....30

Patrón de secreción de progesterona y eCG en suero obtenido durante una gestación de tipo burdégano proveniente de la cruce de una burra inseminada con semen de caballo. Los puntos representan la media \pm DE. La producción de cada hormona se comparó mediante un análisis de varianza de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni tomando como referencia el pico de producción de la hormona; semana 8 para eCG y semana 12 para progesterona. Para cada hormona los puntos debajo de los corchetes indican niveles similares ($p>0.05$).

Figura 16.....33

Patrón de elución de la GC cruda obtenida de suero de yegua gestada con semen de burro (Mula) y suero de burra gestada con semen de caballo (Burdégano), en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa). La columna (1.5 cms de diámetro x 27 cm de longitud) se equilibró con acetato de amonio 50 mM pH 5.1, con un flujo de 23ml/h. La fracción no retenida en la columna denominada CM-1ab eluyó con este amortiguador, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-2cd se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8, la fracción CM-3ab se obtuvo con acetato de amonio 1M más glicina 0.1M pH 9.5. Se colectaron fracciones de 2 ml. La presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280 nm.

Figura 17.....34

Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción rica en gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de yegua gestante con semen de burro (Gestación Mular). Dos miligramos de proteína se aplicaron a la columna de intercambio iónico (PBE-118), equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó

con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y 135 fracciones de 2 ml se colectaron. Las flechas indican el momento de cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y después de la aplicación del NaCl 1M.

Figura 18.....18

Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción rica en gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de burra gestante con semen de caballo (Gestación de tipo Burdégano). Diez miligramos de proteína se aplicaron a la columna de intercambio iónico (PBE-118), equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y 155 fracciones de 2 ml se colectaron. Las flechas indican el momento de cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y después de la aplicación del NaCl 1M, respectivamente. Cualquier pico de proteína fue codificado con una letra comenzando con la proteína más básica (A; pH 10.6-10.2) y concluyendo con la forma más ácida (H; pH 3.88-3.51). La proteína unida a la columna después de la elución de pH inferior fue eluida con 1M de NaCl y se designó como pico S.

Figura 19.....37

Patrón de distribución del porcentaje de las isoformas de eCG de la gestación de las cruza interespecie agrupadas de acuerdo a su pH de elución. Los puntos representan la media \pm DE. La proporción de cada tipo de isoforma se comparó mediante un análisis de varianza de dos vías, incluyendo en el modelo a los factores principales pH y cruza, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Además, para la cruza de tipo mula se utilizó una prueba post-hoc para determinar si existe una tendencia lineal en el patrón de distribución de isoformas con respecto al cambio en el pH de elución.

Cuadro 1.....31

Rendimiento de los pasos de extracción de la gonadotropina coriónica del suero de las gestaciones de tipo burdégano (B) y mular (M).

Cuadro 2.....33

Rendimiento en los pasos de purificación de la gonadotropina coriónica presente en el suero de las gestaciones de tipo burdégano (B) y mular (M).

Cuadro 3.....36

Promedio \pm EE de la actividad específica de las isoformas de CG obtenidas del suero de las gestaciones de tipo burdégano (B) y mular (M).

1. INTRODUCCIÓN

La obtención de productos interespecie de équidos es una práctica muy recurrida en nuestro país, particularmente para la obtención de mulas mediante el cruzamiento entre burro (*Equus asinus* ♂) X yegua (*Equus caballus* ♀). Con poca frecuencia se realiza el cruzamiento recíproco, entre caballo (*Equus caballus* ♂) X burra (*Equus asinus* ♀), que conduce a la obtención del burdégano.

En el primer tercio de la gestación de los équidos se forman unas estructuras de origen coriónico llamadas copas endometriales, en las que se lleva a cabo la síntesis y secreción de gonadotropina coriónica (Allen y Wilsher, 2009), que completa su nombre con la especie que la produce. Así, las yeguas gestantes servidas por caballo producen gonadotropina coriónica equina (eCG) y las burras servidas por burro producen gonadotropina coriónica de burro (dCG). La eCG y la dCG tienen diferencias estructurales que también provocan ciertas diferencias en sus efectos. Dado que las gonadotropinas coriónicas son producidas por células coriónicas del producto, en las gestaciones híbridas existe el potencial de que las copas endometriales secreten una mezcla de eCG y dCG, provenientes de la expresión del gen heredado de cada progenitor. Esto parece ser confirmado por el hecho de que se han observado isoformas de CG durante la gestación equina intraespecie (Butnev *et al*, 1983). Sin embargo, debido a fenómenos como la impronta génica o el rechazo inmunológico a las copas endometriales, la mezcla de CG de cada especie podría ser distinta en cada tipo de gestación híbrida. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es identificar y caracterizar la heterogeneidad molecular de la CG presente en el suero de ambos tipos de gestación híbrida entre *Equus caballus* X burra *Equus asinus*.

En el presente trabajo generalmente nos referiremos como CG (sin especificar especie) a las gonadotropinas coriónicas presentes en gestaciones híbridas, y como eCG o dCG respectivamente a la gonadotropina coriónica específica de gestaciones equinas o de burro.

2. OBJETIVO GENERAL

Analizar el patrón de distribución de la gonadotropina coriónica presente en el suero de yeguas gestantes con productos resultado de cruzas inter-especie de équidos (mula y burdégano).

OBJETIVO PARTICULARES

- 1.- Purificar la gonadotropina coriónica del suero de gestaciones híbridas de équidos.
- 2.- Identificar el patrón de distribución de las isoformas de la gonadotropina coriónica presente en el suero de yeguas con gestaciones híbridas de équidos.

3. HIPÓTESIS

Existe una distribución diferente de isoformas de gonadotropina coriónica durante la gestación de yeguas servidas con burro en comparación con la distribución encontrada durante la gestación de burras servidas con caballo.

4. REVISION DE LITERATURA

Las gonadotropinas coriónicas (CG) pertenecen a la familia de las hormonas glicoprotéicas, que incluye a la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). A diferencia de la LH, FSH y TSH, que son hormonas sintetizadas y almacenadas en la adenohipófisis, la gonadotropina coriónica humana (hCG) es sintetizada por las células trofoblásticas, mientras que las gonadotropina coriónica equina (eCG) es sintetizadas por las copas endometriales provenientes del cinturón coriónico, localizado en el útero de la yegua gestante (Allen and Wilsher, 2009; Legardinier *et al*, 2005; Bousfield *et al*, 2004).

Al igual que la LH, FSH y TSH, la eCG es una glicoproteína heterodimérica, formada por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas denominadas subunidad alfa (α) y subunidad beta (β) unidas por puentes disulfuro (Bousfield et al., 2001); Su peso molecular es de 72 kDa. (Bousfield, 1996; Legardinier, 2005)

Esta hormona presenta funciones semejantes a la LH dentro de la especie equina, sin embargo, en otras especies presenta actividad biológica semejante a la FSH (Lecompte et al, 2010). Durante la gestación equina la eCG presenta una actividad luteotrópica, la cual promueve la síntesis y secreción de la progesterona por parte del cuerpo lúteo primario proveniente de la primera ovulación, así como una función luteogénica, que induce la formación de cuerpos lúteos suplementarios durante esta condición fisiológica (Stewart et al., 1976, 1981; Zarco y Boeta 2012).

4.1. Estructura de las glicoproteínas

4.1.1. Subunidad alfa

La estructura de la subunidad α de las hormonas glicoprotéicas está integrada por 96 residuos de aminoácidos, excepto en la especie humana donde solo contiene 92 residuos debido a una eliminación de los residuos 5-8. Dentro de cada especie la subunidad α se encuentra codificada por un solo gen para todas las hormonas glicoprotéicas (Naylor et al., 1983; Gharib et al., 1990; Hearn y Gomme, 2000).

La estructura primaria de la subunidad α contiene una alta proporción de residuos de cisteína que se conservan entre las diferentes especies. Mediante estos residuos se forman cinco puentes de disulfuro (Hearn y Gomme, 2000).

Además de los puentes disulfuro, en todas las especies existen sitios de glicosilación en esta subunidad. Específicamente en el equino se presentan dos sitios de glicosilación, el primero se localiza en la posición 56 (Asn₅₆) de la secuencia primaria del polipéptido (en humanos se localiza en Asn₅₂) y el segundo sitio se localiza en la posición 82 (Asn₈₂, Asn₇₈ en el humano). Los sitios de glicosilación consisten en la secuencia Asn-X-The, donde el oligosacárido precursor se une al grupo amida de la cadena lateral del aminoácido asparagina (Asn), esta unión se conoce como N-glicosilación (Bousfield *et al*, 1994; Bousfield *et al*, 2004).

Se ha descrito que los oligosacáridos de la cadena α participan en la transducción de señal, particularmente los localizados en el residuo Asn₅₂ o Asn₅₆ (Bousfield *et al*, 1994; Bousfield *et al*, 2004).

Especie	10	20	30	40	50
Humano	APDV - - - -QD	C PECT L QEN P	FESQPGAP L	O CMGCCFSRA	Y PTPLRS K KT
Equino	FPDGEFTTOD	C PE C KLREN K	YF F KLGV P IY	O CKGCCFSRA	Y PTPAR S RKT

Especie	60	70	80	90	
Humano	M L V OK N VT S E	S T C CVAKSY N	R V T V MGG F K V	E N H T A C H C S T	C Y Y H K S
Equino	M L V P K NIT S E	S T C CVAKAF I	R V T V MGN I KL	E N H T O C Y C S T	C Y H H K I

Figura 1. Homología comparativa de las secuencias de aminoácidos de la subunidad alfa de las diferentes especies de mamíferos. Los residuos de cisteína (C) se resaltan en negritas y la región de residuos de aminoácidos conservados en las subunidades de las especies está subrayada. (Adaptado de Ward et al, 1990).

4.1.2. Subunidad beta

El número de aminoácidos que conforman la estructura primaria de la subunidad beta difiere entre las especies y entre las diferentes hormonas de cada especie; en el caso de la eCG- β y de la LH- β equina están conformadas por 149 aminoácidos, lo que las hace considerablemente más grandes que la mayoría de las hormonas gonadotrópicas, por ejemplo la TSH- β tiene entre 112-118 y la FSH- β contiene 110-111 aminoácidos en

diferentes especies. Solo la hCG- β , con sus 145 aminoácidos tiene un tamaño similar a los de la eCG- β y de la LH- β equina. A diferencia de la subunidad α , la subunidad β no es codificada por un solo gen, sin embargo, La homología en la secuencia de residuos de aminoácidos de esta subunidad en las distintas especies, es del 90%, presentando residuos de cisteína altamente conservados entre las especies. Así, en todas las especies presenta 12 residuos de cisteína, que forman un total de 6 puentes disulfuro. El hecho que los residuos de cisteína están conservados y que cada subunidad comparte más del 50% de homología con las demás subunidades β es un indicativo de que comparten una estructura tridimensional común (Combarous, 1992; Hearn y Gomme, 2000).

La subunidad beta también contiene patrones de glicosilación, con la diferencia que este patrón es variable entre las especies. Por ejemplo, la subunidad β de la hCG y de la LH humana se encuentra glicosilada en el residuo de asparagina de la posición 13 y 30. En el caso particular de la subunidad β de la gonadotropina coriónica equina, el patrón de glicosilación se observa en 14 sitios, dos del tipo N-unidos, y 12 del tipo O-unidos. La unión tipo O se caracteriza por incorporar el oligosacárido en el grupo hidroxilo del residuo de los aminoácidos serina o treonina. Este tipo de glicosilación del tipo O-unido le otorga propiedades características a la eCG, que se reflejan en una vida media en la circulación de 8 días aproximadamente (Pierce, 1981; Chopineau, 1995; Bousfield, 1987; Bousfield et al, 2001; Bousfield *et al*, 2004; Legardinier, 2005).

Espece	10	20	30	40	50
eCG β	SRGPLRPL <u>C</u> R	PINATLAAEK	EAC <u>P</u> I <u>C</u> ITFT	TSICAGY <u>C</u> PS	MVRVMPAALP
hCG β	SREPLRPL <u>C</u> R	PINATLAVEK	EG <u>C</u> PV <u>C</u> ITVN	TTICAGY <u>C</u> PT	MTRVLQGVLP

Espece	60	70	80	90	100
eCG β	A-IP-QPV <u>C</u> TYR	ELRFASIRLP	<u>G</u> CPPGVDP <u>M</u> V	SFPV <u>A</u> LS <u>C</u> H <u>C</u>	GP <u>C</u> OIKTT <u>D</u> C
hCG β	A-LP-QVV <u>C</u> NYR	DVRFESIRLP	<u>G</u> CPRGVNP <u>V</u> V	SYA <u>V</u> ALS <u>C</u> O <u>C</u>	<u>A</u> LCRRST <u>T</u> D <u>C</u>

Espece	110	120	130	140	
eCG β	GVFRDQPL <u>A</u> C	APQASSSSKD	PPSQPLTSTS	TTPGASRRS	SHPLPIKTS
hCG β	GGPKDHPL <u>T</u> C	DDPRFQSSS	SKAPPSLPS	PSRLPGPSDT	PILPQ

Figura 2. Comparación en la estructura primaria de las diferentes subunidades β de las hormonas glicoprotéicas. Los residuos de cisteína están resaltados en negritas. Los residuos que se conservan a través de

todas las subunidades β de las hormonas glicoprotéicas se encuentran subrayadas. Las abreviaciones indican la especie: e: equina, h: humana, ba: babuino, o: ovino, b: bovino, p: porcino, r: rata, d: perro y m: ratón. (Tomado de Hearn y Gomme, 2000)

4.2. Heterogeneidad Molecular de las Gonadotropinas

4.2.1. Mecanismo de glicosilación

El mecanismo de glicosilación se refiere al proceso mediante el cual se realiza la incorporación de oligosacáridos a la cadena de aminoácidos de una proteína. Es un camino biosintético que se inicia en el retículo endoplásmico rugoso (rer), con la transferencia de un oligosacárido precursor desde la molécula de dolicol (fosfolípido de membrana) hacia un residuo de aminoácidos de la cadena nascente. En la membrana del RER el dolicol tiene unida un oligosacárido conformado por 2 moléculas de N-acetilglucosamina, 9 de manosa y 3 de glucosa ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Este oligosacárido es transferido, durante la translocación de la cadena nascente hacia el rer, desde el dolicol al sitio de glicosilación representado por la secuencia asparagina-X-treonina en donde la X representa cualquier aminoácido. El proceso regulado por la enzima glicosiltransferasa (Baenziger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre et al, 1998; Perera-Marin et al, 2007). Una vez incorporado este oligosacárido a la proteína, y durante su paso por el RER y el aparato de golgi, el oligosacárido sufre modificaciones estructurales, proceso realizado por enzimas llamadas exoglucosidasas y manosidasas, lo que genera un oligosacárido común, que consiste de dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa (Baenziger y Green, 1988; Stockell y Renwick, 1992). A esta estructura común se le incorporan, en distintas posiciones, moléculas de N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido siálico y/o sulfato, proceso regulado por enzimas como la N-acetilgalactosamina-transferasa, N-acetilglucosamina transferasa, Galactosil-transferasa, sialiltransferasa y sulfotransferasa, siendo lo anterior la base para la existencia de las diferentes isoformas de las gonadotropinas secretadas tanto por la hipófisis como por la placenta (Combarnous, 1992; Baenziger y Green, 1988; Ulloa-Aguirre et al, 1998).

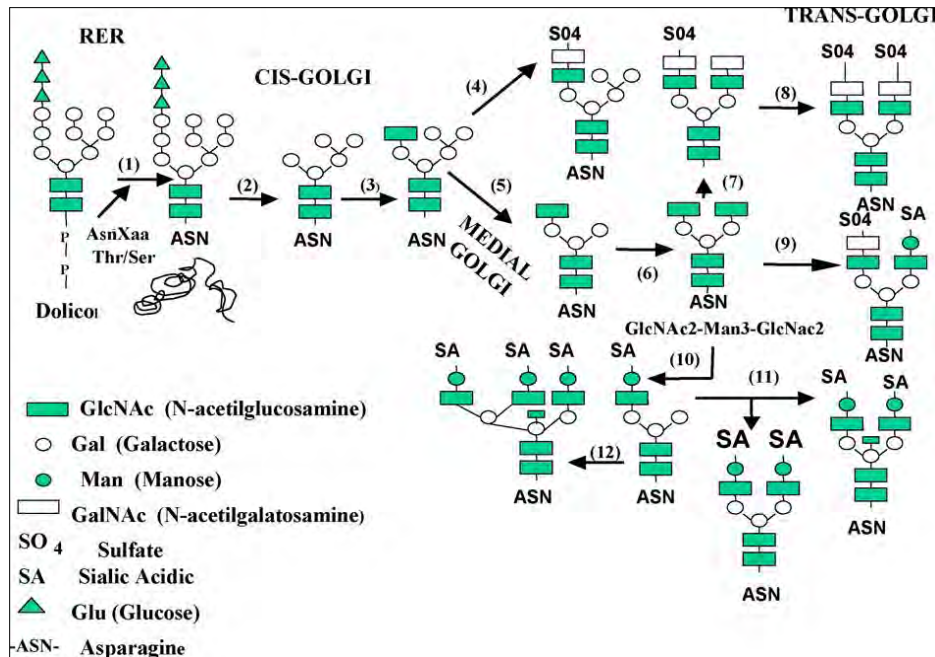


Figura 3. Ruta biosintética de los oligosacáridos N-unidos en las subunidades α y β de las gonadotropinas. (1) Glicosiltransferasa, (2) glucosidasa I y II, Manosidasa 1 y 2; N-acetilglucosamina transferasa; (4) sulfotransferasa; (5) Manosidasa 1 y 2; N-acetilglucosamina transferasa; (7) N-acetilgalactosamina transferasa y sulfato transferasa; (8) sulfato transferasa; (9) N-acetilgalactosamina transferasa, sulfato transferasa, galactosil transferasa y sialil transferasa; (10) galactosiltransferasa y sialiltransferasa; (11 y 12) N-acetilgalactosamina transferasa, galactosil transferasa y sialil transferasa, respectivamente (Tomado de Perera et al, 2007).

4.2.2. Tipo de carbohidratos

Las cadenas de carbohidratos que conforman a las glicoproteínas influyen tanto en el peso como en la carga de la proteína. Es por ello que con estas propiedades se ha logrado identificar y purificar múltiples formas de estas proteínas.

De esta manera, se han clasificado tres principales grupos de oligosacáridos que conforman a las glicoproteínas, el primero es un grupo que contiene solo manosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos al núcleo común; el segundo grupo contiene un residuo de fucosa unido a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) y a la cadena exterior, casi siempre contiene el trisacárido N-acetilglucosamina-galactosa-ácido siálico; finalmente el último grupo es un híbrido que incluye las combinaciones de los dos subtipos anteriores (Baenziger, 1996; Hearn y Gomme, 2000).

Se ha observado que los oligosacáridos presentes en hormonas como la LH, TSH y la subunidad α libre de las gonadotropinas, contienen oligosacáridos mono y bi-ramificados

con terminación N-acetilgalactosamina-sulfato, en tanto que la FSH contiene oligosacáridos di, tri o tetra-ramificados con terminaciones de galactosa y ácido siálico; sin embargo, la gonadotropina coriónica de los équidos presenta un patrón de oligosacáridos menos heterogéneo, con estructuras bi-ramificadas únicamente, así como residuos terminales de galactosa-ácido siálico como fue descrito para la FSH (Baenziger, 1996; Hearn y Gomme, 2000).

Las cadenas de oligosacáridos de las hormonas glicoproteicas también tienen un papel fundamental en la vida media en circulación de estas hormonas, por ejemplo, la presencia de N-acetilgalactosamina y sulfato, o bien de oligosacáridos con terminales de manosa o N-acetilglucosamina aceleran la degradación de la molécula debido a su gran afinidad por el receptor específico Gal/GalNAc localizado en células de kúpffer y células endoteliales hepáticas (Fiete et al, 1991; Fiete et al, 1997).

Esto provoca que existan diferencias en la vida media de las hormonas glicoproteicas; por ejemplo la vida media en circulación de la FSH (8 horas) es mayor que la vida media de la LH (2 a 4h), pero más corta que la de la gonadotropina coriónica equina (6 a 8 días), en la que encontramos glicosilación de tipo N-unido y glicosilación de tipo O-unido con terminaciones de ácido siálico (Baenziger y Green, 1988; Bousfield et al, 2001).

Los oligosacáridos incrementan de forma significativa el peso molecular de las hormonas glicoproteicas, ya que contribuyen con un 20 al 40 % de su peso molecular. Así, la eCG presenta un peso molecular cercano a los 72 kDa, mientras que el peso molecular de la LH es de 32 a 36 kDa dependiendo de la especie. Además, también contribuyen en parte a la carga eléctrica de la proteína, identificada a través de su punto isoeléctrico (Baenziger and Green, 1988; Hearn y Gomme, 2000).

Se ha descrito que los oligosacáridos participan en la activación de la transducción de la señal por el receptor acoplado a proteínas G (Dufau, 1998). Por ejemplo, la presencia del ácido siálico afecta la actividad biológica *in vitro*, mientras que la desialización de la hCG aumenta la afinidad por su receptor al mismo tiempo que reduce drásticamente su efectividad para activar el mecanismo de acción de la hormona, por lo que reduce su actividad esteroidogénica, convirtiéndose en un antagonista en el testículo o en el ovario

(Amir et al, 1987; Reddy et al, 1996).

Por lo tanto, la diferencia en el contenido de carbohidratos dentro de la molécula no únicamente modifica la estructura de la proteína, sino también participa activamente en su función biológica, lo que establece la base para el polimorfismo estructural asociado con la actividad biológica *in vivo* e *in vitro* de estas proteínas (Ulloa-Aguirre et al., 1999; Creus et al., 2001).

4.2.3. Mecanismo de acción

Las hormonas glicoprotéicas activan a los receptores acoplados a proteínas G localizados en la membrana plasmática de la célula blanco. En el caso de la gonadotropina coriónica, el receptor es el mismo al que se acopla la LH, por lo tanto se le denomina LH/CG-R (Dufau, 1998).

La estructura de este receptor está conformada por tres regiones distintas, un dominio extracelular (amino terminal) conformado por 340 a 390 aminoácidos (aa), una segunda región que corresponde a siete regiones transmembranales unidas por asas extra e intracelulares y finalmente un dominio intracelular (carboxi-terminal) de 50 aa. La interacción de la hormona con su receptor conduce a la activación de una proteína G que a su vez puede regular la actividad de enzimas que resultan en la producción de un segundo mensajero, como el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) o el inositol trifosfato. (Corda *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 1992; Gudermann *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1987).

Para ello, una vez que la gonadotropina coriónica equina se une a su receptor, éste promueve un cambio en la conformación de la proteína G_s , lo que permite que dicha proteína intercambie GDP (difosfato de guanosina) por GTP (trifosfato de guanosina) en su subunidad alfa, lo que provoca la disociación de las otras subunidades de la proteína G (la β y la γ). Las subunidades que conforman a la proteína G (α , β y γ) pueden iniciar o inhibir distintas cascadas de señalización intracelular. Cuando se ha liberado de las subunidades β y γ , la subunidad alfa de la proteína G_s activa la adenilciclase, la cual convierte ATP a adenosin monofosfato cíclico (AMPC). El AMPC tiene como objetivo principal a la cinasa de proteínas A (PKA). Esta holoenzima es un tetrámero que tiene dos subunidades

catalíticas (C) que se mantienen de forma inactiva cuando están unidas a dos subunidades reguladoras (R). Cuando el AMPc se une a las subunidades reguladoras la PKA se disocia, liberando las subunidades catalíticas; y una vez activas estas fosforilan muchos substratos específicos en el citoplasma celular (Ferguson 2001; Hearn and Gomme, 2000; Wong y Scott; 2004; Sadana y Dessauer 2009).

4.3. Gonadotropina Coriónica

4.3.1. Gonadotropina coriónica equina (eCG)

La eCG es sintetizada y secretada por las copas endometriales desde el día 35 hasta el día 120 de la gestación equina (Allen 2001). Esta hormona se encuentra conformada por dos subunidades unidas en forma no covalentemente, designadas como α y β , que tienen un peso molecular de 64 y 72 kDa, respectivamente (Damm *et al*, 1990).

La secreción de eCG se inicia desde el día 35, incrementándose rápidamente en el suero materno, hasta alcanzar un pico máximo alrededor del día 60-70, cuando alcanza valores variables de 20-300 UI/ml, para después declinar conforme ocurre la degeneración y muerte de las copas endometriales (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

En el ovario de la yegua la eCG tiene una actividad de LH, por lo que puede provocar la ovulación y/o la luteinización de folículos dominantes presentes durante la gestación. Como resultado se forman cuerpos lúteos suplementarios que comienzan a aparecer en los ovarios alrededor del día 38 de la gestación, inmediatamente después del comienzo de la secreción de la eCG, lo cual conlleva un aumento en las concentraciones circulantes de progesterona en este periodo (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

Las concentraciones de eCG difiere entre las gestaciones intraespecie e interespecie; Stewart y Allen (1981) observaron que en la gestación mular las concentraciones de esta hormona son muchos menores que en la gestación de tipo burdégano y en la gestación intraespecie equina.

El inicio de la secreción de la eCG en los diferentes tipos de gestaciones antes mencionadas comienzan en el mismo día (35 días de la gestación) pero las concentraciones alcanzadas, así como el momento en que ocurre la reducción o desaparición de las concentraciones de

la eCG es variable, debido a la destrucción temprana o tardía de las copas endometriales en el útero grávido de estas gestaciones (Stewart y Allen, 1981).

En el caso de la gestación mular las concentraciones en el suero alcanzan niveles muy inferiores a las presentes en la gestación equina, que además se reducen rápidamente hasta desaparecer entre la semana 8 y 10 de la gestación (Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012), mientras que en la de tipo burdégano se alcanzan concentraciones muy elevadas y su periodo de secreción se extiende hasta el día 140, a (Stewart y Allen, 1981; Allen et al, 1993; Allen y Short, 1997)

4.3.2. Gonadotropina coriónica de burro (dCG)

La secreción de esta hormona se presenta en la hembra de la burra gestante a partir del día 35 de la gestación finalizando el día 126 con un pico máximo de secreción de 27.4 UI/ml en el día 56 de la gestación (Stewart y Allen, 1981).

Esta secreción de esta gonadotropina repercute en la secreción de progesterona, donde aumenta sus concentraciones en sangre entre la semana 6 y 11 de la gestación mostrando un promedio de esta progesterona de 12.2 ± 0.95 ng/ml (Stewart y Allen, 1981).

4.3.3. Comparación de la estructura y función de la eCG y de la dCG

La estructura de la dCG presenta varios porcentajes de glicoproteínas en su cadena de aminoácidos con un 31% de carbohidratos y un 6.8% de ácido siálico con un solo residuo amino-terminal de fenilalanina y en la cadena de aminoácidos Aggarwal y colaboradores, (1980) encontraron una mayor cantidad de tirosina; mientras que la eCG presenta un total de 45% de carbohidratos y 10.2% de ácido siálico y dos residuos amino-terminal: fenilalanina y serina, además de presentar en su cadena de aminoácidos una mayor cantidad de arginina; estas diferencias son importantes remarcarlas debido a que no existe información acerca de la estructura de la gonadotropina coriónica de la gestación mular y de tipo burdégano y podría haber una mezcla de estas dos hormonas para estas gestaciones.

La actividad biológica de ambas hormonas también son diferentes ya que Aggarwal y colaboradores (1980) mencionan que en un estudio realizado para la producción de AMP cíclico en túbulos seminíferos de ratas inmaduras obtuvieron el siguiente resultado: la dCG

tuvo una menor potencia para actividad de FSH que la eCG mostrando solo un 4% de esta actividad; mientras que en este mismo estudio utilizaron un ensayo de radioreceptores en donde muestran que la dCG tiene una actividad significativa de LH, sin embargo el ratio de actividad de LH:FSH es baja en comparación con la eCG.

4.3.4. Gonadotropina coriónica de gestación mular

La cruce híbrida más común entre los équidos corresponde a la gestación de tipo mular, cruce generada cuando una yegua es servida por un burro. Una vez logrado el proceso de gestación, se inicia el proceso de síntesis y secreción de la gonadotropina coriónica a partir de la sexta semana de gestación y declinando en la semana 11 de la gestación (Allen y Short, 1997; Stewart y Allen, 1981; Boeta y Zarco, 2005; 2010; 2012). Aunque se conoce bastante sobre los perfiles de GC durante las gestaciones mulares, la información referente a las propiedades fisicoquímicas de la hormona producida por las copas endometriales de yeguas gestantes con burro no se ha descrito.

4.3.5. Gonadotropina coriónica de Burdégano

En la gestación de tipo burdégano, cruce híbrida entre una burra y un caballo, existe una baja tasa de fertilidad (14%) (Allen y Short, 1997), con una alta concentración circulante de gonadotropina coriónica. Tampoco se ha realizado la caracterización fisicoquímica de la gonadotropina coriónica producida por las copas endometriales de burras gestantes con caballo.

4.4. Fisiología de la Gestación Equina

4.4.1. Endocrinología de la gestación temprana

Una vez que se lleva a cabo la ovulación y el ovocito es fertilizado por el espermatozoide, el cigoto continua su recorrido a través del oviducto hasta llegar a la unión útero-tubarica, en donde se encuentra una papila que regula el paso hacia el útero, permitiéndolo solamente a embriones y no a ovocitos sin fertilizar. Esta regulación diferenciada solamente se ha descrito en équidos. Para poder pasar la unión útero-tubarica el embrión debe estar en una etapa de mórula compacta y secretando cantidades significantes de prostaglandina E2, la

que estimula la apertura de esta papila y permite el paso del embrión; esto sucede en el sexto día post-ovulación (Allen, 2000; Stout y Allen, 2001; Allen y Wilsher, 2009).

Después de que la mórula equina entra al útero, y conforme continúa con su desarrollo, el embrión es envuelto completamente por una cápsula que está conformada por glicoproteínas parecidas a la mucina y con alto peso molecular. La cápsula se mantiene recubriendo al embrión desde el sexto día hasta el día 23 de la gestación, teniendo como función el proteger al embrión durante su recorrido en el útero, así como acumular secreciones de las glándulas endometriales (leche uterina o histotrofe) (Allen 2000; Allen y Wilsher, 2009).

Una vez que se formó la capsula del embrión este comienza un recorrido a través del útero para permitir el reconocimiento materno de la gestación. Actualmente no se conoce con precisión la sustancia que permite este reconocimiento materno. Sin embargo, se sabe que el embrión empieza a secretar cantidades significativas de estrógenos (Allen y Wilsher, 2009; Allen, 2000; Allen 2005).

Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento materno de la gestación el embrión deja de moverse, fijándose casi siempre cerca de la bifurcación uterina alrededor del día 16 de la gestación; una vez fijado el embrión realiza una rotación para quedar en un contacto más cercano con el endometrio, es decir, que el embrión se encuentra en la zona ventral con respecto al saco vitelino (Ginther, 1998; Allen 2005).

A partir del día 21 la membrana alantoidea aparece por primera vez como una evaginación del intestino fetal, este alantoides crece rápidamente alrededor del embrión y se fusiona con el corion en el día 28 para dar como resultado el alantocorion, el cual continúa creciendo hasta reemplazar el saco vitelino en el día 40 de la gestación (Allen, 2000; Allen 2005).

4.4.2. Formación y desarrollo de las copas endometriales

Entre el día 25 al 35, en la unión del corioalantoides se forma un cinturón denominado coriónico, el cual va a dar origen a las células que formarán las copas endometriales secretoras de gonadotropina coriónica equina.

Dicho cinturón aparece como una serie de ondulaciones en el corion que se profundizarán marcadamente en los siguientes 10 días para convertirse en crestas debido a la rápida hiperplasia de las células trofoblásticas en la parte superior de cada pliegue (Allen 2005, Allen, 2000). Alrededor del día 36 las células binucleadas del cinturón coriónico comienzan a invadir el tejido materno.

Allen y Stewart (2001), mostraron diferencias en la formación y grosor del cinturón coriónico, que van a depender del genotipo fetal. En la gestación intraespecie equina e interespecie de tipo burdégano se observó un cinturón muy grueso, a diferencia de la gestación de tipo mular y en la gestación de intraespecie de burro, en las que se presenta un cinturón coriónico muy delgado. Allen y Stewart sugirieron que estas diferencias en la formación y grosor del cinturón coriónico se deben a la impronta de genes maternos asociados con el desarrollo de los cinturones coriónicos.

Regresando a la invasión del endometrio por el cinturón coriónico, las células binucleadas trofoblásticas pasan a través de las células del epitelio luminal del endometrio hasta alcanzar la membrana basal que se encuentra por debajo y de esta manera alcanzan las glándulas endometriales en el día 38 a 40 de la gestación. Entonces todas las células invasoras proliferan y rodean a la glándula provocando que se formen protuberancias denominadas copas endometriales (Allen, 2000).

Las copas varían en tamaño y forma, desde estructuras circulares de tan solo 1-2 mm de diámetro de largo hasta líneas largas de tejido que pueden medir de 3 a 5 cm de ancho y más de 30 cm de largo. Las copas endometriales alcanzan su máximo tamaño y máxima producción alrededor del día 60-70 de la gestación, cuando se elevan por arriba de la superficie del endometrio y aparecen en forma de plato, para posteriormente formar una especie de ulcera cuando comienza la degeneración de las células en la región central de la copa endometrial (Allen, 2000; Allen y Stewart, 2001, Allen y Wilsher, 2009).

4.4.3. Destrucción de las copas endometriales

Histológicamente cada copa consiste de una masa compacta de grandes células binucleadas de tipo epitelial intercaladas con vasos sanguíneos, que se encuentran dentro de las glándulas endometriales dilatadas. Al principio de la invasión del cinturón coriónico,

alrededor del día 38, estas glándulas se encuentran obliteradas tanto en la salida como en la región apical (Allen, 2000; Allen y Stewart, 2001, Allen y Wilsher, 2009).

En el estroma debajo de cada copa existe una colección de senos linfáticos. En el momento de la formación de la copa se produce un incremento en el número de leucocitos maternos, consistente de linfocitos CD4 y CD8, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos, que se acumulan en la periferia del estroma. Después del día 70 las copas en apariencia se vuelven más pálidas debido a que se inicia la degeneración y muerte de las células, especialmente en la depresión central de la superficie luminal. Conforme se va desprendiendo el tejido necrótico de la superficie de la copa, el espacio se va llenando con material secretado por las glándulas endometriales, que se mezcla con las células necróticas de la copa para formar un coagulo espeso de color miel, el cual contiene altas concentraciones de eCG. En esta etapa los linfocitos se acumulan en la periferia de la copa para invadir el tejido y destruir las células de las copas endometriales (que son genéticamente extrañas a la madre). Finalmente entre el día 100 y 120 de la gestación equina toda la copa se desprende del endometrio (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

Las superficie de las células trofoblásticas del cinturón coriónico expresan altas concentraciones de antígenos de histocompatibilidad mayor tipo I (MHC I) de origen paterno desde antes de iniciar la invasión del endometrio materno. Estos antígenos estimulan la respuesta humoral de la madre, desarrollándose títulos altos de anticuerpos específicos en el suero entre el décimo y el decimocuarto día después de iniciarse la invasión del endometrio por las células del cinturón coriónico alrededor del día 36-38 (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

Las células inmunes maternas se acumulan y forman una barrera entre las copas y el tejido materno. Al principio los leucocitos acumulados forman una simple pared por fuera de las células fetales, pero más allá del día 60-70 de la gestación, cuando las células de la región central comienzan a degenerar y morir, los linfocitos que se encuentran en la periferia comienzan a atacar y destruir las células de las copas endometriales, que continúan degenerando hasta el día 100-120 de la gestación, cuando hay una descamación de estas células y una eliminación de las copas endometriales (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

La magnitud y temporalidad de esta respuesta inmunológica es variable dependiendo de las diferentes gestaciones equinas, por ejemplo, en la gestación mular es mucho más prematura e intensa y por lo tanto la vida media de las copas endometriales es mucho menor y por lo consiguiente la secreción de eCG es también de menor duración. En contraste, la reacción inmunológica en la gestación de tipo burdégano es menor en comparación con la gestación de tipo mular y la de tipo equino, por lo tanto, la vida media de las copas es mayor y consecuentemente la secreción de eCG también se extiende por más tiempo (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009).

4.5. Cuerpo Lúteo

El cuerpo lúteo es una glándula temporal que se desarrolla en el ovario a partir de un folículo recién ovulado. Esta glándula tiene como función la síntesis y secreción de progesterona para el mantenimiento de la gestación. El cuerpo lúteo se mantiene funcional gracias al estímulo de la LH y de otros factores, como la prostaglandina F_{2α}, el IGF (factor de crecimiento parecido a la insulina), el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), así como la gonadotropina coriónica equina (Niswender *et al*, 2000; Gigli *et al*, 2006; Webb *et al*, 2002; Al-zi'abi *et al*, 2003).

4.5.1. Desarrollo del cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo se forma a partir de un folículo previamente estimulado por las gonadotropinas hasta el punto de llegar a una ovulación. Este proceso tiene como resultado que el folículo se rompa permitiendo la salida del ovocito y líquido folicular. El espacio dejado por el líquido folicular se llena con sangre, líquido extravasado y células foliculares, que dan origen a un cuerpo lúteo que puede sintetizar y secretar progesterona (Niswender *et al*, 2000; Gigli *et al*, 2006).

En el folículo, las células que se encuentran dentro y fuera del mismo, como las células de la granulosa y de la teca interna, son las encargadas de producir estrógenos y andrógenos respectivamente. Las células de la teca contienen las enzimas que producen andrógenos a partir de colesterol, pero no tienen la enzima aromatasa necesaria para convertir los andrógenos a estrógenos, de esto se encargan las células de la granulosa (Niswender *et al*, 2000; Gigli *et al*, 2006).

En las especies domésticas la hormona luteinizante permite la luteinización de las células de la granulosa y de la teca, inactivando a la enzima 17-alfa-hidroxisilasa que es la que permite que la progesterona continúe siendo procesada para formar andrógenos. De esta forma, a partir del pico preovulatorio de LH el producto principal de las células foliculares será progesterona; Sin embargo, en algunas especies el cuerpo lúteo además de producir progesterona produce estradiol, como en el caso de las vacas, ratas, cerdos (Díaz et al, 2002; Niswender *et al*, 2000) y equinos (Daels et al, 1989)

Una vez que se luteinizan estas células por la LH, se generan dos tipo de células, las células lúteas grandes que proceden de las células de la granulosa y las células lúteas chicas que proceden de las células de la teca. En el caso de las yeguas las células de la teca sufren atresia y las principales células lúteas secretoras de progesterona son las células lúteas grandes (Harrison, 1946; Niswender *et al*, 2000).

El colesterol que utiliza la célula se transporta a través de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Cuando la LDL se une a su receptor en la membrana de la célula esteroidogénica se internaliza por medio de endocitosis. Posteriormente los endosomas y los lisosomas se encargan de separar el colesterol de las lipoproteínas. Una vez que el colesterol se encuentra libre en el citosol puede ser utilizado directamente para la esteroidogénesis, puede utilizarse también para la formación de la membrana celular o puede ser esterificado y almacenado.

Para la ruta de la esteroidogénesis, el primer paso es obtener colesterol libre a partir del colesterol esterificado almacenado en la célula, para lo que actúa una enzima llamada colesterol-esterasa. El colesterol libre en el citosol debe entrar a la membrana de la mitocondria interna para su conversión en pregnenolona. El proceso de transporte del colesterol hacia el interior de la membrana mitocondrial interna se lleva a cabo por la proteína StAR, la cual en las células esteroidogénicas del folículo o del cuerpo lúteo es estimulada por la LH (Díaz et al, 2002; Niswender *et al*, 2000).

Ya dentro de la mitocondria el colesterol es procesado por la enzima P-450_{SCC}, que corta la unión entre los carbonos 20 y 22 del colesterol para formar pregnenolona, la que sale de la mitocondria para dirigirse al retículo endoplásmico liso, donde se encuentra el complejo

enzimático 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3β -HSD), que convertirá de pregnenolona a progesterona (Watson et al, 2000; Stococco et al, 2007; Díaz et al, 2002; Niswender *et al*, 2000).

4.5.2. Cuerpo Lúteo Primario

El cuerpo lúteo primario se origina a partir de la ovulación del folículo debido a la secreción del pico preovulatorio de LH durante el estro y a la secreción tónica de LH una vez ocurrida la ovulación. Una vez formado este cuerpo lúteo, tiene una alta afinidad por la LH, gracias a lo cual aunque las concentraciones de esta hormona en suero son muy bajas durante el diestro, son suficientes para mantener el cuerpo lúteo funcionando y por lo tanto para mantener la secreción de progesterona (Gigli et al, 2006; Saint-Dizier, 2003; Squires et al, 1974).

Si no hay una lisis debida a la secreción de prostaglandina F2 alfa en el día 15-16 del diestro la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo primario puede mantenerse hasta el día 140 de la gestación. En la yegua gestante, el cuerpo lúteo primario, que no se lisó por las prostaglandinas, continúa funcionando en forma más o menos estable, pero alrededor del día 35 de la gestación incrementa en peso y su secreción de progesterona en respuesta al inicio de la secreción de gonadotropina coriónica equina (Gigli et al, 2006; Squires et al, 1974).

4.5.3. Cuerpos Lúteos Suplementarios

Los cuerpos lúteos suplementarios incluyen a los cuerpos lúteos secundarios y cuerpos lúteos accesorios. Ambos se forman en yeguas gestantes debido a que la secreción cíclica de FSH cada 10-12 días durante la gestación permite el desarrollo de folículos dominantes, y a partir del día 35 de la gestación la secreción de la eCG puede provocar la ovulación de uno de dichos folículos y formar un cuerpo lúteo secundario, o puede provocar la luteinización de un folículo anovulatorio para formar un cuerpo lúteo accesorio, proceso que puede continuar durante varias semanas durante las cuales se acumula gradualmente un mayor número de cuerpos lúteos suplementarios (Urwin y Allen, 1982; Squires et al, 1974a y c; Allen, 2000; Allen, 2005; Boeta et al, 2010).

4.5.4. Producción y secreción de progesterona

La secreción de progesterona al inicio del diestro aumenta a niveles mayores de 1 ng/ml en suero desde el día 1 pos-ovulación, llegando a un máximo alrededor del día 10 del diestro. En la hembra no gestante las concentraciones de progesterona se reducen abruptamente a niveles menores a 1 ng/ml en el día 14 debido a la lisis del cuerpo lúteo (Squires et al, 1974).

En la yegua gestante el cuerpo lúteo continúa funcionando después del día 14, pero las concentraciones de progesterona se reducen gradualmente a partir del día 19 de la gestación. Sin embargo, alrededor del día 35 de la gestación se produce un marcado aumento en las concentraciones de progesterona, que coinciden con el inicio de la secreción de la eCG. Cuando la eCG estimula al cuerpo lúteo primario para seguir produciendo progesterona se dice que se produce el rescate o resurgimiento del cuerpo lúteo (Squires et al 1974).

Además de rescatar al cuerpo lúteo primario, la eCG estimula la generación de nuevos cuerpos lúteos, denominados suplementarios, lo que sucede entre el día 40 y 60 de la gestación. De esta manera se incrementan aún más las concentraciones de progesterona en sangre. Sin embargo, después del día 120 de la gestación las concentraciones de progesterona se reducen drásticamente hasta niveles basales debido a que la secreción de eCG, que mantenía funcionando a los cuerpos lúteos, desaparece en este tiempo por la destrucción de las copas endometriales. (Squires et al 1974).

La secreción de progesterona está influenciada por el tipo de gestación debido a las diferencias en el patrón de secreción de eCG en cada una de ellas. En el caso de gestación mula, la secreción de progesterona declina alrededor del día 77; mientras que en la del burdégano se incrementa rápidamente desde el día 49 hasta el día 63, llegando a tener valores de 100 a 300 ng/ml; posteriormente estas declinan hasta el día 120. (Stewart y Allen, 1981).

Estas discrepancias en las secreciones de progesterona se deben a la cantidad de cuerpos lúteos que presenta cada gestación. Por ejemplo, Stewart y Allen (1981), observaron que en las gestaciones de tipo equino, mular y burro solo presentaron 2 o 3 cuerpos lúteos; en

contraste con lo encontrado en la gestación de tipo burdégano donde se presentaron más de 5 cuerpos lúteos por ovario, lo que se correlaciona con las altas concentraciones de progesterona en este tipo de gestación.

Figura 12. Concentraciones de gonadotropina coriónica y progesterona en las diferentes gestaciones equinas. (Tomado de Stewart y Allen, 1981)

GESTACION				
	Caballo	Mula	Burro	Burdégano
Pico de eCG (UI/ml en suero)	112.6 ± 17.4	26.4 ± 5.9	27.4 ± 5.9	161.4 ± 14.7
Progesterona (UI/ml Plasma)	9.7 ± 0.54*	9.8 ± 1.2«	12.2 ± 0.95«	160.0 ± 21.9*

Para *semanas 6 y 17 y «semanas de 6 y 11 de la gestación

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales

Los equinos utilizados durante el estudio permanecieron confinados en el antiguo Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrícola y Ganadera (CEIEPAG), Rancho “San Francisco” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en Chalco, Estado de México.

Para el desarrollo del estudio se utilizaron animales criollos, 11 yeguas (*Equus caballus* ♀) con una edad que oscilo entre los 5 y 10 años y con un peso aproximado de 270 kg; 11 burras (*Equus asinus* ♀) con una edad de 7 y 9 años y un peso aproximado de 150 kg; un garañón (*Equus caballus* ♂) de 8 años con un peso de 250 kg y un burro (*Equus asinus* ♂) con un edad de 9 años y un peso de 300 kg.

Todos los animales se diagnosticaron clínicamente sanos después del examen físico general y presentaron una condición corporal de 2.5 según la escala de Martin-Rosset, 1983. Durante el estudio los équidos recibieron agua *ad libitum* y una dieta de heno de avena, alfalfa achicalada y concentrado comercial con 12% de proteína. El estudio se inició entre los meses de abril y mayo (inicio de la época reproductiva), para ello los animales se distribuyeron en dos grupos: el grupo de yeguas que se inseminaron con semen de burro se llamó gestación mular y el grupo de burras que se inseminaron con semen de caballo se llamaron gestación burdégano.

5.2. Inseminación artificial

Previo a la inseminación, cada hembra se sometió a un examen del aparato reproductor para verificar la ausencia de condiciones patológicas detectables.

Cada hembra se insemino en el momento del estro cuando se observaron folículos de más de 35 mm de diámetro. Para ello, se colectó el semen de burro o garañón mediante una vagina artificial tipo “Missouri”, se evaluó macroscópicamente (color, pH y volumen del eyaculado), se cuantificó (la concentración espermática en un hematocitómetro) y se administró por vía vaginal una concentración aproximada de 500×10^6 espermatozoides/ml (Boeta y Zarco, 2000). 24 horas después de la inseminación se verificó por ultrasonografía

la presencia de un cuerpo hemorrágico en cada hembra y solo aquellas que cumplieron con este requisito se incluyeron en el estudio.

Con este procedimiento solo una burra quedó gestante, mientras que en el grupo de yeguas todas quedaron gestantes.

5.3. Diagnóstico de gestación y actividad ovárica

El diagnóstico de gestación se realizó a partir del día 15 post-ovulación utilizando para ello un ultrasonido de tiempo real (ALOKA-210, echo cámara SSD-506; Aloka Co., LTD, Tokio, Japón,) equipado con un transductor de 5 MHz.

5.4. Determinaciones hormonales

5.4.1. Muestras

Una vez que se diagnosticaron gestantes los animales, se tomaron muestras sanguíneas a partir de la 5ª semana hasta la 18ª semana de gestación mediante la punción de la vena yugular y utilizando tubos con vacío que contenían gel activador de la coagulación. El suero se obtuvo previa centrifugación de las muestras a 1500 x g durante 10 min y una vez recuperado se conservó a -20°C hasta su análisis.

5.4.2. Progesterona

La concentración de progesterona en las muestras de suero colectadas desde la 5ª hasta la 18ª semana de gestación se determinó con un radioinmunoensayo en fase sólida utilizando el estuche comercial Coat-Count Progesterone (Siemens Medical Systems) El sistema presentó un coeficiente de variación de 4.1% intra-ensayo y 7.3% inter-ensayo.

Es de resaltar que debido a las altas concentraciones de progesterona presente en el suero de la gestación de tipo burdégano fue necesario realizar diferentes diluciones del suero hasta obtener valores de progesterona en el rango de la curva de referencia.

5.4.3. Gonadotropina Coriónica Equina

La determinación de CG en la gestación de tipo mular se inició desde la 6ª hasta la 13ª semana, mientras que para la gestación de tipo burdégano se analizaron únicamente las

muestras colectadas durante la 6^a hasta la 18^a semana de gestación. Para ello se desarrolló un inmunoensayo comercial (EIA-1298 PMSG-ELISA, DRG Instruments, Marburg, Germany) en placas de micro-titulación. El sistema presentó un coeficiente de variación intra-ensayo de 0.73%.

5.5. Obtención y purificación de la eCG

5.5.1. Preparación de la muestra

La gonadotropina coriónica presente en la gestación de tipo mular como en la gestación de tipo burdégano se obtuvo del suero a partir de las muestras sanguíneas colectadas desde la 6^a hasta la 11^a semana de gestación en donde previamente se monitoreo la mayor concentración inmunológica para CG.

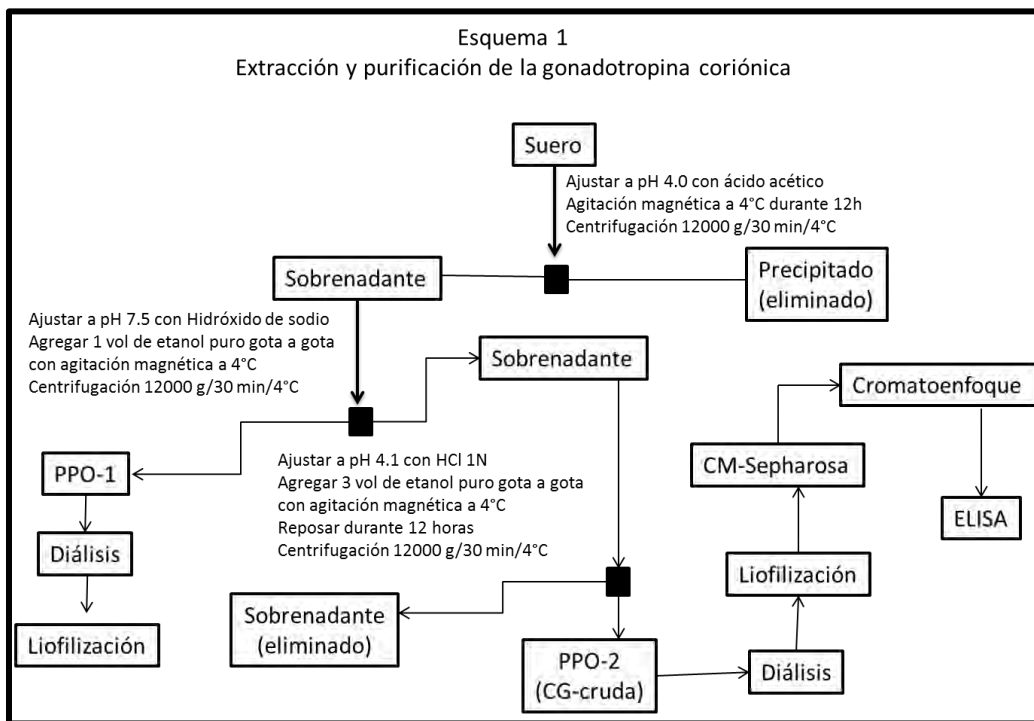
La CG en la gestación de tipo mular se extrajo de la mezcla de sueros de 11 yeguas, mientras que para la purificación de la CG de tipo burdégano se utilizó únicamente del suero de una burra.

La mezcla de sueros de cada gestación se agruparon de forma independiente y con el fin de eliminar proteínas del suero con un peso molecular menor a los 14,000 daltones, rango que no incluye a la eCG, se dializaron en una membrana con límite de exclusión de 12 a 14,000 daltones (Spectra/Por, #4, Spectrum ®; Spectrum laboratorios, Inc) por un periodo de 24 h con cambios de agua desionizada cada 3h, y al termino se liofilizaron (Labconco Free-Zone 12). Con este procedimiento se recuperó un total de 11.55 g de suero liofilizado para la gestación mular y 1.97 g de suero para la gestación del burdégano.

5.5.2. Extracción de eCG cruda

La extracción de la CG del suero de cada tipo de gestación se obtuvo mediante el método descrito por Schams y Papkoff (1972), modificado por Aggarwal y colaboradores (1980). Para ello, 11.55 g de suero liofilizado de gestación mular y 1.97 g de suero de gestación de tipo burdégano se resuspendieron en 140 ml y 40 ml de agua desionizada, respectivamente. Cada suero resuspendido recibió gota a gota ácido acético glacial concentrado hasta que se ajustó a pH 4.0. Concluido este paso, las muestras se conservaron en agitación durante 12 h a 4°C y después se centrifugaron a 12,000 x g durante 45 min a 4°C; el precipitado obtenido de cada muestra se descartó, mientras que los sobrenadantes se ajustaron a pH 7.5

con hidróxido de sodio (1N) e inmediatamente se les añadió gota a gota un volumen de etanol a 4°C en agitación constante. Concluido este proceso, cada mezcla se conservó en agitación mecánica durante 30 min y al final se centrifugo bajo las condiciones antes descritas. Cada precipitado etanólico (denominado PPO-1) se resuspendió en agua desionizada, se dializó y liofilizó para su posterior análisis. Por su parte, cada sobrenadante se ajustó a pH 4.1 aplicando ácido clorhídrico (HCl) 1N e inmediatamente recibió gota a gota tres volúmenes de etanol en agitación constante a 4°C. Concluido este paso, cada mezcla se conservó en reposo durante 24 h y el precipitado designado extracto crudo de CG, se recuperó previo sifoneo del sobrenadante y se resuspendió en agua desionizada, se sometió a diálisis durante 24 h con cambios de agua cada 3 h. Una vez concluida la diálisis, la muestra se liofilizó. De este paso de extracción se recuperaron 490 mg de polvo en la gestación mular con una concentración de proteína de 578 µg de proteína/mg de polvo; mientras que en la gestación de tipo burdégano se recuperó únicamente 30 mg de polvo con una concentración de 1.03 mg de proteína /mg polvo. El esquema 1, resume el procedimiento.



5.5.3. Purificación de la eCG

El extracto crudo de CG obtenido durante la extracción del suero de ambas gestaciones se purificó de forma independiente en columnas de vidrio empacadas con el intercambiador iónico, CM-Sepharosa 6B (Pharmacia, Biotech), de acuerdo al procedimiento descrito para gonadotropinas de rumiantes (Perera et al., 2004).

En breve, 140 mg de proteína de CG cruda de la gestación mular y 30.0 mg de proteína de la gestación de tipo burdégano se resuspendieron en 25 y 9 ml de acetato de amonio 0.05M, pH 5.1 (amortiguador de corrida), respectivamente.

El material insoluble después de 24 h de agitación a 4°C se descartó por centrifugación a 12000g/30 min/4°C y únicamente 10.5 ml que contenían 70 mg de proteína del extracto crudo de CG de la gestación de tipo mular se aplicó a la columna de intercambiador iónico; mientras que para la CG cruda de la gestación de tipo burdégano se utilizó el volumen total. Una vez que se colocó la muestra en cada columna se eluyeron con un gradiente de acetato de amonio que se inició con 0.05M (pH 5.1), le continuó el 0.1M (pH 6.8) y finalizó con 1.0M-Gly 0.1M (pH 9.5). Las proteínas retenidas en la columna y que no eluyeron con el gradiente de acetato de amonio se recuperaron después de aplicar una solución de NaCl 1M.

En cada corrida cromatográfica se colectaron de fracciones de 2 ml y la proteína se monitoreo por espectrofotometría a 280 nm. Una vez que concluyó la corrida cromatográfica y se analizó su patrón de elución, los picos de proteína se agruparon de acuerdo al amortiguador con el que eluyeron. Un pico de proteína presente con el primer amortiguador que se denominó CM-1ab; con el segundo amortiguador se obtuvieron dos picos de proteína denominados CM-2ab, CM-2cd para la gestación mular y uno para la gestación tipo burdégano (CM-2ab); finalmente con el tercer amortiguador se obtuvo en ambas gestaciones un pico de proteína que se asignó como CM-3ab. Una vez agrupadas los distintos picos de proteína se dializaron y liofilizaron como se indicó previamente.

5.6. Heterogeneidad Molecular

Para el análisis de la heterogeneidad molecular de la GC se tomaron solo aquellas fracciones colectadas de la cromatografía de intercambio iónico (CM-Sepharosa) que presentaron la mayor concentración inmunológica a eCG. A saber, para la gestación de tipo burdégano la proteína correspondió a la fracción obtenida a pH 6.8 (CM-2ab), mientras que

en la gestación tipo mular la proteína analizada fue la eluída a pH 9.5 (CM-3ab). Cada fracción se analizó tomando como base la carga eléctrica de la proteína y para ello se desarrolló el cromatoenfoque (Perera *et al*, 2008).

5.6.1. Cromatoenfoque

La fracción de proteína seleccionada en cada tipo de gestación se resuspendió en amortiguador límite (Pharmalyte, pH 8.0–10.5, Pharmacia Biotech AB, Uppsala Suecia) diluido 1:45 y ajustado a pH 7.0 con HCl 5N.

Una vez que se resuspendió la proteína en el amortiguador, se aplicó a una columna de vidrio (27 cms X 0.7 cms de diámetro interno) pre-empacada con una resina de intercambio iónico (PBE-118, farmacia) equilibrada previamente con 20 volúmenes de 25 mM de trietilamina-HCl a pH 11.0 y conservada a 4°C.

Antes de cada corrida cromatográfica y previo a la deposición de la muestra en la columna, esta recibió 3 ml de amortiguador límite con el fin de evitar la exposición de la muestra a un pH extremo y una vez que se colocó la muestra, se eluyó con el amortiguador límite, aplicando un flujo de 7 ml/h y se colectaron fracciones de 2 ml.

Durante la elución de la proteína a cada fracción recuperada se le determinó el pH (713 pH Meter, Methrom) y una vez que se detectó el pH 7.0 en más de diez fracciones consecutivas, se realizó el cambio de amortiguador por el Polybuffer 74 (Pharmacia, Biotech AB, Uppsala, Suecia) diluido 1:8 y ajustado a pH 3.5 con HCl 5N. De forma similar, cuando se presentó el pH de 3.5 en más de diez fracciones, se sustituyó este amortiguador por una solución de cloruro de sodio a una concentración de 1M con el propósito de obtener todas aquellas proteínas que no se desprendieron con el gradiente de pH.

Finalmente, una vez determinado el gradiente de pH y el patrón de elución de la proteína a 280 cada fracción se neutralizó. Aquellas fracciones obtenidas entre un pH de 10.5 a 7.0 se neutralizaron con 200 µl de TRIS-HCl 1.1 M, mientras que las fracciones con un pH de 6.5 a < 3.5 y las obtenidas con NaCl 1M se neutralizaron con 200 µl de Imidazol 1.1 M. Una vez que las muestras se neutralizaron se agruparon por unidad de pH y se dializaron y liofilizaron como se indicó previamente.

5.7. Caracterización de la Gonadotropina Coriónica

5.7.1. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en cada productos obtenido durante extracción y purificación de la CG se determinó mediante el método de Bradford modificado (Bolang, 1991), utilizando albúmina sérica bovina como estándar (ver anexo 2). Cada fracción se analizó por duplicado.

5.7.2. ELISA

Una vez cuantificada la concentración de proteína en cada paso de extracción y purificación, se continuó con la determinación inmunológica en cada uno de ellos a través del sistema de inmunodiagnóstico ELISA siguiendo las especificaciones descritas por el proveedor.

Cada fracción se analizó tomando como referencia la concentración de proteína y los resultados se interpolaron en una curva B/B₀ desarrollada de PMSG en el rango de 12.5 a 800 mUI/ml. La curva mostró una dosis al 20 % de la relación B/B₀ de 46.2 mUI/ml, al 50 % de 164.9 mUI/ml y al 80% de 482.5 mUI/ml, respectivamente (ver anexo).

5.8. Análisis Estadístico

5.8.1. Hormonas

Dentro de cada tipo de gestación se compararon las concentraciones de progesterona y eCG presentes en las diferentes semanas de la gestación utilizando para cada hormona y tipo de gestación un análisis de varianza de un factor (semana de gestación), seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para identificar aquellas semanas en las que las concentraciones de la hormona evaluada fueran estadísticamente diferentes a las concentraciones determinadas en la semana en la que se presentaron las máximas concentraciones de la hormona (pico de producción). El modelo incluyó el tipo de cruce y el tiempo (semanas de gestación) como los factores principales, sin considerar la interacción.

5.8.2. Isoformas

Se comparó la cantidad de isoformas de eCG presentes en el suero de la gestación interespecie de tipo burdégano y en el suero de la gestación de tipo mular; para esto se realizó una t de Student para dos muestras independientes.

La concentración de CG por mg de proteína en cada isoforma y la cantidad total de eCG obtenida de cada isoforma se comparó entre tipos de gestación mediante la prueba de “ t de Student”.

Finalmente, para el análisis la distribución de las isoformas de la CG de las dos gestaciones se recurrió a agrupar de acuerdo al valor de pH con el cual eluyeron. Así, se obtuvieron tres tipos de isoformas de CG: básicas ($\text{pH} > 7.5$), neutras ($6.5 > \text{pH} < 7.5$) y ácidas ($\text{pH} < 6.5$).

Para comparar este patrón de distribución se utilizó el porcentaje de CG presente en cada isoforma con respecto a la cantidad total de CG obtenida. Sin embargo, debido a que la información se expresa en porcentajes se realizó una transformación a Arcoseno, para obtener una distribución normal y una homogeneidad de varianzas. El análisis estadístico de los datos se realizó con los valores transformados, sin embargo, en el escrito se presentan los datos crudos obtenidos de la retransformación con el inverso del arcoseno. Para comparar el porcentaje de las isoformas de eCG obtenidas durante la gestación de tipo burdégano y mular se utilizó un análisis de varianza de dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Se realizó, además, una prueba post-hoc para determinar la existencia de una tendencia lineal en el patrón de distribución de las isoformas con respecto al cambio en el pH de elución. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.)

6. RESULTADOS

6.1. Concentraciones hormonales de progesterona y gonadotropina coriónica

6.1.1. Gestación tipo Mular

Las concentraciones de progesterona y gonadotropina coriónica en el suero de yeguas inseminadas con semen de burro se presentan en la figura 14. La máxima concentración de progesterona se alcanzó en la 6ª semana y permaneció en concentraciones similares hasta la 12ª semana de la gestación. A partir de la 13ª semana y hasta el final del muestreo se presentó una disminución ($p < 0.05$) en la concentración de progesterona con relación a los niveles observados durante la 5ª y 12ª semana de gestación. Por su parte, la concentración de gonadotropina coriónica mostro su máximo nivel en la 7ª semana de la gestación que se conservó hasta la 8ª semana, tiempo después la concentración disminuyó a niveles basales (2ng/ml).

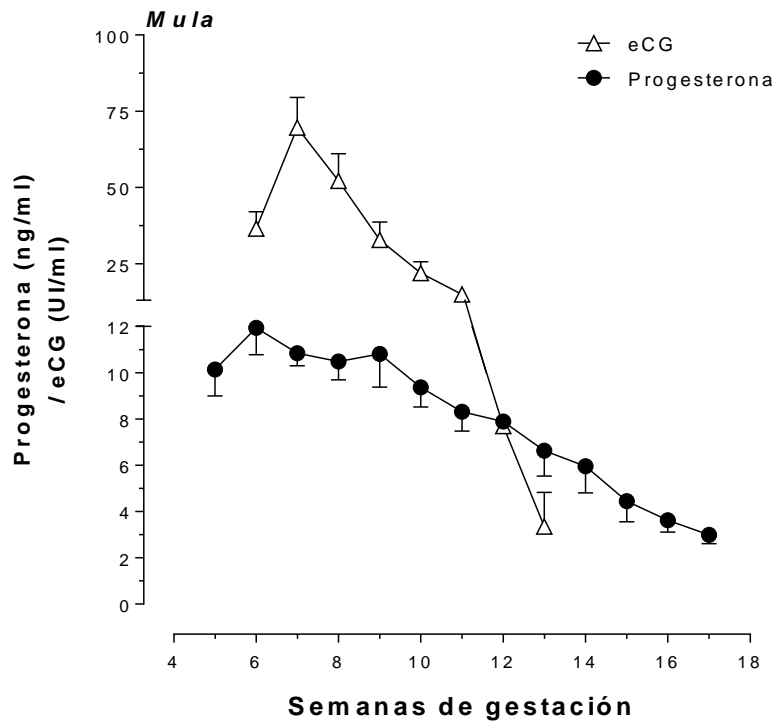


Figura 14. Concentraciones de progesterona y eCG en el suero de gestación de tipo mular. Los puntos representan el promedio de 11 yeguas \pm EE. Las concentraciones hormonales se compararon mediante un análisis de varianza de una vía seguida de comparaciones múltiples de Bonferroni, tomando como referencia el pico de concentración de la hormona; semana 7 para eCG y semana 6 para progesterona.

7.2.2. Gestación tipo burdégano

Debido a la baja tasa de fertilidad que se obtuvo en este tipo de gestación, los resultados descritos en este estudio corresponden al patrón de concentraciones de progesterona y de la gonadotropina coriónica de una sola hembra gestante.

Las concentraciones de progesterona en este tipo de gestación se analizó a partir de la 5ª semana de gestación, con una concentración de 23.2 mg/ml, concentración que se incrementó casi 10 veces (226 ng/ml) en la 7ª semana y que prosiguió aumentando hasta llegar cerca de 2000 ng/ml en la 18ª semana.

La gonadotropina coriónica a la 6ª semana presento una concentración de 269 UI/ml que no se modificó en la 8ª y 10ª semana, a partir de la cual se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) desde la 12ª semana hasta el final del estudio, como se aprecia en la figura 15.

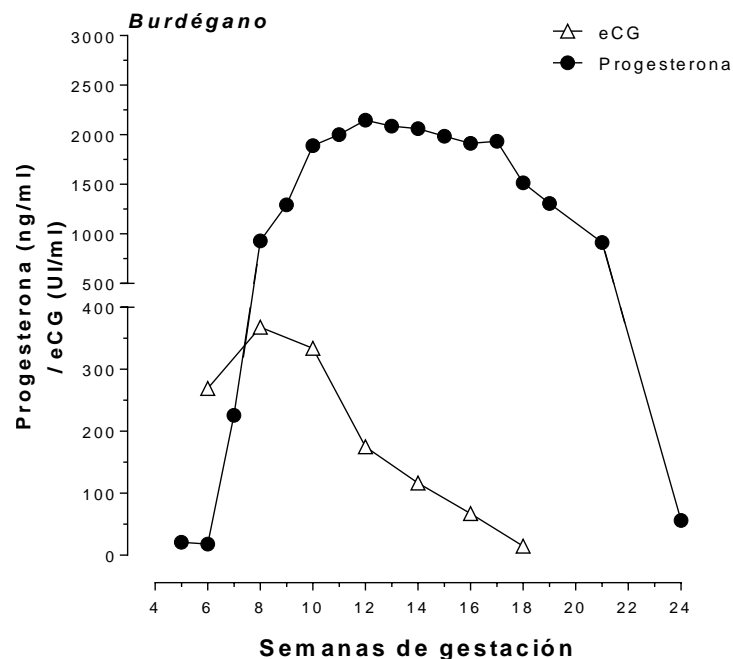


Figura 15. Concentraciones de progesterona y eCG en el suero de gestación de tipo burdégano. La concentración de cada hormona de cada semana se comparó mediante un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, tomando como referencia el

pico de producción de la hormona (semana 8 para eCG y semana 12 para progesterona). Cada punto de las curvas se determinó por duplicado.

7.3. Extracción de la Gonadotropina Coriónica

Durante el proceso de extracción de la gonadotropina coriónica del suero se recuperaron dos fracciones de proteínas. Una fracción de proteína obtenida a pH 7.0 y precipitada con el 33% de etanol, denominada precipitado 1 (PPO-1) que representó el mayor porcentaje de proteína con el 42.9% en el suero de gestación de tipo mular y el 48.5% en el suero de gestación de tipo burdégano. Esta fracción en ambas tipo de gestación no mostró actividad inmunológica a CG.

La segunda fracción proteica se obtuvo a pH 4.1 con el 85% de etanol, fracción denominada gonadotropina coriónica cruda (CG-cruda); esta fracción representó el 8.2% y 1.3% de la cantidad total de proteína con la que se inició la extracción de la CG en la gestación de tipo burdégano y de tipo mular, respectivamente. A diferencia de la primera fracción de proteína, en esta segunda fracción se presentó la mayor concentración inmunológica de CG. El cuadro 1 resume la cantidad de proteína (mg/ml) y la actividad específica de CG (UI/mg de proteína) durante el proceso de extracción.

Cuadro 1. Cantidad de proteína y actividad específica de CG en las diferentes fracciones de proteína obtenidas durante la precipitación etanólica del suero de las gestaciones de tipo mular (M) y de tipo burdégano (B)

Producto	Proteína (mg/ml)*		Actividad Específica (UI de CG/ml)**	
	M	B	M	B
Suero	1.8	1.3	62.9	1.6
PPO-1	1.2	1.0	ND	ND
eCG cruda	0.6	0.3	1.87	96.8

*Estimado por el Método de Bradford

** Estimado por ELISA

ND: No Detectable

7.4. Purificación de la Gonadotropina Coriónica

Como se observó la fracción denominada CG cruda en ambos tipo de gestación presento la actividad específica para gonadotropina coriónica por ello, con el propósito de obtener una CG con mayor pureza se purificó en el intercambiador CM-Sepharosa.

Con la aplicación del gradiente de acetato de amonio, la fracción CG obtenida del suero de la gestación de tipo mular (Fig. 16-A) se distribuyó a lo largo del gradiente en cuatro fracciones de proteína, donde la fracción colectada con acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 (CM-2ab) representó el 44.8% de proteína total, con una actividad específica de eCG de 4.71 UI/mg de proteína, mientras que la segunda fracción eluída con el mismo amortiguador (CM-2cd) presentó un porcentaje de recuperación menor (1.42% de proteína) y la mayor actividad específica a eCG de 32.7 UI/mg de proteína.

La fracción obtenida con acetato de amonio 1.0 M a pH 9.5 (CM-3ab) presentó el 1.8% de recuperación con 24 UI de eCG/mg de proteína y la fracción obtenida con NaCl 1M represento únicamente el 0.27% de proteína con 4.1 UI/de eCG/mg de proteína. Durante este paso de purificación se presentó una recuperación del 49% de la proteína total.

La fracción CG cruda obtenida del suero de la gestación de tipo burdégano (16-B) se distribuyó durante su purificación en cuatro fracciones de proteína, siendo la fracción colectada con acetato de amonio 0.1M, pH 6.8 (CM-2ab) la que presentó el mayor porcentaje de recuperación de proteína con el 2.2% y la mayor actividad específica a CG con 292 UI/ml, le continuó la fracción eluída con acetato de amonio 1.0 M a pH 9.5 (CM-3ab) con 29.9 UI de eCG/ml y un rendimiento del 0.67%. El cuadro 2 resume los resultados.

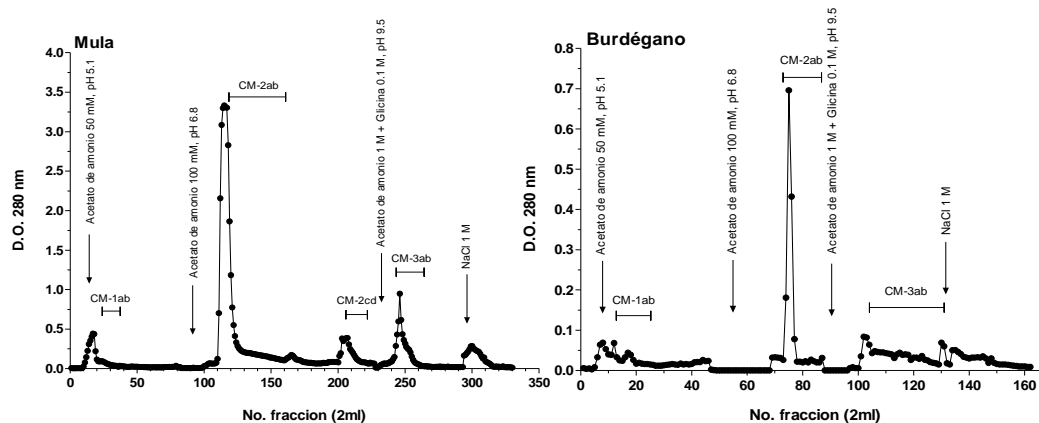


Figura 16. Patrón de elución de la eCG cruda obtenida del suero de gestación mular y de tipo burdégano. Ambas fracciones se purificaron en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa) en una columna (1.5 cms de diámetro x 27 cm de longitud) equilibrada previamente con acetato de amonio 50 mM pH 5.1 y con un flujo de 23ml/h. La fracción no retenida en la columna que se denominó CM-1ab eluyó con el amortiguador de equilibrio, mientras que las fracciones CM-2ab y CM-2cd se obtuvieron con acetato de amonio 0.1 M pH 6.8 y la fracción CM-3ab se obtuvo con acetato de amonio 1M más glicina 0.1M pH 9.5. Se colectaron fracciones de 2 ml y la presencia de proteínas en cada fracción se determinó por espectrofotometría a 280 nm.

Cuadro 2. Cantidad de proteína y actividad específica a CG de las fracciones obtenidas durante la purificación en CM-Sepharosa de la CG cruda obtenida durante la extracción del suero de las gestaciones de tipo mular (M) y de tipo burdégano (B).

Producto	Proteína Total (mg/ml)*		Actividad Específica (UI de CG/ml)**	
	M	B	M	B
CG cruda	0.6	1.0	1.87	96.8
CM-1ab	0.1	0.7	ND	17.3
CM-2ab	0.7	1.7	3.8	291.2
CM-2cd	0.5	ND	21.0	ND
CM-3ab	0.5	0.2	13.9	30.0
NaCl	0.4	ND	2.7	ND

*Determinación por el método de Bradford.

**Actividad inmunológica determinada por medio del ELISA

ND: No Detectable.

7.5. Heterogeneidad Molecular

Para identificar la heterogeneidad molecular de la CG de cada tipo de gestación en este estudio se utilizó la fracción de proteína obtenida durante la purificación en el intercambiador CM-Sepharosa con mayor actividad inmunológica. Para ello se desarrolló el sistema del cromatoenfoque y cada fracción de cada gestación se analizó bajo las mismas condiciones. Los patrones de elución de las fracciones CM-3ab de la gestación mular y la fracción CM-2ab para la gestación de tipo burdégano se presentan en la Figuras 17 y 18, respectivamente. Ambos cromatogramas muestran un patrón heterogéneo de proteínas identificadas por densitometría a 280 nm y agrupadas para su análisis por unidades de pH comenzando con la letra A para la fracción de proteína con pH más básico (10.6-10.2) hasta la fracción más ácida, denominada con la letra H (3.8-3.5), además se presenta la fracción S, obtenida después de la aplicación de NaCl 1M.

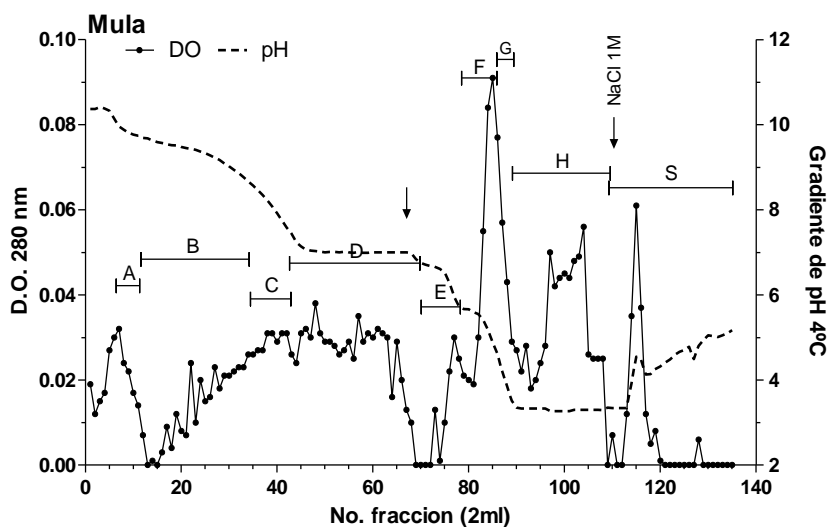


Figura 17. Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción rica en gonadotropina coriónica obtenida a partir de suero de gestación mular. Dos miligramos de proteína se aplicaron a la columna de intercambio iónico (PBE-118), equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y se colectaron 135 fracciones de 2 ml. Las flechas indican el momento de cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y después de la aplicación del NaCl 1M. La letra indica cada isoforma identificada a 280 nm, comenzando con la proteína de elución más básica (A) y concluyendo con la de elución más ácida (H).

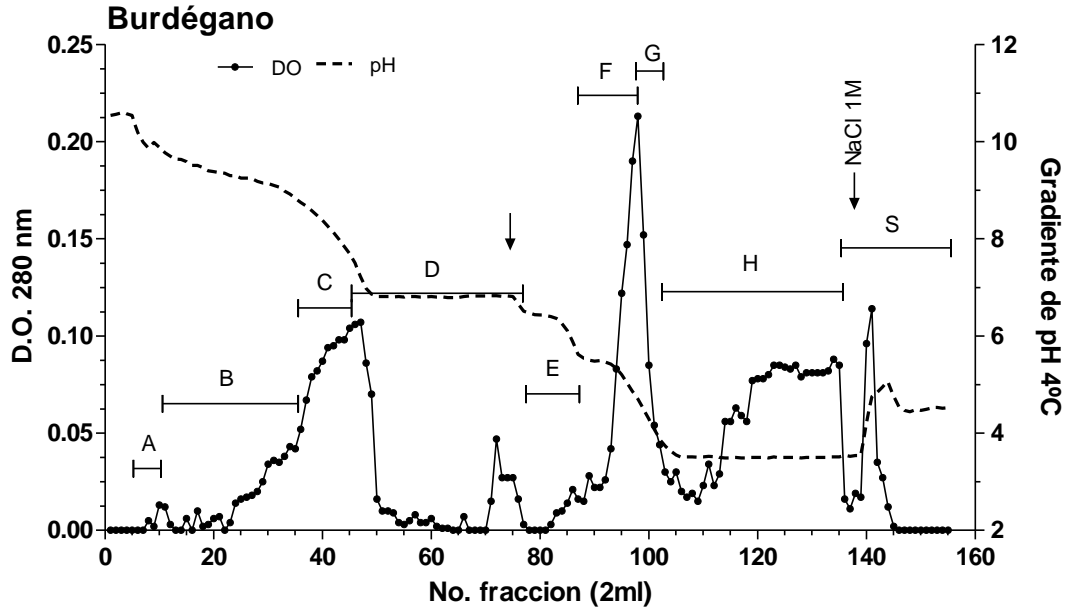


Figura 18. Patrón de elución y gradiente de pH de la fracción rica en gonadotropina coriónica obtenida a partir del suero de gestación de tipo burdégano. Diez miligramos de proteína se aplicaron a la columna de intercambio iónico (PBE-118), equilibrada previamente con 0.025 M de trietilamina-HCl, pH 11.0. La columna se eluyó con un gradiente de pH de 10.5-3.5 y se colectaron 155 fracciones de 2 ml. Las flechas indican el momento de cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y después de la aplicación del NaCl 1M, respectivamente. Cualquier pico de proteína fue codificado con una letra comenzando con la proteína más básica (A; pH 10.6-10.2) y concluyendo con la forma más ácida (H; pH 3.88-3.51). La proteína unida a la columna después de la elución de pH inferior fue eluida con 1M de NaCl y se designó como pico S.

La actividad específica para CG en las diferentes fracciones de proteína agrupadas por unidad de pH y recuperadas después de su repurificación en el cromatoenfoco se resumen en el cuadro 3. Aunque en ambos tipo de gestación la mayor actividad específica a CG de la fracción analizada en el cromatoenfoco se presentó entre pH 9.99 a pH 8.0, esta actividad fue mayor ($p < 0.05$) en el rango de 9.99 a 9.0 en la gestación de tipo mular, mientras que la mayor actividad de CG en la gestación de tipo burdégano se presentó en un rango menos básico (pH 8.99 a 8.0).

El porcentaje de la isoforma agrupada entre 7.99 a 7.0 no fue diferente entre grupos. Finalmente en el rango de pH ácido se identificaron tres isoformas en la gestación de tipo burdégano cuyo porcentaje fue superior ($p < 0.05$) cuando se comparó con la única isoforma identificada en la gestación de tipo mular.

Es importante señalar que la fracción obtenida con la aplicación de NaCl 1M, presentó una alta actividad inmunológica a CG en ambos casos.

En el análisis por grupo de isoforma (Fig. 19) mostro una alto porcentaje de isoforma de tipo básico de la hormona en ambos grupos, mientras que la proporción de isoformas neutras (30.4%) en la gestación de tipo mular fue superior ($p < 0.05$) al porcentaje observado en la gestación de tipo burdégano (10%). En contraste, el porcentaje de isoformas de tipo ácido en la gestación de tipo burdégano (23.3%) se incrementó ($p < 0.05$) cuando se comparó con la gestación mular (10.5%).

Por otro lado, la prueba de post-hoc para las isoformas presentes de eCG en la gestación de tipo mular demostró que existe una tendencia lineal en su producción, por lo que a mayor acidez menor proporción de isoformas ($p < 0.001$).

Finalmente un análisis global tomando como referencia el rendimiento total de CG y agrupado por grupo de pH en donde se incluyó a la fracción de proteína recuperada con 1M NaCl (pH 4.0), se observó en ambos tipos de gestación una distribución de tipo ácido con el 87.6% y del 97.84% de recuperación de CG para gestación de tipo mular y de tipo burdégano, respectivamente con una mínima proporción de isoformas básicas y neutras.

Cuadro 3. Promedio \pm EE de la actividad específica de las isoformas de eCG obtenidas del suero de las gestaciones de tipo burdégano (B) y mular (M).

Isoforma	Unidad de pH	Proteína Total (mg)*		Actividad Especifica (UI/mg de proteína)**		eCG Total (UI totales)	
		M	B	M	B	M	B
B	9.99-9.5-9.0	0.29	0.08	1.81 \pm 0.15 ^a	1.34 \pm 0.06 ^b	0.521	0.17
C	8.99-8.6-8.0	0.04	0.012	1.32 \pm 0.09 ^a	8.04 \pm 2.55 ^b	0.052	0.096
D	7.99-7.4-7.0	0.34	0.094	1.47 \pm 0.16	1.33 \pm 0.19	0.493	0.125
E	6.99-6.4-6.0	ND	0.094	ND	0.99 \pm 0.49	ND	0.093
F	5.99-5.5-5.0	ND	0.13	ND	1.17 \pm 0.24	ND	0.327
G	4.99-4.5-4.0	0.69	1.35	0.50 \pm 0.07 ^a	1.12 \pm 0.12 ^b	0.345	1.513
S	4.0	3.41	1.92	1.84 \pm 0.14 ^a	8.25 \pm 0.42 ^b	7.19	15.83

*Estimada por el método de Bradford.

**Estimada por ELISA

^{a, b} La concentración de las isoformas entre los tipos de cruce interespecie se comparó mediante una prueba *t* de Student para dos medias independientes.

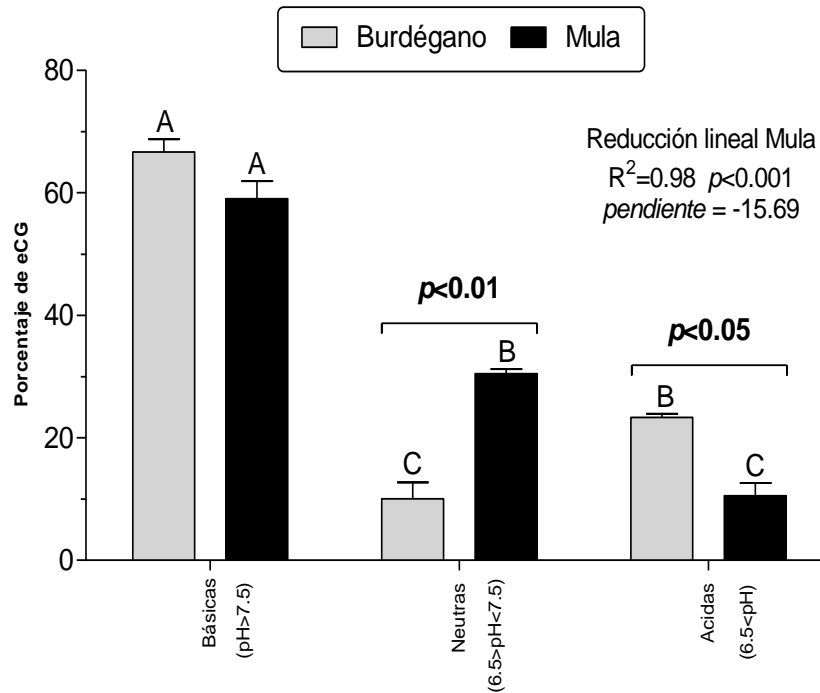


Fig. 19 Patrón de distribución del porcentaje de las isoformas de eCG de la gestación de las cruza interespecie agrupadas de acuerdo a su pH de elución. Los puntos representan la media \pm EE. La proporción de cada tipo de isoforma se comparó mediante un análisis de varianza de dos vías, incluyendo en el modelo a los factores principales pH y craza, seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Además, para la craza de tipo mula se utilizó una prueba post-hoc para determinar si existe una tendencia lineal en el patrón de distribución de isoformas con respecto al cambio en el pH de elución. Se consideró un nivel de $p<0.05$ como significativo. ND: No Detectable

8. DISCUSIÓN

La gonadotropina coriónica (CG) pertenece a la familia de las glicoproteínas. Esta hormona en particular es sintetizada y secretada por las copas endometriales (Allen y Stewart, 2001). Durante su proceso de síntesis la hormona sufre modificaciones post-traduccionales que conducen a la formación de múltiples formas moleculares o isoformas, que difieren en la composición de sus oligosacáridos, su vida media en circulación así como en su actividad biológica (Bousfield *et al*, 2001).

Aunque se conoce la presencia de esta familia de proteínas en la gonadotropina coriónica de origen equino y humano, la descripción del patrón de heterogeneidad molecular para esta hormona del suero proveniente de una gestación de tipo mular y de tipo burdégano se desconoce.

Es por ello que el presente trabajo se encaminó a ampliar el conocimiento de la heterogeneidad molecular de la CG utilizando como modelo la CG obtenida del suero de cruces de équidos inter-especie (gestación de tipo mular y de tipo burdégano), tratando de identificar el patrón de la heterogeneidad molecular de cada CG mediante el cromatofoco. Los resultados indicaron un patrón de distribución de tipo ácido en la CG purificadas de suero de ambas gestaciones. Además se describió la presencia de isoformas de tipo básico y neutro. Los resultados apoyan la hipótesis de la heterogeneidad molecular en las gonadotropinas que se amplía para la gonadotropina coriónica presente en el suero de gestaciones equinas interespecie.

Secreción Hormonal

El patrón de secreción de la progesterona y de la gonadotropina coriónica coincidió con lo previamente descrito (Stewart y Allen, 1981; Allen *et al*, 1993; Boeta y Zarco, 2005, 2010). Los niveles de estas hormonas en la gestación de tipo burdégano fueron más elevados que en la gestación de tipo mular. Esta diferencia en la concentración hormonal se debe posiblemente al prematuro rechazo inmunológico del endometrio materno hacia las copas endometriales en la gestación de tipo mular (Boeta y Zarco, 2005).

Los niveles altos de CG medidos en el suero de la gestación de tipo burdégano con respecto a la gestación de tipo mular se pueden explicar a que durante el proceso de síntesis de la

hormona se estén realizando cambios postraduccionales que incluya una mayor incorporación de oligosacáridos con terminaciones de ácido siálico que generen en esta proteína una menor tasa de recambio lo que conduzca a una mayor vida media en circulación, patrón de glicosilación que posiblemente no ocurra en la gestación de tipo mular. Aunque en este estudio no analizamos el porcentaje y tipo de oligosacáridos que conforman a este tipo de CG, existen reportes que indican que del peso molecular de la eCG un 45% corresponde a los oligosacáridos que contienen un 10.2% de ácido siálico terminal y que estas características le generan a esta hormona una vida media en circulación de 6 días (Allen, 2001), mientras que para la dCG del total de su peso molecular el 30% corresponde a los oligosacáridos que la conforman con un 6.8% de ácido siálico terminal, que le genera una vida media en circulación de un día (Agarwal *et al*, 1980).

Finalmente, no podemos descartar la posibilidad que las diferencias encontradas en los niveles de CG en ambos tipo de gestación se deba a los cálculos realizados a partir de la determinación de la actividad inmunológica mediante un enzimoimmunoanálisis específico para gonadotropina coriónica equina (eCG) que emplea para su desarrollo un anticuerpo monoclonal que podría no ser el sistema adecuado para detectar la CG circulante en la gestación de tipo mular.

Es posible también pensar que exista una similitud estructural entre la eCG y la proteína extraída del suero de la gestación de tipo burdégano que haga más eficiente la detección de CG en este tipo de gestación que en las gestaciones de tipo mular, debido posiblemente a un cambio en la estructura de la proteína, al tipo de oligosacáridos y/o epítopes no reconocidos por el anticuerpo, como fue reportado por Aggarwal y colaboradores (1980) en dos proteínas de eCG obtenidas del suero.

Extracción

Durante el proceso de extracción del suero de la gestación mular y de la gestación de tipo burdégano se precipitaron dos fracciones de proteína, la fracción obtenida a pH 7.0 con el 33% de etanol (R1) y la fracción obtenida a pH 4.1 y con el 85 % de etanol (CG-cruda). Estas dos fracciones obtenidas en el suero de ambos tipos de gestación nos permiten pensar en un método reproducible.

Como se esperaba la fracción denominada CG-cruda obtenida a pH 4.1 presentó la mayor actividad inmunológica a CG, confirmando la característica ácida de la CG. Un resultado previo utilizando suero equino demostró que esta segunda fracción proteica obtenida con el 85% de etanol a pH 4.0 corresponde a la eCG como se demostró en este estudio para la gestación de tipo mular y de tipo burdégano, indicando posiblemente una relación estructural entre este tipo de gonadotropinas.

Cuando se analizó la concentración inmunodetectable de la fracción CG-cruda, recuperada a pH 4.1 con el 85% de etanol, en ambos tipos de sueros extraídos se observó en la gestación de tipo burdégano una mayor actividad inmunológica en comparación a la gestación mular. Este cambio en concentraciones puede deberse al sistema de inmunoanálisis desarrollado en este estudio o bien a las características fisicoquímicas e inmunológicas de cada una de estas proteínas presentes en el suero que son reconocidas de forma particular el anticuerpo monoclonal correspondiente (Aggarwal *et al.*, 1980).

Sin embargo no podemos descartar la posibilidad de errores técnicos durante el desarrollo de la metodología, ya que durante su desarrollo particularmente en el suero de la gestación de tipo burdégano el procedimiento desarrollado mostro como por ejemplo una mala diálisis o contaminación en la columna de elución, es por esos motivos que los resultados probablemente tengan una serie de cuestiones no tanto de la metodología sino de su desarrollo.

Purificación

La fracción CG cruda de ambos tipos de gestación se purificó con el intercambiador catiónico CM-Sepharosa bajo condiciones similares a las descritas para la obtención de gonadotropinas de origen hipofisario (Perera *et al*, 2004). Dicho procedimiento permitió identificar tres fracciones de proteína perfectamente separadas con el gradiente de amortiguadores de acetato de amonio, patrón que coincidió al observado en este laboratorio durante la obtención de CG del suero equino (Meneses *et al*, 2012 datos no publicados) y al patrón reportado para eCG (Schams y Papkoff, 1972; Aggarwal *et al*, 1980) y dCG (Aggarwal *et al*, 1980), empleando en estos últimos al Sulfoethyl-Sephadex C-50 como intercambiador catiónico.

La presencia de CG inmunoreactiva se presentó en todas las fracciones colectadas durante la purificación de la hormona del suero de la gestación de tipo burdégano en la CM-sepharosa, desde pH 5.1 hasta 9.5, a diferencia de la gestación de tipo mular en donde la proteína únicamente se presentó en las fracciones eluidas a pH neutro (pH 6.8), básico (pH 9.5) y la fracción obtenida con cloruro de sodio 1.0 M. Aunque los resultados coinciden parcialmente con lo reportado para la purificación de la eCG (Schams y Papkoff, 1972; Aggarwal *et al*, 1980; Butnev *et al*, 1996; Meneses *et al*, 2012, datos no publicados) en donde se observa primordialmente la presencia de hormona inmunoreactiva a pH básico, en este estudio la mayor presencia de la proteína como se mencionó eluyó a pH neutro en ambos tipos de gestación. Esto posiblemente fue debido a la estructura parcial de la proteína, o bien al tipo de oligosacáridos que la conforman (Papkoff *et al*, 1978; Aggarwal *et al*, 1980; Matteri *et al*, 1986; Butnev *et al*, 1996; Bousfield *et al*, 2001), que son factores importantes de reconocimiento por su correspondiente anticuerpo. Es de destacar que el sistema de inmuno-detección utiliza un anticuerpo monoclonal dirigido exclusivamente contra eCG, por lo que la presencia de dCG podría no ser detectada adecuadamente.

Heterogeneidad Molecular

Se ha documentado que el cromatoenfoque es una herramienta metodológica con un alto poder resolutivo para diferenciar proteínas con diferentes puntos isoeléctricos (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995). Además con este método se ha logrado identificar en múltiples especies un diverso grupo de isoformas de gonadotropinas de origen placentario, pituitario y sérico, por ejemplo en la hCG (Lopata *et al*, 1997), LH y FSH humana (Ulloa-Aguirre *et al*, 1998; Castro-Fernández *et al*, 2000), LH bovina (Perera-Marín *et al*, 2005, 2008), LH y FSH equina (Matteri *et al*, 1986; Matteri y Papkoff, 1987, 1988) y LH caprina (Rojas *et al.*, 2007). Sin embargo, el empleo de esta herramienta metodológica para el análisis de la CG obtenida del suero de cruza intra e interespecie equinas no se ha descrito. Así, en este estudio se describe el patrón heterogéneo de carga para la CG purificada del suero de gestaciones inter-especie mediante el cromatoenfoque.

Los resultados del análisis de la CG mediante el cromatoenfoque por unidad de pH, análisis que incluyó la fracción de proteína obtenida con NaCl 1M, nos mostró de forma interesante

que la mayor cantidad de proteína inmunoreactiva a CG se recuperó en la fracción colectada después de la aplicación de NaCl 1M, solución que cuando eluyó presentó un pH ácido (menor a 4.0). Aunque este patrón totalmente ácido se ha descrito para la FSH de múltiples especies (Matteri *et al*, 1987; Kojima *et al*, 1995; Phillips *et al*, 1998; Ulloa-Aguirre *et al*, 1999; Perera-Marín *et al*, 2008) y para algunas isoformas de LH presente en el suero (Arrieta *et al*, 2006) como en extractos hipofisarios (Bousfield *et al*, 2008), no se puede descartar la posibilidad de un artefacto de la técnica como fue informado por Perera-Marín (2005) para la especie bovina, sin embargo, debemos mencionar que previo al análisis de la actividad inmunológica en esta fracción se dializó exhaustivamente para eliminar la gran cantidad de NaCl con que eluyó así como para eliminar los anfólitos que interfieren en el sistema de inmunodetección, por lo que podemos considerar que esta actividad reportada para esta fracción es de CG. Por lo tanto, los resultados apoyan al patrón de distribución ácido similar al patrón para la hCG (Lopata *et al.*, 1997).

Con el análisis por grupo de isoforma y no incluyendo en este análisis a la fracción obtenida con NaCl se logró identificar proteínas de tipo básica (isoforma B y C) a través del sistema de inmunoanálisis, cuyo un patrón de distribución en el cromatograma fue similar al descrito para la LH del suero de rumiantes durante el anestro (Rojas-Maya *et al*, 2007) estro y diestro (Perera-Marín *et al*, 2005; Arrieta *et al.*, 2006), datos que sugieren que se trata de una posible contaminación con LH; sin embargo, es de resaltar que el anticuerpo que emplea el sistema de diagnóstico es de tipo monoclonal y específico para eCG, luego entonces los datos recabados para este tipo de isoforma plantean la posibilidad que las isoformas de tipo básico de CG conserven una relación estructural con la LH, hormona que eluye principalmente a este pH. Por otra parte la CG purificada del suero de ambos tipos de gestación y analizada en el cromatograma presentó una isoforma de tipo neutro como se ha descrito en extractos de hipófisis y suero de rumiantes (Stumpf *et al*, 1992) y humanos (Stanton *et al*, 1996; Creus *et al*, 2001).

El análisis comparativo entre el porcentaje de isoformas fue mayor la proporción de isoformas básicas que de isoformas ácidas en la gestación de tipo mular, en contraste el patrón observado en la gestación de tipo burdégano denoto un mayor porcentaje de isoformas ácidas con relación a las básicas. Esta diferencia posiblemente se deba al diferente contenido de ácido siálico entre hormonas, o bien al número de residuos de

carbohidratos y/o estructura de la proteína, como se ha señalado previamente en eCG de dos lotes con actividad específica de eCG diferente (Aggarwal et al., 1980).

Aunque en este estudio no se logró determinar las características fisicoquímicas de cada isoforma así como su actividad biológica debido a su bajo rendimiento, en un intento de identificar la actividad biológica, se desarrolló el ensayo *in vivo* en ratas hembras prepúberes con resultados que indicaron que el grupo de isoformas básicas ligeramente incrementaron el tamaño ovárico con respecto al grupo testigo, mientras que el grupo de isoformas neutras inhibieron este crecimiento a un peso inferior al grupo control. En cuanto a isoformas de tipo ácido no se determinó y con gran desilusión no probamos la fracción obtenida con NaCl.

9. CONCLUSION

El trabajo desarrollo apoya la hipótesis de la heterogeneidad molecular en las gonadotropinas en particular en la gonadotropina coriónica del suero que se amplía para la CG presente en el suero de gestaciones equinas inter-especie. El patrón de distribución de ambas proteínas en el cromatoenfoco fue de tipo ácido. Se describe la presencia de proteínas de tipo básico y neutro para esta proteína. Contamos con la herramienta metodológica que nos permita alcanzar rendimientos adecuados de cada proteína para realizar estudios que aporten información sobre la estructura-función de cada isoforma.

10. REFERENCIAS

Aggarwal B, Farmer SW, Papkoff H and Seidel GE; "Biochemical properties of equine chorionic gonadotropin from two different pools of pregnant mare sera"; *Biology of Reproduction* 1980; No. 23; pp. 570-576.

Aggarwal BB, Farmer SW, Papkoff H, Stewart F, Allen WR. "Purification and characterization of the gonadotropin secreted by cultured horse trophoblast cells" *Endocrinology* 1980; 106; 6; pp.1755-9.

Aggarwal BB, Farmer WS, Papkoff H, Stewart F, Allen WR; "Purification and Characterization of donkey chorionic gonadotrophin"; *Journal Endocrinology* 1980; Vol. 85; pp. 449-455.

Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, Antczak DF; Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids; *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; Vol. 97: pp. 55-60.

Allen WR, Short RV; Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: Anything goes; *Journal of Heredity* 1997; vol. 8; pp. 384-392.

Allen WR; The Physiology of early pregnancy in the mare; *AAEP proceedings* 2000; vol. 46; pp. 338-354.

Allen WR; Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy; *Reproduction* 2001; Vol. 121; pp. 513-527.

Allen WR, Stewart F; Equine placentation; *Reproduction Fertility Development* 2001; Vol. 13; pp. 623-634.

Allen WR; Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare; *Animal Reproduction* 2005; vol. 2; no. 4; pp. 209-223.

Allen WR y Wilsher S; A review of implantation and early placentation in the mare; *Placenta* 2009; vol. 30; pp. 1005-1015.

Allen WR, Wilsher S; Persistent endometrial cups in the same mare in two successive pregnancies; *Equine Veterinary Education* 2011; vol. 24; no. 5; pp. 247-250.

Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM; Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum; *Reproduction* 2003; vol. 125; pp. 259-270.

Amir SM, Kasagi K, Ingbar SH; The role of subunit sialic acid in the thyrotropic and gonadotropic activities of human chorionic gonadotropin"; *Endocrinology* 1987; vol. 121; no. 1; pp. 160-166.

Arrieta E, Porras A, Gonzales-Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera-Marín G; Ovine serum and pituitary isoforms of luteinizing hormone during the luteal phase; *Reproduction, Fertility and Development* 2006; Vol. 18; No. 4; pp. 485-495.

Apparailly F, Laurent-Cadoret V, Lecompte F, Chopineau M, Maurel M, Guillou F, Combarnous Y; Structure-function relationship and mechanism of action of pituitary and placental gonadotrophins; *Reproduction Fertility Development* 1994; Vol. 6; pp. 157-163.

Baenziger JU y Green ED; Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharide: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews of Biomembranes* 1988; vol. 947, no. 2; pp. 287-306.

Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC; Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides; *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; vol. 89; no. 1; pp. 334-338.

Baenziger JU; Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones?; *Endocrinology* 1996; vol. 137; no. 5; pp. 1520-1522.

Bellisario R, Carlsen RB, Bahl OP; Human chorionic gonadotropin: linear amino acid sequence of the α subunit; *Journal of Biological Chemistry* 1973; Vol. 248; No. 19; pp. 6796-6809.

Birken S, Berger P, Bidart JM, Weber M, Bristow A, Norman R, Sturgeon C, Stenman UH; Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites; *Clinical Chemistry* 2003; Vol. 49; No. 1; pp. 144-154.

Blanchard T.L., Varner D.D., Shumacher J., Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L.; *Manual of Equine Reproduction*. Edited by: Mosby; Second edition; pp. 9-16; USA; 2006.

Boeta M, Zarco L; Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas; *Veterinaria México* 2000; vol. 31; No. 1; pp. 67-69.

Boeta M, Zarco L; Progesterone and equine chorionic gonadotropin concentrations around the time of pregnancy loss in mares impregnated by donkeys and stallions; *Journal of Equine Veterinary Science* 2005; Vol. 25, No.12: pp 531-538.

Boeta M, Zarco L; Endocrine alterations around the time of abortion in mares impregnated with donkey or horse semen; *Animal Reproduction Science* 2010; vol. 121; pp. 124-130.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ; "Protein Methods"; Wiley-Liss 1996; pp. 415.

Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY, Nguyen VT, Gray CM, Dias JA, MacColl R, Eisele L, Harvey DJ; Differential effects of α subunit asparagine⁵⁶ oligosaccharide structure on equine lutropin and follitropin hybrid conformation and receptor-binding activity; *Biochemistry* 2004; vol. 43; pp. 10817-10833.

Stewart F, Allen WR; Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotropin; *Journal of Reproduction and Fertility*, 1981; Vol. 62: pp. 527-536.

Bousfield GR, Liu WK, Sugino H, Ward DN; Structural studies on equine glycoprotein hormones; *Journal of Biological Chemistry* 1987; vol, 262; no. 18; pp. 8610-8620.

Bousfield GR, Ward DN; Reduction and reoxidation of equine gonadotropin alpha-subunits; *Endocrinology* 1992; vol. 131; no. 6; pp. 2986-2998.

Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT; Structural features of mammalian gonadotropins; *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996; vol. 125; pp. 3-19.

Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY; Identification of twelve O-glycosylation sites in equine chorionic gonadotropin β and equine luteinizing hormone β by solid-phase edman degradation"; *Biology of Reproduction* 2001; vol. 64; pp. 136-147.

Burton KA, McKnight GS; PKA, germ cells, and fertility; *Physiology* 2007; Vol. 22; pp. 40-46.

Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT, Bousfield GR; Negative influence of O-linked oligosaccharides of high molecular weight equine chorionic gonadotropin on its luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor-binding activities; *Endocrinology* 1996; vol. 137; no. 6; pp. 2530-2542.

Castro-Fernandez C, Olivares A, Söderlund D, Lopez-Alvarenga JC, Zambrano E, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP; A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma hormone-releasable luteinizing hormone in obese men half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing; *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 2000; vol. 85; pp. 4603-4610.

Chopineau M, Stewart F, Allen WR; Cloning and analysis of the cDNA encoding the horse and donkey luteinizing hormone β subunits; *Gene* 1995; vol. 160; pp. 253-256.

Cole LA; Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites; *Clinical Chemistry* 1997; Vol. 43; No. 12; pp. 2233-2243.

Combarnous Y; Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors"; *Endocrine Reviews* 1992; vol. 13; no. 4; pp. 670-691.

Cooke DJ, Crowe MA, Roche JF, Headon DR; Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction; *Animal Reproduction Science* 1996; vol. 41; no. 2; pp. 77-99.

Corda D, Marcocci C, Kohn LD, Axelrod J, Luini A; Association of the changes in Cytosolic Ca²⁺ and iodide efflux induced by thyrotropin and by stimulation of α 1-adrenergic receptors in cultures rat thyroid cells; *Journal of Biological Chemistry* 1985; vol. 260; no. 16; pp. 9230-9236.

Creus S, Chaia Z, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Ulloa-Aguirre, Campo S; Human FSH isoforms: carbohydrate complexity as determinant of in-vitro bioactivity; *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001; vol.174; pp. 41-49.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SG, Caron MG, Lefkowitz RJ; Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase; *Journal of Biology Chemistry* 1998; vol. 273; no.2; pp. 685-688.

Davis RJ, Faucher M, Racaniello LK, Carruthers A, Czech MP; Insulin-like growth factor I epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distincy mechanisms; *Journal of Biological Chemistry* 1987; vol. 262; pp. 13126-13134.

Dias JA y Roey PV; Structural biology of human follitropin and its receptor; *Archives of Medical Research* 2001; vol. 32; no. 6; pp. 510-519.

Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC; Regulation of progesterone and prostaglandin F2 α production in the CL; *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; vol. 191; pp. 65- 80.

Dufau ML; The luteinizing hormone receptor"; *Annual Reviews Physiology* 1998; vol. 60: pp. 461-496.

Enders AC, Meadows S, Stewart F, Allen WR; Failure of endometrial cup development in the donkey-in-horse model of equine abortion; *Journal of Anatomy*; 1996; Vol. 188: pp. 575-589.

Fares F; The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists; *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; Vol. 1760; pp. 560-567.

Ferguson FG, Downey III WE, Colaprieto AM, Barak LS, Menard L, Caron MG; Role of β .arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization; *Science* 1996; vol. 271; no. 5247; pp. 363-366.

Ferguson SG, Caron MG; G protein-coupled receptor adaptation mechanisms; *Seminars in Cell and Development Biology* 1998; Vol. 9; no. 2; pp. 119-127.

Ferguson SG, Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling; *Pharmacological Reviews* 2001; Vol. 53; No. 1; pp. 1-24.

Fiete D, Srivastava V, Hindagui O, Baenziger JU; A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAcβ1, 4GlcNAcβ1,2Manα that mediates rapid clearance of lutropin; *Cell* 1991; vol. 67; pp. 1103-1110.

Fiete D, Beranek MC, Baenziger JU; The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides terminating with SO₄-4GalNAcβ, 4GlcNAcβ or Man at independent sites; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; vol. 94; no. 21; pp. 11256-11261.

Fiete D y Baenziger JU; Isolation of the SO₄-4GalNAcβ1, 4GlcNAcβ1,2Manα-specific receptor from rat liver; *Journal of Biological Chemistry* 1997; vol. 272; pp. 14629-14637.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW; *Molecular Biology of the pituitary gonadotropins*; *Endocrine Reviews* 1990; vol. 11; no. 1; pp. 177-199.

Gigli I, Russo A, Agüero A; Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos; *In Vet* 2006; vol. 8; No. 1; pp. 183-204.

Ginther OJ; *Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus*; *AAEP Proceedings* 1998; Vol. 44; pp.73-104.

Gospodarowicz D y Papkoff H; A simple method for the isolation of pregnant mare serum gonadotrophin; *Endocrinology* 1967; Vol. 80; No. 4; pp.699-702.

Gudermann T, Bimbaamera M, Bimbaamera L; Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca² mobilization; *Journal of Biological Chemistry* 1992; vol 267; no. 7; pp. 4479-4488.

Hall KU, Collins SP, Gamm DM, Massa E, DePaoli-Roach AA, Uhler MD; Phosphorylation dependent Inhibition of Protein Phosphatase-1 by G-substrate; *Journal of Biological Chemistry* 1999; vol. 274; no. 6; pp. 3485-3495.

Harrison RJ; The early development of the corpus luteum in the mare; *Journal of Anatomy* 1946; vol. 80; pp. 160-166.

Hearn MT y Gomme PT; Molecular architecture and biorecognition processes of the cysteine knot protein superfamily: part 1. The glycoprotein hormones; *Journal of Molecular Recognition* 2000; vol. 13; pp. 223-278.

Henke A y Gromol J; New insights into evolution of chorionic gonadotropin; *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008; Vol. 291; No. 1-2; pp. 11-19

Jameson JL, Hollenberg AN; Regulation of chorionic gonadotropin gene expression; *Endocrine Reviews* 1993; vol. 14; no. 2; pp. 203-221.

Kojima FN, Cupp AS, Stumpf TT, Zalesky DD, Roberson MS, Werth LA, Wolfe MW, Kittok 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; *Biology of Reproduction* 1995; Vol. 52; pp. 297-304.

Krupnick JG, Benovic JL, The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation; *Annual Reviews Pharmacological Toxicology* 1998; vol. 38; pp. 289-319.

Kydd J, Miller J, Antczak DF, Allen WR; Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy; *Journal Reproduction Fertility; Suppl.* 1982; Vol. 32: pp. 361-369.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T; Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins; *Trends in Pharmacological Sciences* 1993, vol. 14; no. 8; pp. 303-307.

Legardinier S, Cahoreau C, Klett D, Combarous Yves; Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lesson from recombinant hormone expressed in insects cells; *Reproduction Nutrimient Development*; 2005; Vol. 45: pp. 255-259.

Lopata A, Oliva K, Stanton PG, Robertson DM; Analisis of chorionic gonadotrophin secreted by cultures human blastocysts; *Molecular Human Reproduction* 1997; Vol. 3; No. 6; pp. 517-521.

Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ; Regulation of tyrosine kinase cascades by G-proteincoupled receptors; *Current Opinion in Cell Biology* 1999, vol. 11; no. 2; pp. 177-183.

Martín-Rosset W.; *La alimentación de los caballos*; Edit. Aedos; pp. 229; España, 1993.

Martinuk SD, Manning AW, Black D, Murphy BD; Effects of Carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activities of equine chorionic gonadotropin in vivo; *Biology of Reproduction* 1991; Vol. 45; pp. 598-604

Matteri RL, Papkoff H, NG DA, Swedlow JR; Chang YS; Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse; *Biology of Reproduction* 1986; Vol. 34; pp. 571-578.

Matteri RL, Papkoff H, Murthy HMS, Roser JF, Chang YS; Comparison of the properties of highly purified equine chorionic gonadotropin isolated from commercial concentrates of pregnant mare serum and endometrial cups; *Domestic Animal Endocrinology* 1986; Vol. 31; No. 1; pp. 39-48.

Matteri RL, Papkoff H; Characterization of equine luteinizing hormone by chromatofocusing; *Biology of Reproduction* 1987; Vol. 36; pp. 261-269.

Matteri RL, Papkoff H; Microheterogeneity of equine follicle-stimulating hormone; *Biology of Reproduction* 1988; Vol. 38; pp. 324-331.

Matsui T, Mizuochi T, Titani K, Okinaga T, Hoshi M, Bousfield GR, Sugino H, Ward DN; Structural analysis of N-linked oligosaccharides of equine chorionic gonadotropin and lutropin β -subunits; *Biochemistry* 1994; vol. 33; pp. 14039-14048.

Matzuk MM, Keene JL, Boime I; Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction; *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 1989; vol. 264; no. 5; pp. 2409-2414.

McFarlane JR, Czekala NM, Papkoff H; Zebra Chorionic Gonadotropin: Partial Purification and Characterization; *Biology of Reproduction* 1991; Vol. 44; pp. 827-833.

Montagnana M, Trenti T, Aloe R, Cervellin G, Lippi G; Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics; *Clinica Chimica Acta* 2011; vol. 412; pp. 1515–1520.

Naylor SL, Chin WW, Goodman HM, Lallely PA, Grzeschik KH, Sakaguchi AY; Chromosome assignment of genes encoding the α and β subunit of glycoprotein hormone in man and mouse; *Somatic Cell and Molecular Genetics* 1983; vol. 9; no. 6; pp. 757-770.

Neer EJ; Heterotrimeric G proteins : organizers of transmembrane signals; *Cell* 1995; vol. 80; no. 2; pp. 249-257.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, Mcintush EW; Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum; *Physiological Reviews* 2000; Vol. 80; No. 1; pp. 1-29.

Papkoff H, Bewley TA, Ramachandran J; Physicochemical and biological characterizations of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits; *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; vol. 532; pp. 185-194

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; *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; Vol. 82; No. 9; pp. 3103-3106.

Pierce JG y Parsons TF; Glycoprotein hormones: structure and functions; *Annual Review of Biochemistry* 1981; vol. 50; pp. 465-495.

Perera-Marín G, Alcantara AF, Murcia C, Hernandez-Ceron J, González-Padilla E; Purification of five bovine luteinizing hormone (bLH) isoforms. Chemical, physical, biological and immunological characterization; *Veterinaria Mexico* 2004; Vol.35; No. 2; pp. 129-145.

Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernandez-Ceron J, González-Padilla E; Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in holstein heifers; *Animal Reproduction Sciences* 2005; vol. 86; pp. 53-69.

11. ANEXO

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

(MÉTODO DE BRADFORD)

CURVA ESTANDAR

Preparar concentraciones de Albumina Sérica Bovina (BSA)(1,2,4,8,10,20)

Llevar a cada solución a un volumen final de 800 μ l con agua desionizada.

Agregar 200 μ l de reactivo de Bradford (concentrado)

Dejar que reaccione durante 5 min.

Leer a 590 nm (Perkin Elmer Lambda-Bio 23)

Preparación de albumina sérica bovina

Se tomó de la solución estándar (BSA al 20%), se tomaron 10 μ l que contienen 2 mg de proteína.

Esta concentración de proteína se ajustó a un volumen de 2 ml con agua desionizada, generando una concentración de 1 μ g/ μ l de solución.

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Solución A: Acrilamida al 30%, Bisacrilamida 0.8%

Acrilamida 30.0 g

Bisacrilamida 0.8 g

Agua 100.0 ml

Solución B: (Amortiguador para gel resoledor)

TRIS 18.17 g

SDS 0.40 g

Agua 100.0 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado

Solución C (amortiguador del gel concentrador)

TRIS 6.06 g

SDS 0.40 g

Agua 100.0 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado

Solución D (amortiguador de corrida)

1X 2x

TRIS 1.52 g 2.28 g

Glicina 7.21 g 10.81 g

SDS 0.50 g 0.75 g

Agua 500 ml 750 ml

Ajustar a pH 8.3 con NaOH 10 N

Solución E (amortiguador de muestras no reductoras)

Solución C 125 ml

SDS al 19% 0.10 ml

Glicerol (0.05%) 1.0 ml

Azul de Bromoferol (0.05%) 0.4 ml

Solución F (Persulfato de amonio al 10%)

Persulfato de amonio 100 mg

Agua 1.0 ml

Solución G (amortiguador de muestras reductoras)

B-mercaptoetanol 10 μ l

Solución E 990 μ l

Marcadores de Peso Molecular

Marcadores de BIO-RAD (Bajo peso molecular) 5 μ l o 10 μ l

Solución E o G 90 μ l o 95 μ l

Nota: la aplicación de cada muestra en el gel no sobrepase de 20 μ l.

PROCEDIMIENTO

GEL RESOLVEDOR	7.5%	10%	12.5%
Solución B	2.5 ml	2.5 ml	2.25 ml
Solución A	2.5 ml	3.33 ml	3.75 ml
Agua	5 ml	5 ml	3 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	7.5 μ l
Solución F	50 μ l	50 μ l	30 μ l

Gel Concentrador (4%)	
Solución C	1.26 ml
Solución A	0.66 ml
Agua	3 ml
TEMED	5 μ l
Solución F	25 μ l

La corrida electroforética del gel se realiza a 70 volts en el gel concentrador y a 140 volts en el gel resolvedor.

ELISA (Enzaimmunoensayo)

El área de los pozos se encuentra cubierta por un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un sitio antigénico único en la molécula de PMSG. Una parte de la alícuota de la muestra del suero que contiene PMSG endógeno se incuba en el pozo cubierto. En un segundo paso se incuba el conjugado de la enzima en los pozos. El conjugado no unido se lava y se elimina con agua desionizada. La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de PMSG o eCG en la muestra. Después de haber agregado el sustrato, la intensidad del color desarrollada es proporcional a la concentración de PMSG en la muestra.

Asegure el número deseado de tiras reactivas en el soporte

Agregar 100 µl de PMSG o eCG estándar en los pozos apropiados

Agregar 100 µl de muestra en los pozos seleccionados

Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente sin agitación.

Agitar enérgicamente hacia afuera el contenido de los pozos

Lavar los pozos tres veces con agua destilada.

Agregar 100 µl del conjugado en cada pozo

Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente sin agitación.

Sacuda enérgicamente hacia afuera el contenido de los pozos

Lavar los pozos 5 veces con agua destilada.

Agregar 100 µl de la solución sustrato a cada pozo.

Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente

Parar la reacción enzimática adicionándole 50 µl de solución stop en cada pozo y determinar la absorbancia de cada pozo a 450 ± 10 nm.

Estándares para PMSG:

0 UI PMSG/ml, 25 UI PMSG/ml, 100 UI PMSG/ml, 400 UI PMSG/ml y 800 UI PMSG/ml.

Las diluciones utilizados para las muestras variación de 1/10 a 1/80 para su detección dentro de la curva estándar.

RIA (Radioinmunoanálisis)

Se utilizó esta técnica para la medición de progesterona en suero de las dos gestaciones. Coat-A-Count Progesterone es un radioinmunoensayo ^{125}I en fase sólida para la medición directa y cuantitativa de progesterona en suero o plasma. La progesterona marcada con I^{125} compite por un tiempo fijo con progesterona de la muestra por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared del tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada con I^{125} . La lectura del tubo en un contador gamma, proporciona entonces, un número que se convierte por medio de una curva de calibración, en una medida de progesterona presente en la muestra.

Procedimiento:

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15 -28°C) antes de su uso.

Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12X75mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica).

Tubos recubiertos** Marcar con A (unión máxima) catorce tubos y de B a G por duplicado. Adicionalmente, marcar tubos recubiertos con anticuerpo por duplicado, para controles y muestras de pacientes.

Pipetear 100µl del calibrador* A en los tubos NSB y A y 100µl de cada uno de los calibradores B a G en tubos marcados correspondientemente. Pipetear 100µl de cada control y muestra de paciente en los tubos preparados. Las muestras de pacientes susceptibles de contener concentraciones de progesterona mayores a la del calibrador más alto (40ng/ml), deben ser diluidas con calibrador 0 antes de ser analizadas.

Añadir 1.0ml I^{125} progesterona a cada tubo. Agitar en vórtex y dejar los tubos T a un lado para su contaje.

Incubar durante 3 horas a temperatura ambiente (15-28°C)

Decantar todos los tubos (excepto los tubos T) y dejar escurrir durante 2 a 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Leer durante 1 minuto en un contador gamma

Calibradores listos para usarse en suero humano A (0ng/ml), B (0.08ng/ml), C (0.49ng/ml), D (1.88ng/ml), E (9.8ng/ml), F (18.7ng/ml), G (40ng/ml)

** I¹²⁵ Progesterona

*** Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anti-Progesterona.